

Blood RNA Extraction Mini Kit

血液 RNA 小量提取试剂盒

本产品适合于从新鲜血液样品中抽提 RNA。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	RNB431-01	RNB431-02	RNB431-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
NA Extraction Mini Columns	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
Buffer RBC	9 ml	45 ml	225 ml
ONRoI Reagent	12 ml	55 ml	255 ml
Buffer W1R	6 ml	30 ml	140 ml
Buffer W2R*	3 ml	15 ml	2 x 30 ml
RNase Free Water	1.5 ml	10 ml	50 ml

保存条件

本产品除 ONRoI Reagent 及 Buffer RBC 外，可在室温(15~25℃)保存 12 个月。

准备事项

- Buffer W2R 使用前，须按瓶子标签所示，加入无水乙醇进行稀释。
- Buffer RBC 使用前，须按瓶子标签所示，加入 9 倍体积灭菌水进行稀释(建议现配现用)。

实验步骤

方案 A: 该方案适合于从 $\leq 1.5\text{ml}$ 新鲜的人体血液样品中提取高纯度的总 RNA。

1. 在 15ml 离心管中, 加入 1 倍体积的血液($\leq 1.5\text{ml}$)和 5 倍体积 Buffer RBC(试剂按标签所示稀释使用, 建议现配现用), 颠倒混匀 5-10 次。
2. 冰上放置 10-15 分钟, 其间颠倒混匀两次。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。 4°C , $500 \times \text{g}$ 离心 10 分钟, 小心倒弃上清液。
3. 加入血液样本 2 倍体积的 Buffer RBC(试剂按标签所示稀释使用, 建议现配现用), 短暂涡旋重悬细胞。
若血液的起始用量为 1.5ml, 则需要加入 3ml Buffer RBC。
4. 4°C , $500 \times \text{g}$ 离心 10 分钟, 小心吸弃上清液。
尽量吸弃残留的溶液, 残液不能超过 $100\mu\text{l}$ 。收集的白细胞沉淀可直接保存于 -80°C 。
5. 立即加入 1ml ONRoI Reagent 至白细胞沉淀中。涡旋重悬细胞。
建议用移液枪吹打 5-10 次以匀浆样品, 有利于提高产量及稳定性。
6. 充分涡旋后转移样品至新的 2ml 离心管中, 室温静置 5-10 分钟充分裂解细胞。
7. 加入 $200\mu\text{l}$ 氯仿至裂解液中。用手剧烈振荡 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。氯仿必须按比例加入, 过多的氯仿会驱使 DNA 和蛋白质回到水相中, 导致 RNA 的纯度下降。
8. 4°C , $12,000 \times \text{g}$ 离心 15 分钟。
9. 转移最上层液体至新的离心管中, 加入等倍体积的 70% 乙醇。涡旋混匀 15 秒。转移上清过程避免转移到中间层及下层液体, 否则纯度下降。若需要提取小分子 RNA, 加入 1.5 倍体积的无水乙醇至上清中。
10. 把 NA Extraction Mini Columns 装在 2ml 收集管中。转移 $\leq 750\mu\text{l}$ 混合液至柱子中。 $12,000 \times \text{g}$ 离心 1 分钟。
11. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管中。转移剩余混合液至柱子。 $12,000 \times \text{g}$ 离心 1 分钟。
12. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管中。加入 $500\mu\text{l}$ Buffer W1R 至柱子上。 $10,000 \times \text{g}$ 离心 10 秒。
13. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管。加入 $500\mu\text{l}$ Buffer W2R(已用乙醇稀释)至柱子中, $10,000 \times \text{g}$ 离心 10 秒。
14. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管。加入 $500\mu\text{l}$ Buffer W2R(已用乙醇稀释)至柱子中, $10,000 \times \text{g}$ 离心 10 秒。
15. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管。 $13,000 \times \text{g}$ 离心 2 分钟。

16. 将柱子转移至 1.5ml 离心管。加入 30~60 μ l RNase Free Water 至柱子膜中央。室温静置 3 分钟。12,000 \times g 离心 1 分钟。
柱子最小的洗脱体积是 20 μ l，若 RNA 产量超过 30 μ g，推荐进行第二次洗脱。
17. 弃去柱子，把 RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。

方案 B：该方案适合于从 \leq 0.25ml 新鲜或冻存血液样品中提取高纯度的总 RNA。

1. 在 2ml 离心管中，加入 250 μ l 全血样品。
2. 立即加入 750 μ l ONRoI Reagent 至样品中，充分涡旋混匀 30 秒。
加入裂解液后混合液会析出大量蛋白，请充分涡旋混匀提高裂解效率。
3. 充分涡旋后转移样品至新的 2ml 离心管中，室温静置 5-10 分钟充分裂解细胞。
4. 加入 200 μ l 氯仿至裂解液中。用手剧烈振荡 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。
5. 4 $^{\circ}$ C，12,000 \times g 离心 15 分钟。
6. 转移最上层液体至新的离心管中，加入 1.5 倍体积的无水乙醇。涡旋混匀 15 秒。
7. 把 NA Extraction Micro Columns 装在 2ml 收集管中。转移 \leq 750 μ l 混合液至柱子中。12,000 \times g 离心 1 分钟。
8. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。转移剩余混合液至柱子。12,000 \times g 离心 1 分钟。
9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 500 μ l Buffer W1R 至柱子上。10,000 \times g 离心 10 秒。
10. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 500 μ l Buffer W2R(已用乙醇稀释)至柱子中，10,000 \times g 离心 10 秒。
11. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 500 μ l Buffer W2R(已用乙醇稀释)至柱子中，10,000 \times g 离心 10 秒。
12. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。13,000 \times g 离心 2 分钟。
13. 将柱子转移至 1.5ml 离心管。加入 20~60 μ l RNase Free Water 至柱子膜中央。室温静置 3 分钟。12,000 \times g 离心 1 分钟。
柱子最小的洗脱体积是 20 μ l，若 RNA 产量超过 30 μ g，推荐进行第二次洗脱。
14. 弃去柱子，把 RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。

常见问题

1. 柱子堵塞

- **样品用量太多：**加入氯仿后未充分振荡混匀。
- **离心不充分：**延长氯仿加入后的离心时间以去除高分子量杂质。

2. RNA 产量低

- **洗脱不充分：**RNase Free Water 需直接加到膜上，并静置 3 分钟后再离心，进行第二步洗脱以提高产量。
-

3. RNA 降解

- **RNase Free Water 被污染：**RNase Free Water 不含抑菌剂，室温放置或操作时可能会引入细菌或真菌污染。更换新的 RNase Free Water 或 DEPC 处理水。
- **样品贮藏问题：**反复解冻会引起 RNA 降解，确保样品解冻次数不要超过 2 次。
- **电泳原因：**常见的 RNA 降解现象都是电泳过程中引起的。更换新的 Loading Buffer 和电泳缓冲液。