

HiPure Blood RNA Kit

全血 RNA 小提试剂盒

产品简介

本产品适合于从 0.5~1ml 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, 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。

产品组份

产品编号	R4161-01B	R4161-02B	R4161-03B
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns I	10	50	250
HiPure gDNA Mini Column	10	50	250
2ml Collection Tubes	20	50	250
10 x RBC Lysis Buffer	50 ml	50 ml	250 ml
DNase Buffer	6 ml	6 ml	30 ml
DNase I	0.6 ml	0.6 ml	5 x 0.6 ml
Buffer RTL	60 ml	60 ml	250 ml
Buffer RW1	50 ml	50 ml	250 ml
Buffer RW2	50 ml	50 ml	3 x 50 ml
RNase Free Water	10 ml	10 ml	30 ml
说明书	1	1	1

保存条件

本产品除 DNase I 外, 其它组份可在室温保存 18 个月。收到产品后, 把 DNase I 保存于 -20~8℃。

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 Buffer RTL 匀浆裂解，RNA/DNA 释放到裂解液中。经 DNA 过滤柱去除基因组 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, CPD-A 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 分子的半衰期会比看家基因的 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。

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 × RBC lysis Buffer 使用前用灭菌水稀释至 1 ×，并装在合适的瓶子中。
- 提升裂解液的变性能力：使用前分装适量的 Buffer RTL，按每 1ml Buffer RTL 加入 20μl β-巯基乙醇、1M DTT 或 1M TCEP，该混合液室温可保存 1 周。

实验步骤

1. 在 15ml 离心管中，加入 1 倍体积的血液(1.0~1.5 ml)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。4℃，500 x g 离心 10 分钟，小心倒弃上清液。

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。

2. 加入 2 倍体积 1 x RBC lysis Buffer，涡旋重悬淋巴细胞。4℃，500 x g 离心 10 分钟，小心倒弃上清液，余下~30 μ l 残液和淋巴细胞沉淀。

处理骨髓样品时，可以控制样品量至 200 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。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 μ l 残液，涡旋重悬后吸出多余悬液，于-80℃保存备用，余下~3 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，反扣于吸水纸上吸尽多余的残液只余下 30 μ l 残液，涡旋重悬后，按第 3 步进行操作。

3. 涡旋 5~10 秒让细胞沉淀充分分散。加入 0.7ml Buffer RTL 至样品中，立即涡旋混匀打散样品，用移液枪或 1ml 注射器反复吸打 5-10 次匀浆样品。

4. 把 gDNA Filter Column 装在 2ml 收集管中。转移全部裂解液转移至过滤柱中。12,000 x g 离心 2 分钟，弃去 gDNA 过滤柱。

5. 加入 0.5 倍体积无水乙醇(300 μ l)至滤液中，用移液枪吸打混匀 3~5 次。

6. 按把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。转移一半体积混合液至柱子中。12,000 x g 离心 30~60 秒。

7. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中，转移余下的混合液至柱子。12,000 x g 离心 30~60 秒。

8. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 300 μ l Buffer RW1 至柱子中，12,000 x g 离心 1 分钟。倒弃滤液，把柱子装回收集管。

倒弃滤液时，小心取出柱子，不要让柱子底部碰到液体，若碰到液体再离心一次。

5. 按下表在 1.5ml 离心管中，配制 DNase I 反应液，吸打混匀 2-3 次。

成分	用量（每人份）
DNase I	10 μ l
DNase Buffer	90 μ l

- 把全部的 DNase I 反应液滴加到柱子膜中央，盖上盖子，正放 5 分钟，然后再把柱子反放于桌面，让 DNase 反应液尽量覆盖于膜的表面（大部分的 DNA 在膜表面），室温静置 10~15 分钟消化去除 DNA。
- 加入 600 μ l Buffer RW1 至柱子中，室温放置 2 分钟，12,000 \times g 离心 30~60 秒。
- 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 600 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中，12,000 \times g 离心 30~60 秒。
- 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 600 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中，12,000 \times g 离心 30~60 秒。
- 倒弃流出液，把柱子装回收集管。12,000 \times g 离心 2 分钟。
- 将柱子转移至 1.5ml 离心管，加入 20~50 μ l RNase Free Water 至柱子膜中央。室温静置 2 分钟。12,000 \times g 离心 1 分钟。弃去柱子，把 RNA 保存于 -80 $^{\circ}$ C。

当 RNA 总量高于 10 μ g 时，OD260/230 一般都在 1.3-2.2；当 RNA 总量在 5~10 μ g 时，A260/230 会在 1.0~2.0；当 RNA 总量低于 3 μ g，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 > 10 μ g）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。