血液总 RNA 提取试剂盒

（离心柱型）
目录号：GF443

产品内容

产品组成	GF443 / (50 preps)
10×红细胞裂解液 (10×Red cell Lysis Buffer)	60 ml
裂解液 RLH (Buffer RLH)	30 ml(使用前加入 300ul 的巯基乙醇)
溶液 RW (Buffer RW)	55 ml
DNase I (4U/10ul)	600 ul
RDD 缓冲液(DNA 消化缓冲液)	5 ml
漂洗液 PW (Buffer PW)	16 ml（使用前请先加入 64ml 无水乙醇）
无酶双蒸水(RNase-Free ddH2O)	45 ml
无酶离心管(RNase-Free Centrifuge Tubes 1.5ml)	50 个
无酶过滤柱 CS1 (Filtration Columns CS1)	50 套
无酶吸附柱 CR2 (Spin Columns CR2)	50 套

储存条件

DNase I（DNase I 冻干粉溶解于专用保存液），储存于-20℃；
其他试剂室温（15-25℃）保存。

产品简介

本试剂盒可从新鲜全血中有效提取总RNA，可处理不同物种以及多种抗凝剂全血样品。吸附柱中采用的硅基质材料为本公司新型材料，专一吸附RNA，配合我司高效的缓冲液体系，可有效去除杂质蛋白。提取的RNA可用于PCR、芯片分析、Blot、PolyA 筛选、体外翻译、RNase 保护分析和分子克隆等多种下游实验。

本试剂盒不适用于冻存的全血。

预防RNase污染，应注意以下几方面

1. 经常更换新手套，因为皮肤经常带有细菌，可能导致RNase污染。
2. 使用无RNase的塑料制品、玻璃器皿和枪头，避免交叉污染。
3. RNA 在裂解液 RLH 中时不会被 RNase 降解。但提取后继续处理过程中应使用不含 RNase 的塑料和玻璃器皿。玻璃器皿可在 150℃烘烤 4h，塑料器皿可在 0.5M NaOH 中浸泡 10min，然后用水彻底清洗，再灭菌，即可去除 RNase。
4. 配制溶液应使用无RNase的水（将水加入到干净的玻璃瓶中，加入DEPC至终浓度0.1%(V/V)，高压灭菌）。

使用前注意事项

1. 裂解液 RL：使用前请添加 300ul 巯基乙醇，**添加过巯基乙醇的裂解液 4℃保存**。
2. 漂洗液 PW：使用前请添加 64ml 无水乙醇。
3. 人类的血液或体液可能有潜在的感染性，所以如果对人类的全血进行处理，请注意做好防护措施。
4. 本试剂盒最多能处理1.5ml健康的人类全血(健康人的全血中白细胞含量为：最多4000-7000个白细胞/ul

血液)，如果血液中白细胞的含量较高，可按比例减少血液的用量，本试剂盒最多可处理的白细胞数量为：1×10^7。

5. 在白细胞裂解后，该说明书中的所有步骤需在室温(15-25℃)进行，操作速度越快越好。
6. 细胞溶解物(在裂解液RLH中)可以存放在-70℃，待使用时，将其置于37℃孵育10min，以保证所有的盐都溶解，然后进行操作步骤第7步。
7. 本试剂盒不适用于冻存的全血。

操作步骤

1. 红细胞裂解液的稀释：根据处理血液样品的体积选取适当体积的 10×红细胞裂解液(例如待处理的血液样品体积为 200ul，则取 140ul 10×红细胞裂解液)，用无酶双蒸水稀释成 1×红细胞裂解液。
2. 向 1 体积人类全血中加 5 倍体积 1×RBC 裂解液 (需自备合适的干净管子)。

   注意：为获得最佳的混匀效果，血液和 1×红细胞裂解液的混合液体积不应超过管子体积的 3/4。如果血液中的白细胞含量较高，可按比例减小血液的使用体积，第 5 步中的 1×红细胞裂解液的使用体积也要进行相应调整。
3. 冰上孵育 10-15min，在孵育过程中涡旋振荡混匀 2-3 次。

   注意：在孵育过程中溶液将变成半透明状态，表明红细胞裂解。如果必要的话，孵育时间可延长至 20min。
4. 4℃ 2,100rpm(~400×g)离心 10min，将上清完全去除。

