



Toll-free:400-611-2007

Order:010-62617225 62979301

Email:zomanbio@126.com

Http://www.zomanbio.com



版本号:2018-06-01

血液总RNA快速提取试剂盒

Blood Total RNA Kit (离心柱型)

目录号: ZP406

试剂盒组成	ZP406-1 50次	ZP406-2 100次
10× 红细胞裂解液	60 ml	120 ml
细胞裂解液R	50 ml	100 ml
漂洗液RW(加乙醇后使用)	15 ml	2×15 ml
RNase-free ddH ₂ O	10 ml	30 ml
RNase-free 吸附柱	50 个	100 个
RNase-free收集管 (2 ml)	50 个	100 个
说明书	1 份	1 份

■ 储存条件

1. 所有的溶液应该是澄清的, 如果环境温度低时溶液可能形成沉淀, 此时不应该直接使用, 可在37°C水浴加热几分钟, 即可恢复澄清。
2. 室温下 (15°C-25°C) 运输及储存, 细胞裂解液R可以常温运输, 收到后4°C避光保存。
3. 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、PH值变化, 各溶液使用后应及时盖紧盖子。

实验室使用, 仅用于科研

北京庄盟国际生物基因科技有限公司
Beijing Zoman Biotechnology Co.,Ltd.



■ 产品介绍

改进的异硫氰酸胍/酚一步法裂解细胞和灭活RNA酶，然后总RNA在高离序盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜，再通过一系列快速的漂洗—离心的步骤，漂洗液将细胞代谢物、蛋白等杂质去除，最后低盐的RNase-free water将纯净RNA从硅基质膜上洗脱。

■ 产品特点

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口世界著名公司特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。
2. 结合了异硫氰酸胍/酚一步法，试剂稳定性好，纯度高和离心柱方便快捷的优点，不需要异丙醇沉淀和乙醇洗涤过程，RNA可以直接从离心柱上洗脱避免了过度干燥不易溶解问题。
3. 独有的R裂解液配方，可以有效的消除基因组污染。
4. 多次漂洗去蛋白过程，提取RNA纯度更高。
5. 有效的去除了5S在总RNA中含量，提高了纯度。

■ 注意事项

1. 第一次使用前请先在漂洗液RW瓶中加入指定量乙醇，加入后请及时打钩标记已加入乙醇，以免多次加入！
2. 为防止RNA降解，所有离心步骤如未加说明，均在4°C低温进行。使用转速可以达到13000rpm的冷冻离心机即可。
3. 裂解液R中含有刺激性有害化合物，操作时要戴乳胶手套，**避免沾染皮肤、眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或者生理盐水冲洗。**
4. 本试剂盒不含有实验室常用试剂氯仿，用户使用前需要自备氯仿。
5. 常规的琼脂糖凝胶电泳和变性胶电泳均可以用来分析RNA的质量。好的RNA产物在电泳后应该可以看到明显的二条优势核糖体RNA带，分别为~5kb (28S)，~2kb (18S)，条带亮度比值约为2: 1。有时候也可以看到~0.1kb和0.3kb(5S, tRNA)带。但有时候根据不同的物种如某些植物组织可以看到4, 5条带也属于正常现象，如果RNA未成熟的前体或者不均一核RNA、小核RNA提取出来也可能看到介于7kb和15kb之间的不连续的高分子量条带。
6. 检测OD₂₆₀/OD₂₈₀吸光度比值时，RNA样品应该溶于TE后检测，如果用水稀释后检测，由于一般水离子强度和PH值低，会使OD₂₈₀升高，从而使比值降低。
7. 加入裂解液R匀浆后，加氯仿前，样品可在 -60°C~-70°C 保存一个月以上。



■ 操作步骤：（实验前请先阅读注意事项）

提示：第一次使用前请先在漂洗液RW瓶中加入指定量乙醇！

1. 血液预处理：（推荐处理量为200 μ l -2ml血液）

红细胞裂解液的稀释：根据处理血液样品的体积选取适当体积的10 \times 红细胞裂解液。

例如待处理的血液样品体积为300 μ l，则取200 μ l 10 \times 红细胞裂解液，用RNase-free ddH₂O稀释至1 \times 红细胞裂解液。

(1) 向1体积人类全血中加2-3倍体积1 \times 红细胞裂解液(需自备合适的干净管子)。

注意：为获得最佳的混匀效果，血液和1 \times 红细胞裂解液的混合液体积不应超过管子体积的3/4。如果血液中的白细胞含量较高，可按比例减小血液的使用体积。

(2) 0 $^{\circ}$ C到25 $^{\circ}$ C 孵育3-10min，在孵育过程中颠倒混匀1-2次。

注意：在孵育的过程中溶液将由不透明状变成透明“红墨水样”状态，表明红细胞裂解。孵育的温度不超过25 $^{\circ}$ C即可，孵育的结果必须是由不透明状变成透明“红墨水样”状态。

(3) 4 $^{\circ}$ C 10000rpm (~11000 \times g)离心1min，将上清完全去除。

注意：哺乳动物全血的RNA在白细胞中，1ml全血离心后白细胞约2-20 μ l体积，通常灰白细胞沉淀上会残留30-50 μ l红色的粘稠的沉淀，可用200 μ l枪小心吸除；如果看不到白色细胞则倒掉上清，进入下一步骤，进一步裂解去除红细胞再清除红色粘稠沉淀。

