

产品组分

组分名称	组分编号	规格	保存条件
		50 RXN	
裂解液 RL3 (Buffer RL3)	RM30210	30 mL	RT
10X 红细胞裂解液 (10X Red Blood Cell Lysis Buffer)	RM30203	25 mL	RT
去蛋白液 PR2 (Buffer PR2)	RM30141	35 mL	RT
RNase-free H ₂ O	RM30142	5 mL	RT
漂洗液 WB2 (Buffer WB2)*	RM30144	12 mL	RT
RNase-free 吸附柱和收集管 (RNase-free Adsorption Column and Collection Tubes)	RM30185	50 pk	RT
1.5 mL RNase-free centrifuge Tubes	RM30202	50 pk	RT

*注: 50 RXN漂洗液Buffer WB2使用前加入48 mL无水乙醇。

产品说明

本试剂盒中的红细胞裂解液选择性裂解红细胞, 独特的裂解液/ β -巯基乙醇迅速裂解白细胞和灭活细胞 RNA 酶, 使用乙醇调节结合条件后, RNA 在高离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, 去蛋白液和漂洗液将细胞代谢物、蛋白等杂质去除, 最后低盐的 RNase-free H₂O 将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱, 提取的 RNA 可直接用于 RT-PCR、qPCR 及 RNA 建库等实验。

保存温度

本试剂盒室温储存 18 个月不影响使用效果。不适合保存在低温条件下, 容易产生沉淀进而影响实验效果, 保存和运输均可在室温进行。

注意事项

1. 本产品仅限于专业人员进行科学研究使用, 不得用于临床诊断或治疗。
2. 所有离心步骤均在室温进行, 使用转速 $\geq 13,000$ rpm (~ 14,000 x g)的离心机。
3. Buffer RL3、Buffer PR2 中含有刺激性化合物, 操作时戴乳胶手套, 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. 每次使用后应及时盖紧试剂瓶, 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化。
5. 本试剂盒可去除体系中绝大多数的 DNA 污染, 纯化获得的 RNA 通常无需使用 DNase I 处理即可用于下游实验操作。如果下游实验对痕量 DNA 十分敏感, 可以使用 DNase I 进一步清除 DNA 污染。
6. 使用本试剂盒时, 请穿戴实验服、一次性乳胶手套、一次性口罩、使用 RNase-free 耗材, 避免 RNase 污染。

操作说明

自备材料

无水乙醇、 β -巯基乙醇、RNase-free H₂O 或 DEPC 水

实验前准备

1. 第一次使用前请先在 50 RXN 漂洗液 WB2 瓶加入 48 mL 的无水乙醇!
2. 使用前需检查 Buffer RL3 是否有沉淀, 如果有沉淀, 需要在 65°C 水浴来溶解沉淀, 待溶液澄清后方可使用。

实验步骤 (请先阅读注意事项)

1. 在适合体积的 RNase free 离心管中加入 1 体积 (<1.5 mL) 各种抗凝剂新鲜血液(颠倒混匀后)和 3 体积的红细胞裂解液, 颠倒混匀, 可轻弹管壁, 确保混匀。
注: 使用前将 10X 红细胞裂解液用 DEPC 水或 RNase-free H₂O (自备) 稀释到 1X。操作前在 Buffer RL3 中加入 β -巯基乙醇至终浓度为 1%, 如 1 mL Buffer RL3 中加入 10 μ L 的 β -巯基乙醇, 此裂解液最好用现配。
2. 室温放置 10 min (期间应该颠倒轻弹混匀数次帮助裂解红细胞)。
3. 13,000 rpm (~14,000 x g) 离心 20 sec, 倒弃红色上清, 并小心的尽可能多的吸弃上清 (注意不要吸到管底的细胞团), 留下完整的管底白细胞团。
注: 离心后在管底应该见到白色的白细胞团, 也可能有一些红细胞残片和白细胞团在一起, 如果看到的是大部分的红色细胞团, 说明红细胞裂解很不充分, 应该再次加入红细胞裂解液重悬细胞团后重复步骤 2、3。尽可能地吸弃上清, 残留过多会稀释裂解液, 造成裂解结合异常, 产量纯度降低。
4. 涡旋或者轻弹管壁将白细胞沉淀完全松散重悬, 加入 350 μ L (<0.5 mL 全血) 或者 600 μ L (0.5-1.5 mL 全血) 裂解液 Buffer RL3, 吹打混匀后用手剧烈振荡 20 sec, 充分裂解。
注: 病人正常血样白细胞数量为 4000-7000 个/ μ L, 如果血样中白细胞数量可能大幅增加, 应该适当减少处理量。按照 350 μ L (<2 $\times 10^6$ 个白细胞) 或者 600 μ L (2 $\times 10^6$ -1 $\times 10^7$ 个白细胞) 比例加裂解液 Buffer RL3。
5. 用吸头吹打混匀帮助裂解或者剧烈涡旋振荡直至得到满意匀浆结果 (或者电动匀浆 30 sec), 从而剪切 DNA, 降低粘稠度和提高产量。
6. 向裂解后的溶液中加入 0.5 倍体积的无水乙醇, 此时可能出现沉淀, 但是不影响提取过程, 立即吹打混匀, 不要离心。
7. 立刻将混合物(每次小于 700 μ L, 大于 700 μ L 可以分两次加入)加入至一个 RNase-free 吸附柱 (吸附柱放入收集管中), 13,000 rpm (~14,000 x g) 离心 60 sec, **弃掉废液。**
8. 将 RNase-free 吸附柱放回收集管中, 向吸附柱中加入 700 μ L 去蛋白液 PR2, 13,000 rpm (~14,000 x g) 离心 30 sec, **倒去滤液。**
9. 将 RNase-free 吸附柱放回收集管中, 向吸附柱中加入 500 μ L 漂洗液 WB2 (**确认使用前已加入无水乙醇**), 13,000 rpm (~14,000 x g) 离心 30 sec, **倒去滤液。**
10. 重复上述步骤 9 一次。
11. 将 RNase-free 吸附柱放回收集管中, 空管 13,000 rpm (~14,000 x g) 离心 2 min, 去除残留在吸附柱中的漂洗液 WB2。
12. 取出 RNase-free 的吸附柱放至 1.5 mL RNase-free 的离心管中, 向**吸附柱的中间部位**悬空加入 30-50 μ L 的 RNase-free H₂O, 室温静置 2 min 后, 13,000 rpm (~14,000 x g) 离心 1 min, 将 RNA 洗脱下来。
注: 洗脱缓冲液体积不应少于 30 μ L, 体积过小影响回收效率。如果需要得到更大浓度的 RNA, 将离心得到的 RNA 溶液加回到吸附柱重复洗脱一遍。
13. 提取的 RNA 可直接用于下游实验或 -80°C 保存。