

## HiPure PX Blood RNA Kit C

### 血液 RNA 快速试剂盒 C

HiPure PX Blood RNA Kit 是专门为血液 RNA 保存和提取设计的。试剂盒适合从 Paxgene Tube, RNASafer LS Reagent 保存液保存的血液样品中高效回收 RNA。试剂盒基于硅胶柱纯化技术, 整个提取过程只需 40 分钟。试剂盒适合于从  $\leq 2.5$ 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                      | R4168-02C   | R4168-03C   |
|---------------------------|-------------|-------------|
| 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         |
| Buffer PXL                | 10 ml       | 40 ml       |
| Buffer RW1                | 10 ml       | 60 ml       |
| Buffer RW2*               | 5 ml        | 20 ml       |
| RNase Free Water          | 1.8 ml      | 15 ml       |
| Proteinase K Solution     | 0.3 ml      | 1.2 ml      |
| DNase I                   | 120 $\mu$ l | 650 $\mu$ l |
| DNase Buffer              | 6 ml        | 30 ml       |

版本号: 202401

### 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 $^{\circ}$ C)干燥保存 18 个月。收到产品后, 请把 Proteinase K、DNase I 保存于 -20 $^{\circ}$ C。

## 准备事项

- 在 Buffer RW2 中，加入 4 倍体积无水乙醇，于室温保存。

## 实验步骤

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 10-15 次。

2. 室温下，3,000-5,000 × g 离心 10 分钟收集 RNA 沉淀，倒弃上清液，反扣于吸水纸轻轻拍打让残液完全流尽。

若管壁上仍有较多残液，短暂离心用移液枪吸尽所有的残液，残液超过 50μl 时会明显影响 RNA 产量。

3. 加入 700μl Buffer PXL 和 20μl Proteinase K 至样品中，涡旋重悬沉淀，转移至 1.5ml 离心管中，55°C 振荡(900~1500rpm)温育 15~20 分钟直至沉淀充分溶解。

4. 取 gDNA Filter Mini Column 柱装在 2ml 收集管中。把上清液转移至 gDNA 过滤柱子中。12,000 × g 离心 1 分钟。

5. 弃去 gDNA 过滤柱子。加入 400μl 无水乙醇至滤液中，用移液枪吸打混匀 3-5 次。

6. 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 × g 离心 1 分钟。

7. 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。

8. 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。

9. 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   |

10. 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。
11. 加入 500 $\mu$ l Buffer RW1 至柱子中，放置 2 分钟，12,000  $\times$  g 离心 30~60 秒。
12. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 500 $\mu$ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中，12,000  $\times$  g 离心 30~60 秒。
13. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 500 $\mu$ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中，12,000  $\times$  g 离心 30~60 秒。
14. 倒弃流出液，把柱子装回收集管。12,000  $\times$  g 离心 2 分钟。
15. 将柱子转移至 1.5ml 离心管，加入 30~100 $\mu$ 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 $\mu$ g 时，OD260/230 一般都在 1.3-2.2；当 RNA 总量在 5~10 $\mu$ g 时，A260/230 会在 1.0~2.0；当 RNA 总量低于 3 $\mu$ g，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>10 $\mu$ 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 MDO25。MDO25 全程不使用异硫氰酸胍，所以 A260/230 的比值更高。

## 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。另外，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>柱子堵塞</b>         |  |
| RNA/阳离子复合物洗涤不干净     | 加入 RNase Free Water 至 RNA/阳离子复合物后，高速涡旋充分打散沉淀。  |
| 样品起始用量太多            | 减少样品用量。试剂盒一次最多能处理 $2.5 \times 10^7$ 白细胞。处理病人血液时，其白细胞数量会发生明显变化。血液用量必调整 2.5ml。                                 |
| 样品消化不彻底             | 加入 Buffer PXL 后，必须高速涡旋。若涡旋后仍有较大块的组织块时，延长涡旋时间或用移液枪拍打 10-15 次。延长 Proteinase K 消化时间至 10-30 分钟，让 RNA/阳离子复合物完全消化。 |
| <b>RNA 产量低</b>      |  |
| RNA 与保护剂形成的沉淀不充分    | 血液与保护液混合后，放置时间不能小于 20 分钟，否则 RNA 与保护剂形成的复合物会不充分。  |
| 低温离心                | 血液与保护液混合液须室温离心，低温离心会导致产量下降。  |
| 样品消化不彻底             | 同上   |
| Buffer RW2 没有加入乙醇稀释 | 使用前，Buffer RW2 须加入 4 倍体积的无水乙醇稀释，或按瓶子标签指示进行稀释。  |
| <b>DNA 污染</b>       |  |
| 膜上 DNase 消化         | 该产品携带的 gDNA 柱可高效地去除基因组 DNA。但对灵敏的 RT-PCR 应用，推荐另订购 DNase Column Kit 进行膜上 DNase 消化，以彻底去除基因组 DNA 的污染。            |

若以上的解答还是无法解决您的问题，请您联系我们。