



RNApure Blood Kit

血液RNA提取试剂盒

目录号：CW0582S（50 preps）

保存条件：室温（15-30℃）。

产品内容

Component	CW0582S 50 preps
Buffer RBL (10×)	60 ml
Buffer RL	35 ml
Buffer RW1	40 ml
Buffer RW2 (concentrate)	11 ml
RNase-Free Water	10 ml
Spin Columns FL with Collection Tubes	50
Spin Columns RM with Collection Tubes	50
RNase-Free Centrifuge Tubes (1.5 ml)	50

产品简介

本试剂盒适用于从新鲜全血（用柠檬酸盐、EDTA或肝素等抗凝剂处理过的血液样品）中提取总RNA，可以处理多至1.5 ml的全血，洗脱得到分子量大于200 bp的高纯度RNA，多个样品可以在1小时内同时完成。本产品无需CsCl纯化的超离心步骤和LiCl或乙醇沉淀，不含有苯酚或氯仿等有毒溶剂，经过纯化的RNA有效去除血红素、肝素等酶抑制剂和污染物，可直接用于各种分子生物学常规实验，如RT-PCR、Northern Blot、Dot Blot、体外翻译等实验。

自备试剂：β-巯基乙醇、70%乙醇（用无RNase的水配制）、无水乙醇。

实验前准备及重要注意事项

1. 预防RNase污染，应注意以下几方面：
 - 1) 使用无RNase的塑料制品和枪头，避免交叉污染。
 - 2) 玻璃器皿应在使用前于180℃高温下干烤4小时，塑料器皿可在0.5M NaOH中浸泡10分钟，用水彻底冲洗后高压灭菌。
 - 3) 配制溶液应使用无RNase的水。
 - 4) 操作人员戴一次性口罩和手套，实验过程中要勤换手套。
2. 样品应避免反复冻融，否则影响RNA提取得率和质量。样品在Buffer RL中，可于-70℃保存一个月。
3. 使用前请检查Buffer RL是否出现结晶或者沉淀，可置于56℃水浴重新溶解。Buffer RL在使用前请加入β-巯基乙醇，至终浓度为1%。如1 ml Buffer RL加10 μl β-巯基乙醇。加入β-巯基乙醇的Buffer RL室温可保存1个月。
4. 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明先在Buffer RW2中加入无水乙醇。
5. 本试剂盒不能用于加入抗凝剂的冷冻血液样本RNA的提取。
6. 10×Buffer RBL需在使用前将溶液用无RNase的水进行10倍稀释，稀释后置于2-8℃保存。
7. 若下游实验对DNA非常敏感，建议用不含RNase的DNase I（货号：CW2090S）对RNA进行处理。
8. 所有离心步骤如无特殊说明均在室温下进行，且所有操作步骤动作要迅速。

操作步骤

1. 向**0.5-1.5 ml** 新鲜的抗凝全血样本中，**加入5倍体积的1×Buffer RBL（请于使用前用无RNase的水将10×Buffer RBL稀释10倍）**，轻轻涡旋或颠倒混匀。冰上孵育10-15分钟，孵育过程中混匀两次。

注意：孵育过程中浑浊的悬液会变成透明，证明红细胞被裂解，必要时可以把孵育时间延长至20分钟。

2. 4℃ 2,100 rpm (~400×g) 离心10分钟，小心吸弃上清。
3. 向以上沉淀中加入**2倍血液样本体积的1×Buffer RBL（请于使用前用无RNase的水将10×Buffer RBL稀释10倍）**，轻轻涡旋，充分重悬沉淀。
4. 4℃ 2,100 rpm离心10分钟，小心并彻底吸弃上清。

注意：此步一定要完全去除上清否则影响裂解导致RNA产量下降。

5. 向沉淀中加入**Buffer RL（使用前检查是否已经加入β-巯基乙醇）**，0.5-1.5 ml血液样本加入**600 μl Buffer RL**，或小于0.5 ml血液样本加入**350 μl Buffer RL**，混匀。
6. 将所得液体转移到已装入收集管的过滤柱（Spin Columns FL）中，12,000 rpm (~13,400×g) 离心2分钟，收集滤液，弃掉过滤柱。
7. 向所得滤液中加入**1倍体积（600 μl或350 μl）的70%乙醇（无RNase水配制）**，混匀。

注意：加入乙醇后可能会产生沉淀，不会影响后续实验。

8. 将上步所得溶液全部加入到已装入收集管的吸附柱（Spin Columns RM）中，若一次不能加完溶液，可分多次转入。12,000 rpm离心15秒，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。
9. 向吸附柱中加入**700 μl Buffer RW1**，12,000 rpm离心15秒，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

可选步骤：如果要进行对微量DNA非常敏感的RNA实验，则用以下步骤替代步骤9。

1）向吸附柱中加入350 μl Buffer RW1，12,000 rpm离心15秒，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

2）配制DNase I 混合液：取70 μl Reaction Buffer 和10 μl DNase I 储存液，轻柔混匀，配制成终体积为80 μl的反应液。

注意: 以上体系为按照我公司产品DNase I (CW2090S) 反应体系进行配置, 应用其他公司产品请参考相应说明书。

- 3) 向吸附柱中直接加入80 μl 配制好的DNase I 反应液, 20-30 $^{\circ}\text{C}$ 孵育15分钟。
- 4) 向吸附柱中加入350 μl Buffer RW1, 12,000 rpm离心15秒, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。
10. 向吸附柱中加入**500 μl Buffer RW2 (使用前检查是否已加入无水乙醇)**, 12,000 rpm离心15秒, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。
11. 重复步骤10。
12. 12,000 rpm离心2分钟, 倒掉收集管中的废液。将吸附柱置于室温数分钟, 以彻底晾干。

注意: 这一步的目的是将吸附柱中残余的乙醇去除, 乙醇的残留会影响后续的酶促反应(酶切、PCR等)。

13. 将吸附柱置于一个新的无RNase离心管中, 向吸附柱的中间部位加入**30-50 μl RNase-Free Water**, 室温放置1分钟, 12,000 rpm离心1分钟, 收集RNA溶液, -70 $^{\circ}\text{C}$ 保存RNA, 防止降解。

注意: 1) RNase-Free Water体积不应小于30 μl , 体积过小影响回收率。

2) 如果要提高RNA的产量, 可用30-50 μl 新的RNase-Free Water重复步骤13。

3) 如果要提高RNA浓度, 可将得到的溶液重新加入到吸附柱中, 重复步骤13。

本产品仅供科研使用, 请勿用于临床诊断及其它用途