

HiPure Blood RNA Kit

全血 RNA 小提试剂盒

产品简介

本产品适合于从 0.5~2ml 新鲜血液或冻藏血液样品中抽提 RNA 和 miRNA, 试剂盒基于硅胶柱纯化技术和 MagZol Reagent 抽提技术, 提取过程无需进行耗时的醇类沉淀, 整个提取过程只需 40 分钟。得到的 RNA 可直接用于 RT-PCR, Northern blot, poly-A+ 纯化、核酸保护和体外翻译等实验。

产品组成

产品编号	R4161-01	R4161-02	R4161-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns I	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
10 x RBC Lysis Buffer	10 ml	50 ml	250 ml
MagZol Reagent	12 ml	60 ml	270 ml
Buffer BCP	1 ml	7 ml	30 ml
Buffer RW2*	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
RNase Free Water	1.8 ml	10 ml	30 ml

保存条件

本产品除 MagZol Reagent 和 Buffer BCP 外, 其它组分可在常温下(15-25℃)干燥保存 18 个月。MagZol Reagent 和 Buffer BCP 采用室温运输, 收到产品后, 请保存于 2-8℃。

原理

HiPure 硅胶柱以高结合力的玻璃纤维滤膜为基质。滤膜在高浓度离子化剂条件下，可通过氢键和静电等物理作用吸附核酸，而蛋白质和其它杂质则不被吸附而去除。试剂盒先选择性裂解去除红细胞，离心收集白细胞后，在 MagZol Regaent 匀浆裂解，RNA 释放到裂解液中。经 BCP 或氯仿抽提去除基因组 DNA；滤液中加入乙醇调节结合条件，混合液转移至柱子中过滤，RNA 被吸附上柱子的膜上，而蛋白质则不被吸附而去除，经 Buffer RW2 洗涤去除盐分，最后 RNA 被 RNase-Free Water 洗脱。

血液的收集，保存及用量

血液最好采用 EDTA 进行抗凝，其它抗凝剂如 ACD, CPDA 和肝素也可使用。由于肝素对 DNA 聚合酶有抑制作用，需尽量避免。血液中 mRNA 分子有不同的半衰期，约为 0.5 小时至 12 小时。用于调节基因表达的 mRNA 分子的半衰期会比管家基因的 mRNA 分子的半衰期短很多。若 mRNA 完整性非常关键，血液样品在 2-8°C 放置时间不要超过 2 小时。血液在冻藏/解冻过程中会引起细胞破裂，最好避免冻藏。

若血液无法在短时间内进行操作，可按如下方式进行保存：

- **分离白细胞：**按实验方案分离得到到白细胞，得到的白细胞可直接保存于-80°C。
- **裂解保存：**按实验方案分离得到到白细胞，涡旋重悬后，加入 1ml MagZol Reagent 涡旋 5-15 秒打散细胞，室温放置 10 分钟让细胞充分裂解。该裂解液在 4°C 保存 3 天，-20°C 保存六个月以上。
- **RNAsafer LS Reagent：**将 1 倍体积抗凝血液和 3 倍 RNAsafer LS Reagent 颠倒混合。该混合液可在 2-8°C 保存 1 周，-20°C/-80°C 长期保存。
- **MagZol 3BD Reagent：**将 1 倍体积抗凝血液和 1.5 倍 MagZol 3BD Reagent 颠倒混合。该混合液可在 2-8°C 保存 1 周，-20°C/-80°C 长期保存。
- **冻血 RNA 提取：**转移血液离心管中，并在-70°C 下储存。提取 RNA 时，在不解冻情况下，在冷冻血液（用称重估算血液体积）中加入 1.2~1.5 倍体积的 MagZol 3BD 颠倒或摇动直至样品完全解冻，不要在没有试剂的情况下解冻血液样本，这将导致 RNA 降解。

准备事项

- 按瓶子标签所示，加入适量的无水乙醇稀释 Buffer RW2，并于室温保存。
- 10 x RBC lysis Buffer 使用前用灭菌水稀释至 1 x，并装在合适的瓶子中。

实验步骤 A

1. 在 15ml 离心管中，加入 1 倍体积的血液(1.0~2.0ml)和 5 倍体积 1x RBC lysis Buffer，颠倒混匀 5-10 次。冰上放置 10-15 分钟，其间颠倒混匀 2~3 次。

在放置过程中，血液会从雾状变成透亮的溶液。透亮的溶液就表明了红细胞已裂解。处理病人的血液时，有可能需要延长至 20 分钟。

试剂盒提供 10 x RBC lysis Buffer，使用前须用灭菌水稀释至 1 x。病人血液的白细胞可能会上升，需调整血液用量，以确保白细胞数量不超过 1×10^7 。举例，1.5 ml 的血液，需加入 7.5 ml 1 x RBC lysis Buffer。