   注意：离心后白细胞可能会形成小球，确保完全去除上清，痕量红细胞的存在，会使白细胞小球呈现红色，而该现象会在随后的漂洗步骤中消失。
5. 向白细胞沉淀中加入 1×红细胞裂解液(加入 1×红细胞裂解液的体积是第 1 步中全血用量的 2 倍)，重悬细胞。
6. 4℃ 2,100rpm(~400×g)离心 10min，将上清完全去除。

   注意：如果上清去除不完全将会影响裂解及随后的 RNA 与膜的结合，导致最后 RNA 产率降低。
7. 向白细胞沉淀中加入裂解液 RLH （**使用前请先检查是否已加入 β-巯基乙醇**），具体加量按照下表进行，涡旋或使用移液器混匀。

   注：如果血液不是健康人的全血，需要根据血液中白细胞的数量来确定所需裂解液 RLH 的体积，此时细胞应完全裂解，块状细胞沉淀消失

裂解液 RLH(ul)	健康人类全血(ml)	白细胞数量
350	多至 0.5	多至 2×10^6
600	0.5-1.5	2×10^6 至 1×10^7

8. 将溶液转移至过滤柱 CS1 中(过滤柱 CS1 放在收集管中)，12,000rpm(~13,400×g)离心 2min，弃去过滤柱 CS1，收集滤液。

   注意：为避免气溶胶的形成，请将移液器调整到≥750ul 以保证一次性将所有溶液转移到过滤柱上，如果细胞太多，将会出现裂解液粘稠的现象，造成难以吸取的情况。
9. 向滤液中加入 1 倍体积 70%乙醇(通常为 350ul 或 600ul)，混匀(此时可能会出现沉淀)，得到的溶液和沉淀一起转入吸附柱 CR2 中(吸附柱 CR2 放入收集管中)，12,000rpm(~13,400×g)离心 30-60sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CR2 放回收集管中。

   注意：配制 70%乙醇时请使用 RNase-Free ddH2O，如果滤液体积有所损失，请相应减少 70%乙醇用量。将溶液和沉淀转移至吸附柱 CR2 时，体积大于吸附柱容量，可以分两次完成。

10. 将所得“裂解液/乙醇混合液”（含沉淀），移取至吸附柱 CR2 中（吸附柱 CR2 放入收集管中），12,000rpm(~13,400×g)离心 30-60sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CR2 放回收集管中。

注意：将溶液和沉淀转移至吸附柱 CR2 时，如果体积大于吸附柱容量，可以分次完成。

11. 向吸附柱 CR2 加入 500ul 溶液 RW，12,000rpm(~13,400×g)离心离心 1min，丢弃滤液，将吸附柱 CR2 放回收集管中。

12. DNase Ⅰ降解。

每一纯化反应，请将 80ul DNA 消化液（Buffer RDD）与 10ul DNase Ⅰ预先混合在新的离心管(轻弹或翻转离心管以混合均匀，请勿震荡)，将 90ul“DNase Ⅰ工作液”加入至吸附柱的膜中心，于室温（25-28℃）孵育 15min。

注意：如同时操作多组样本，请使用前现配新鲜的 DNase Ⅰ工作液,请勿预先配制保存 DNase Ⅰ工作液。

13. 向吸附柱 CR2 中加入 500ul 溶液 RW，12,000rpm(~13,400×g)离心 1min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CR2 放回收集管中。

14. 向吸附柱 CR2 中加入 600ul 漂洗液 PW**（使用前请先检查是否已加入乙醇）**，12,000rpm(~13,400×g)离心 1min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CR2 放回收集管中。

15. 重复操作步骤 14。

16. 12,000rpm(~13,400×g)离心 3min，将吸附柱 CR2 置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的乙醇。

注意：此步骤目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除，离心后将吸附柱 CR2 在室温放置片刻，以充分晾干。如果有漂洗液残留，可能会影响后续的 RT 等实验。

17. 将吸附柱 CR2 转入一个新的 RNase-Free 离心管中，加入 30-100ul 无酶双蒸水至吸附柱的膜中心，室温静置 2min，12,000rpm(~13,400×g)离心 1min，得到 RNA 溶液。

注意：洗脱缓冲液体积不应少于 30ul，体积过小影响回收效率；RNA 溶液请于-70℃保存。