

## SafPure Blood RNA Kit

### 血液 RNA 保存和提取试剂盒

本产品适合于从各种液体生物样品中提取高纯度总 RNA。试剂盒结合了两种高效的 RNA 抽提技术，将一步法的 RNA 抽提技术和硅胶柱 RNA 纯化技术结合起来，可最大程度上提高 RNA 的纯度。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	R4164-01	R4164-02	R4164-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
MagZol 3BD	30 ml	150 ml	2 x 370 ml
Buffer BCP2	5 ml	20 ml	100 ml
DNase Buffer	/	6 ml	30 ml
DNase I	/	600 ul	5 x 600 ul
Buffer RW1	10 ml	50 ml	250 ml
Buffer RW2*	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
RNase Free Water	1.8 ml	10 ml	30 ml
说明书	1	1	1

版本号：202401

### 保存条件

本产品除 DNase I、Magzol 3BD 和 Buffer BCP2 外，其它组份可在室温保存 18 个月。Magzol 3BD 和 Buffer BCP2 室温运输，收到产品后保存于 2~8℃，DNase I 保存于-20℃。

## 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。血液或其它液体样品在 MagZol 3BD 匀浆裂解，RNA 释放到裂解液中。经 BCP2 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。

## 需要准备材料和工具

- 无水乙醇(96-100%)
- 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。

## 实验步骤

该方案适合于从 2.0ml 新鲜的血液样品中提取高纯度的总 RNA，该方案也适合部分哺乳类动物的血液总 RNA 的抽取。

1. 在 10-15ml 离心管中，加入 2.4ml MagZol 3BD。
2. 加入 2ml 抗凝血液、骨髓、白膜层、血清、血浆、尿液或其它液体样品，立即上下剧烈振荡混匀 15 秒打散样品，60°C 温育 10 分钟。
  - 全血采集到含 EDTA 的抗凝的真空采血管中，并尽快转移至含有 Magzol 3BD 的离心管中，充分混匀对 RNA 产量很关键。
  - **低温保存血液 1：**转移血液至 10-15ml 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，不要在试剂的情况下解冻血液样本，这将导致 RNA 降解。
  - **低温保存血液 2：**转移 2ml 血液至 10-15ml 离心管中，然后加入 2.4ml MagZol 3BD，快速上下振荡 10-15 次，60°C 高速振荡（1200-1500rpm）温育 10 分钟。  
该裂解物可以在-70°C 下储存至少 2 年，在-20°C 下至少 6 个月，在 2~8°C 下至少 15 天，室温至少 7 天。
3. 加入 280ul Buffer BCP2，上下剧烈振荡混匀 15 秒，室温放置 3 分钟。室温下，

4,000~5,000 × g 离心 10 分钟。

4. 转移上清液(~2ml)至新的离心管中，加入 0.5 倍体积无水乙醇，颠倒混匀 3-5 次。  
若需要提取 miRNA，加入 1 倍体积的异丙醇至上清液中。
5. 把 HiPure RNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。转移 0.75ml 混合液至柱子中。12,000 × g 离心 30~60 秒。
6. 倒弃滤液把柱子装回收集管。继续转移剩余混合液至柱子中。12,000 × g 离心 30~60 秒。重复这一步直至所有溶液都转移至柱子并过滤。
7. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。加入 300µl Buffer RW1 至柱子中。12,000 × g 离心 60 秒。
8. 在离心管中配制 DNase 反应液: 10µl DNase I 和 80µl DNase Buffer，吸打混匀。
9. 转移 90µl DNase 反应液至柱子膜中央，室温放置 15 分钟，消化去除 DNA。
10. 加入 500µl Buffer RW1 至柱子中，静置 2 分钟，12,000 × g 离心 60 秒。
11. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。加入 500µl Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。  
12,000 × g 离心 60 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。
12. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。加入 500µl Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。  
12,000 × g 离心 60 秒。
13. 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。
14. 将柱子转移至 1.5ml 离心管中。加入 50~80µl 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。
15. 丢弃 RNA 柱子，把 RNA 样品保存-80°C。

## 常见问题回答

该列表可能有利于解决您在提取过程中所碰到的问题。Magen 的技术人员也可以随时为您提供咨询服务，若您对试剂盒存在疑问或有良好的建议，又或者您在分子生物学实验中碰到问题，都请您联系我们。我们将竭尽所能为您排忧解难。

现象	原因及解决方法
<b>离心后分层现象不明显</b>	
没有加入 BCP2	确保加入 BCP2，BCP2 不要含有异戊醇或其它添加成分。
加入 Buffer BCP2 后混匀效果不好	加入 Buffer BCP2 后，一定要用手剧烈振荡混匀 15 秒。缓慢颠倒或涡旋会导致分层不明显或杂质的污染。如果离心后分层不明显，再剧烈混匀 15 秒后离心。
样品中含有有机溶剂	若样品含有有机溶剂如 DMSO，乙醇，强碱试剂，会影响分层。
<b>RNA 产量低</b>	
RNA 的洗脱效率低	RNase Free Water 没有加到膜上，或洗脱体积不够。再加入 30-50 $\mu$ l RNase Free Water 到膜上，室温静置 2 分钟，然后离心洗脱 RNA。
Buffer RW2 没有加入乙醇稀释	使用前，Buffer RW2 必须加入无水乙醇进行稀释
<b>DNA 污染</b>	
没有进行 DNase I 消化	不要省略 DNase I 膜上消化步骤，确保 DNase I 消化液全部加到膜中央。
Buffer BCP2 抽提振荡不够	加入 Buffer BCP2 后，盖紧盖子。然后用手剧烈上下振荡 15 秒。不要用涡旋或颠倒混匀。
<b>下游实验结果不理想</b>	
盐分污染	加入 Buffer RW2 后，静置 5 分钟后，再离心。
乙醇污染	确保空柱离心速度高于 10,000xg，离心时间为 3 分钟。
<b>OD260/OD230 比值不正常</b>	
增加多一次 Buffer RW2 洗涤	增加多一次 Buffer RW2 洗涤