

HiPure PX Blood RNA Kit

血液 RNA 提取试剂盒

产品简介

HiPure PX Blood RNA Kit 是专门为血液 RNA 保存和提取而设计的。试剂盒适合从 Qiagen Paxgene Tube 或 RNASafer LS Reagent 保存的血液样品中高效回收 RNA。试剂盒莫基于硅胶柱纯化的试剂, 整个提取过程只需 60 分钟。试剂盒适合于从 $\leq 2.5\text{ml}$ 的血液中抽提总 RNA。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	R4168-02	R4168-03
纯化次数	10 次	50 次
HiPure RNA Mini Columns I	10	50
gDNA Filter Mini Columns	10	50
2ml Collection Tubes	30	150
RNase Free Water	60 ml	250 ml
Buffer MBR1 (RTL Lysis Buffer)	10 ml	30 ml
Buffer MBR2 (RNA Digestion Buffer)	5 ml	15 ml
Buffer RW1	10 ml	60 ml
Buffer RW2	5 ml	20 ml
RNase Free Water	1.8 ml	10 ml
Proteinase K	12 mg	50 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	5 ml
DNase I	120 μl	650 μl
DNase Buffer	6 ml	30 ml
说明书	1	1

保存条件

HiPure PX Blood RNA Kit 除 Proteinase K 和 DNase I 外，其它组分可在室温下(15-25℃)干燥保存 18 个月。长期保存时需置于 2-8℃。Proteinase K 干粉和 DNase I 干粉采用室温运输。收到产品后，请把 Proteinase K、DNase I 保存于-20℃。

因 RNase Free Water 中不含任何抑菌因子(抑菌因子会影响 RT-PCR 等)，室温放置或操作时可能会引入细菌或真菌污染。推荐分装 RNase Free Water 处理水并保存于-20℃，以减少污染。若 RNase Free Water 受到污染，请重新配制或重新订购。

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(如盐酸胍或异硫氰酸胍)条件下，可通过氢键和静电等物理化学作用吸附核酸，而蛋白质和其它杂质则不被吸附而去除。吸附了核酸的滤膜经洗涤去除残留的蛋白质和盐，最后可以用低盐缓冲液(如 Buffer TE)或水，洗脱出滤膜上吸附的核酸。得到的核酸纯度高，可直接用于各种下游实验。

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。直接提取血液 RNA 时，新鲜抗凝血液在 2-8℃放置时间最好不要超过 2 小时。血液在冻藏过程中会引起细胞破裂，mRNA 会发生降解，因此血液样品不能低温冻藏。RNASafer LS Reagent 含阳离子表面活性剂，能快速裂解细胞，并和 RNA 形成稳定的电中性复合物，保护 RNA 不降解。血液与 RNASafer LS Reagent 混合后，可在 2-8℃保存 1 周，-20℃保存一个月，-8℃长期六个月以上。

血液与 RNASafer LS Reagent/Paxgene Tube 混合后，离心收集 RNA/阳离子表面活性剂复合物，加入裂解液和蛋白酶 K 消化核酸复合物，让 RNA 释放到裂解液中。消化液经 gDNA 过滤柱去除杂质和基因组 DNA 后，加入乙醇至滤液中调节结合条件，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。柱子经 Buffer RW1 洗涤蛋白质和其它杂质，可选择 DNASE 膜上消化去除残留的 DNA，经 Buffer RW2 洗涤去除盐分，最后 RNA 被 RNASE-Free Water 洗脱。洗脱的 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。

需要准备材料和工具

- (<15,000 x g)小型离心机
- 适合于 15ml 离心管的离心机(3,000-5,000 x g)
- 用无水乙醇稀释 Buffer RW2，并于室温保存。
- 溶解 Proteinase K (20mg/ml): 加入适量的 Protease Dissolve Buffer 溶解 Proteinase K 至终浓度为 20mg/ml，轻轻颠倒让蛋白酶 K 充分溶解。Proteinase K 干粉可在室温下保存一年，但溶解的 Proteinase K 须分装保存于-20~8℃。

方案 1. 从保存的血液样品中提取 RNA

该方案适合于处理 Paxgene Tube 或 RNASafer LS Reagent 保存的样品中提取总 RNA。

1. 取出 Paxgene Tube 或 RNASafer LS Reagent 保存的样品，室温静置 2 小时恢复至室温（室温保存样品无需静置），颠倒混匀 15 次。室温，3,000-5,000 x g 离心 10 分钟，小心倒弃上清液。
2. 加入 4ml RNase Free Water 至沉淀中，剧烈涡旋 10 秒打散沉淀团。室温，3,000-5,000 x g 离心 10 分钟收集沉淀。
3. 倒弃上清液，短暂离心收集管壁上的液滴，用移液枪吸尽全部残液。
4. 加入 500 μ l Buffer MBR1 至沉淀团中，涡旋 10~15 秒直至沉淀充分打散。
5. 加入 200 μ l Buffer MBR2 和 35 μ l Proteinase K，55℃ 振荡（900-1500rpm）温育 15 分钟直到沉淀充分溶解。
6. 12,000 x g 离心 3 分钟。
7. 取 gDNA Filter Mini Column 柱装在 2ml 收集管中。把全部混合液转移至 gDNA 过滤柱子中。12,000 x g 离心 1 分钟。
8. 弃去 gDNA 过滤柱子，加入 400 μ l 无水乙醇至滤液中，用移液枪吸打混匀 3-5 次。
9. 把 HiPure RNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。转移一半的混合液至 RNA 柱中。12,000 x g 离心 1 分钟。

10. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。转移剩余混合液至柱子。12,000 × g 离心 1 分钟。
11. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 300µl Buffer RW1 至柱子中，12,000 × 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。

12. 按下表在 1.5ml 离心管中，配制 DNase I 反应液，吸打混匀。

成分	用量（每人份）
DNase I	10 µl
DNase Buffer	90 µl

13. 把全部的 DNase I 反应液滴加到柱子膜中央，室温静置 10~15 分钟消化去除 DNA。
14. 加入 500µl Buffer RW1 至柱子中，放置 2 分钟，12,000 × g 离心 30~60 秒。
15. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 500µl Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中，12,000 × g 离心 30~60 秒。
16. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 500µl Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中，12,000 × g 离心 30~60 秒。
17. 倒弃流出液，把柱子装回收集管。12,000 × g 离心 2 分钟。
18. 将柱子转移至 1.5ml 离心管，加入 30~100µl RNase Free Water 至柱子膜中央。室温静置 2 分钟。12,000 × g 离心 1 分钟。弃去柱子，把 RNA 保存于-80°C。

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 3ug，A260/230 会低于 1。这是因为 Buffer RW1 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 MDO25。MDO25 全程不使用异硫氰酸胍，所以 A260/230 的比值更高。