(4) 向白细胞沉淀中加入1 \times 红细胞裂解液（加入1 \times 红细胞裂解液的体积是第1步中全血用量的2倍），涡旋振荡彻底重悬细胞；0 $^{\circ}$ C到25 $^{\circ}$ C 孵育3min。

(5) 4 $^{\circ}$ C，10000rpm (~11000 \times g)离心1min，将上清完全去除。

用200 μ l枪从沉淀的另一侧，吸去红色杂质。

(6) 加入30-50 μ l 1 \times 红细胞裂解液涡旋振荡重悬白细胞。

2. 加入1ml 细胞裂解液，涡旋振荡混匀(或吹打混匀)，放置5min。

3. 每1ml细胞裂解液R加0.2ml氯仿。盖紧样品管盖，剧烈振荡（涡旋亦可）15s将其在室温下孵育3min。

4. 于4°C 12000rpm 离心10min, 样品会分成三层: 下层有机相, 中间层和上层无色的水相, RNA存在于水相中。水相层的容量大约为所加细胞裂解液R体积的60%, 把水相转移到新管中, 进行下一步操作。

建议: ① 分层后细胞裂解液对RNA的保护作用减弱, 因此操作上快些低温更好。

② 由正中插入液面下缓慢吸取大约500 μ l上相, 避免扰动带RNase的中间层。

一般吸取大约500 μ l上相即可, 不必要尽可能多的吸取含RNA的水相。

5. 加入0.5倍体积**无水乙醇**, 颠倒混匀 (此时可能会出现沉淀)。得到的溶液和可能沉淀一起转入吸附柱中 (吸附柱套在收集管内)。

6. 12000rpm 离心45s弃掉废液, 将吸附柱重新套回收集管。

7. 加入500 μ l漂洗液RW (**请先检查是否已加入无水乙醇!**), 12000rpm 离心45s, 弃掉废液。

8. 加入500 μ l漂洗液RW, 12000rpm 离心45s, 弃掉废液。

9. 将吸附柱放回空收集管中, 13000rpm 离心2min, 尽量除去漂洗液, 以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。

10. 取出吸附柱, 放入一个RNase-free离心管中, 根据预期RNA产量在**吸附膜的中间部位**加50-80 μ l RNase-free water, 室温放置1min, 12000rpm 离心1min。例如: 300 μ l 全血样品, 40 μ l洗脱, 5-7 μ l电泳检测。

洗脱体积越大, 洗脱效率越高, 如果需要RNA浓度较高, 可以适当减少洗脱体积, 但是最小体积最好不少于30 μ l, 体积过小降低RNA洗脱效率, 减少RNA产量。



■ 问题与解决方法

问题	评论与建议
RNA产量低	<ul style="list-style-type: none">* 样品裂解或者匀浆不彻底。建议：液氮研磨的时候尽量研磨完全，加入裂解液R后剧烈震荡或者用枪头吹打帮助裂解以提高产量。新鲜组织或者植物组织可以不需液氮在干净研钵内加入适量裂解液R直接研磨。* 使用的样品或者裂解物在-20℃或者-70℃存放太久。建议：存放时间过长可能降低RNA产量，应尽快处理样品或者裂解物。* 组织本身含RNA少。建议：不同类型的组织和细胞含有不同量的RNA，对于含量少的组织应该适当提高起始处理量。* 超过了吸附柱的最大吸附能力。建议：同一个样品使用多个吸附柱，然后合并得到RNA。* 漂洗液RW内忘记加乙醇。建议：第一次实验时，漂洗液RW瓶中加入指定量无水乙醇。
OD_{260}/OD_{280} 吸光度比值<1.6	<ul style="list-style-type: none">* 分光光度计检测吸光度时，RNA样品溶于水。低离子浓度和低pH条件下，OD_{280}值会较高，造成比值低。建议：检测时用TE稀释样品。* 蛋白或者苯酚污染。建议：做步骤4吸取上清水相的时候小心不要吸收到中间相和下层有机相，确保做了步骤9。
下游的RT-PCR 实验不成功	<ul style="list-style-type: none">* 忘记做步骤9，或者将吸附柱取出时下端碰到了收集管里面的漂洗液，造成洗脱下来的RNA含有乙醇，乙醇抑制了逆转录反应。建议：确保做了步骤9，然后小心取出吸附柱，可以在空气中晾几分钟，让残留乙醇挥发。

■ 问题与解决方法

问题	评论与建议
基因组 DNA污染	<ul style="list-style-type: none"> * 起始样品量超出了裂解液R的处理范围。建议: 选择合适的起始处理量。 * 样品中含有有机溶剂(如乙醇、DMSO等), 强缓冲液或碱性溶液。建议: 避免这些可以改变裂解液R性质或者PH值的物质。 * 吸取上清时吸入了中间相。建议: 做步骤5吸取取上清水相的时候小心不要吸取到中间相。
RNA降解, 完整性不佳	<ul style="list-style-type: none"> * RNA提取所用各种物品和试剂没有灭活RNA酶。建议: 按照注意事项准备RNA提取的各种用品。 * 组织取出后没有马上处理或冷冻, 提取前已经降解。建议: 组织应该尽量立刻处理, 不能及时处理的应该尽快保存于液氮或者-70°C。 * 提取的RNA样品没有保存在-20°C或-70°C低温。建议: 尽可能的将RNA保存在-70°C的低温。 * 样品提取过程中降解。建议: 提取动作应该尽可能的快, 离心应该低温进行, 取用RNA时尽量冰上进行。