

EASYspin 全血 RNA 快速提取试剂盒

EASYspin RNA Rapid Blood Kit

产品信息:

试剂盒组成	保存	RA104-01 50 次
10×RLB (RNase-free)	室温	25 ml
裂解液 RLT	室温	50 ml
去蛋白液 RW1	室温	40 ml
漂洗液 RW	室温	10 ml 第一次使用前加入 40 ml 无水乙醇
DNase I-XT	-20℃	500 μl
缓冲液 RDD	-20℃	1 ml×4
RNase-free H ₂ O	室温	10 ml
70%乙醇	室温	9 ml H ₂ O(RNase-free) 第一次使用前加入 21 ml 无水乙醇
RNase-free 吸附柱 RA	室温	50 个
收集管	室温	50 个
RNase-free 离心管 1.5 ml	室温	50 个

保存条件: 本试剂盒在规定保存温度储存 18 个月不影响使用效果。

产品介绍:

红细胞裂解液选择性裂解红细胞，独特的裂解液迅速裂解白细胞和灭活细胞 RNA 酶，用乙醇调节结合条件后，RNA 在高离序盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜，通过一系列快速的漂洗—离心的步骤，将细胞代谢物，蛋白等杂质去除，最后低盐的 H₂O(RNase free) 将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱

自备试剂: 乙醇

注意事项:

1.裂解液RLT和去蛋白液RW1中含有刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套，**避免沾染皮肤，眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或者生理盐水冲洗。**

2.关于DNA的微量残留:

由于采取了本公司独特的缓冲体系和选择了特殊吸附能力的吸附膜,在大多数 RT-PCR 扩增过程中极其微量的 DNA 残留(一般电泳 EB 染色紫外灯下观察不可见)影响不是很大,如果要进行严格的 mRNA 表达量分析如荧光定量 PCR,我们建议在模板和引物的选择时:

- (1)选用跨内含子的引物,这样 DNA 就不能作为模板参与扩增反应。
- (2)选择基因组 DNA 和 cDNA 上扩增的产物大小不一样的引物对。

3.RNA 纯度及浓度检测:

完整性: RNA 可用普通琼脂糖凝胶电泳(电泳条件:胶浓度 1.2%; 0.5×TBE 电泳缓冲液; 150V, 15 min)检测完整性。由于细胞中 70%-80%的 RNA 为 rRNA,电泳后 UV 下应能看到非常明显的 rRNA 条带。动物 rRNA 大小分别约为 5 kb 和 2 kb,分别相当于 28S 和 18S rRNA。动物 RNA 样品中最大 rRNA 亮度应为次大 rRNA 亮度的 1.5-2.0 倍,否则表示 RNA 样品的降解。出现弥散片状或条带消失表明样品严重降解。

纯度: OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值是衡量蛋白质污染程度的指标。高质量的 RNA, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 读数(10 mM Tris, pH7.5)在 1.8-2.1 之间。OD₂₆₀/OD₂₈₀ 读数受测定所用溶液的 pH 值影响。同一个 RNA 样品,假定在 10 mM Tris, pH7.5 溶液中测出的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 读数 1.8-2.1 之间,在水溶液中所测读数则可能在 1.5-1.9 之间,但这并不表示 RNA 不纯。

浓度: 取一定量的 RNA 提取物,用 RNase-free 水稀释 n 倍,用 RNase-free 水将分光光度计调零,取稀释液进行 OD₂₆₀, OD₂₈₀ 测定,按照以下公式进行 RNA 浓度的计算:
终浓度 (ng/μl) = (OD₂₆₀) × (稀释倍数 n) × 40

操作步骤:

- ⇒ 使用前将 10×RLB (RNase-free) 用 DEPC 处理水稀释到 1×。
- ⇒ 第一次使用前请先在漂洗液 RW 瓶和 70%乙醇瓶中加入指定量乙醇,加入后请及时打钩标记已加入乙醇,以免多次加入!

- 1.在适合大小的 RNase free 离心管中加入 1 体积(<1.5 ml)加入各种抗凝剂新鲜血液(颠倒混匀后)和 3 体积的 1×RLB (RNase free),颠倒混匀,可轻弹管壁,确保混匀。
- 2.室温放置 10 min (期间应该颠倒轻弹混匀数次帮助裂解红细胞)。

如果 RNA 降解严重,可在冰上裂解,但是时间可长一些以充分裂解。

- 3.12,000 rpm 离心 20 sec,倒弃红色上清,并小心的尽可能多的吸弃上清(注意不要吸到管底的细胞团),留下完整的管底白细胞团。

如发现红细胞大量残留可重复 2, 3 步骤。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。

- 4.涡旋或者轻弹管壁将白细胞沉淀完全松散重悬,加 350 μl (<0.5 ml 全血或 <2×10⁶ 白

- 细胞) 或者 600 μl (0.5-1.5 ml 全血或 2×10^6 - 1×10^7 白细胞) 裂解液 RLT, 吹打混匀后用手剧烈振荡 20 sec 或涡旋混匀, 充分裂解。
5. 较精确估计裂解物体积, 加入等体积的 70%乙醇(请先检查是否已加入无水乙醇!), 此时可能出现沉淀, 但是不影响提取过程, 立即混匀, 不要离心。
6. 将混合物(每次小于 700 μl , 体积多可以分两次加入)加入一个吸附柱 RA 中(吸附柱放入收集管中), 12,000 rpm 离心 30-60 sec, 弃掉废液。
7. 加 350 μl 去蛋白液 RW1, 室温放置 30 sec, 12,000 rpm 离心 30 sec, 弃掉废液。将吸附柱 RA 放回收集管中。
8. DNase I-XT 工作液的配制: 取 10 μl DNase I-XT 储存液放入新的 RNase-free 离心管中, 加入 70 μl RDD 溶液, 轻柔混匀。
9. 向吸附柱 RA 中央加入 80 μl DNase I-XT 工作液, 室温放置 5 min。
10. 加 350 μl 去蛋白液 RW1, 室温放置 30 sec, 12,000 rpm 离心 30 sec, 弃掉废液。将吸附柱 RA 放回收集管中。
11. 加入 500 μl 漂洗液 RW(请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000 rpm 离心 30 sec, 弃掉废液。加入 500 μl 漂洗液 RW, 重复一遍。
12. 将吸附柱 RA 放回空收集管中, 12,000 rpm 离心 2 min, 将吸附柱置于室温放置数分钟, 以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。
13. 取出吸附柱 RA, 放入一个 RNase free 离心管中, 根据预期 RNA 产量在吸附膜的中间部位加 30-50 μl H_2O (RNase free) (事先可在 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热效果更好), 室温放置 1 min, 12,000 rpm 离心 1 min。
15. 如果提取全血 >0.5 ml 或者 > 2×10^6 白细胞, 加 30-50 μl RNase free H_2O 重复步骤 14, 合并两次洗脱液, 或者使用第一次的洗脱液加回到吸附柱重复步骤一遍。