处理骨髓样品时，可以控制样品量至 300~1000 μ l。当全血和骨髓样品一起操作时，而无法区分骨髓样品时，离心后可以根据细胞沉淀量来判断的。

2. **4 $^{\circ}$ C，2000xg 离心 10 分钟，小心倒弃上清液，余下适量的残液，涡旋 5-10 秒重悬淋巴细胞。**

大部分骨髓样品离心后会产生大量的淋巴细胞沉淀，是常规血液的 3-5 倍。对淋巴细胞沉淀量的进行控制是必须的，过多的细胞会引起裂解液过于粘稠或提取质量下降。当细胞沉淀量过多时，倒弃上清液时留下更多残液，如 300~500 μ l 残液，涡旋重悬后吸出多余悬液，于 -80 $^{\circ}$ C 保存备用，余下 50~100 μ l 细胞悬液进行 RNA 抽提。若细胞沉淀量是正常的，与常规血液相当时，倒弃上清液时，只余下 50~100 μ l 残液，涡旋重悬后，按第 3 步进行操作。处理全血样品时，倒弃上清液，反扣于吸水纸上吸尽多余的残液，余下不超过 50-100 μ l 残液，涡旋重悬。

3. **转移 50~100 μ l 淋巴细胞悬液至 1.5ml 离心管中，加入 1ml MagZol Reagent，涡旋 5-15 秒打散细胞。室温静置 5-10 分钟充分裂解细胞。**

用注射器或移液枪抽打 5-10 次进一步匀浆样品，有利于提高产量。1ml MagZol Reagent 只能处理 100 μ l 液体样品，当体积超过 100 μ l 时，按比例加入 MagZol Reagent。

4. **按 1ml MagZol Reagent，加入 200 μ l 氯仿或 100 μ l Buffer BCP 至裂解液中，用手上下剧烈振荡 15 秒，室温放置 3 分钟。**

用涡旋取代振荡会带来更多的基因组 DNA 污染。氯仿/BCP 必须按比例加入，过多的氯仿会迫使 DNA 和蛋白质回到水相中，导致 RNA 的纯度下降。由于氯仿挥发性强，毒性较大，可以用 100 μ l BCP(1-Bromo-2 chloropropane)代替。

5. 4°C, 12,000 × g 离心 15 分钟。

离心后会形成三相体系。上层为水相层含有 RNA，而 DNA 和蛋白质位于有机层(下层)和中间层。中间层的多少取决于样本类型，有些样品的中间层非常少。

6. 转移上清至新的离心管中，加入 0.5 倍或 1.5 倍体积的无水乙醇，颠倒混匀 6-8 次。

若需要提取 miRNA，加入 1.5 倍体积的无水乙醇至上清液中。若只需提取 mRNA(>200nt)，加入 0.5 倍无水乙醇时，可有效去除小于 200nt 的 5S RNA, tRNA 等短片段 RNA，提高 mRNA 的纯度。

7. 把 HiPure RNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中，转移混合液(不要超过 750µl)至柱子中。12,000 × g 离心 30~60 秒。

8. 倒弃滤液把柱子装回收集管。转移剩余混合液至柱子中。12,000 × g 离心 30~60 秒。

若需彻底去除 DNA，建议订购 (R4911) DNase on Column Kit 进行膜上 DNase 消化。

9. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。加入 600µl Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。

8,000 × g 离心 30 秒。

Buffer RW2 在使用之前，必须按说明书或瓶子标签所示用无水乙醇进行稀释。

若需要更充分去除盐离子，可重复第 9 步洗涤柱子一次。

10. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。13,000 × g 离心空柱 3 分钟甩干柱子的基质。

11. 将柱子转移至 1.5ml 离心管中，加入 15-30µl RNase Free Water 至柱子的膜中央。室温静置 2 分钟。13,000 × g 离心 1 分钟。丢弃 RNA 柱子，把 RNA 样品保存 -80°C。

HiPure RNA Mini Column I 最小的洗脱体积是 10µl，小于 10µl 会导致 RNA 的洗脱效率下降。若 RNA 产量超过 10µg，推荐按进行第二次洗脱以获得更高产量。

当 RNA 总量高于 10µg 时，OD260/230 一般都在 1.3-2.2；当 RNA 总量在 5~10µg 时，A260/230 会在 1.0~2.0；当 RNA 总量低于 3µg，A260/230 会低于 1。这是因为 MagZol Reagent 含异硫氰酸胍，以及玻璃滤膜有吸水性或本底吸附。异硫氰酸胍在 230nm 有强烈吸光值，因此 A260/230 主要受该胍盐影响，而不是来源于样品。研究表明，低浓度异硫氰酸胍不影响反转录，定量 RT-PCR，二代测序等相关应用。出现 260/230 在 0.2-1.0 时，可以忽略并直接用于反转录等下游应用。在不堵塞柱子的情况下，适量提高样品用量和裂解液用量，提高核酸浓度（核酸总量>10ug)时，OD260/230 可以明显改善。若您的研究项目需要最好的 A260/230 比值，您可以使用 MD025。MD025 全程不使用异硫氰酸胍，所以 A260/230 的比值更高。