



北京博凌科为生物科技有限公司

Beijing BLKW Biotechnology Co., Ltd.

Tel: 010-57158602/52872342/80773165 (Fax)

[Http://www.blkwbio.com/](http://www.blkwbio.com/)

E-mail: blkwbio@blkwbio.com

- ◆ 冻存血(液体样本)总RNA提取试剂盒
 - ◆ 目录号 1123
 - ◆ 使用手册
 - ◆ 实验室使用，仅用于体外
-

冻存血(液体样本)总 RNA 提取试剂盒

目录号: 1123

目录编号	包装单位
112301	20次
112302	50次

❖ **适用范围:**

❖ 适用于快速提取全血(液体样本)高纯度总 RNA

❖ **试剂盒组成、储存、稳定性:**

试剂盒组成	保存	20 次	50 次
裂解液 RLS	4℃避光	25 ml	50 ml
去蛋白液 RE	室温	15 ml	25 ml
漂洗液 RW	室温	5 ml	10 ml
		第一次使用前按说明加指定量乙醇	
RNase-free H ₂ O	室温	10 ml	10 ml
70%乙醇	室温	4ml RNase-free H ₂ O	9ml RNase-free H ₂ O
		第一次使用前按说明加指定量乙醇	
RNase-free 吸附柱 RA	室温	20 个	50 个
收集管(2ml)	室温	20 个	50 个

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

储存事项:

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℃ 水浴加热几分钟, 即可恢复澄清。
2. 不合适的储存于低温 (4℃ 或者 -20℃) 会造成溶液沉淀, 影响使用效果, 因此运输和储存均在室温下 (15℃ - 25℃) 进行。裂解液 RLS 可以常温运输, 收到后 **4℃ 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。

❖ **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, 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 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 RLS 裂解液配方, 可直接裂解全血, 不需要先裂解去除红细胞。
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瓶和70%乙醇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. 所有离心步骤如未加说明，均在室温进行。使用转速可以达到13,000 rpm的传统台式离心机，如Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
3. 裂解液RLS和去蛋白液RE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. 考虑到环保问题，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RLS后，加氯仿前，样品可在 -60°C-70°C 保存一个月以上。
8. 关于DNA 的微量残留：

一般说来任何总 RNA 提取试剂在提取过程中无法完全避免 DNA 的微量残留，在大多数 RT-PCR 扩增过程中极其微量的 DNA 残留（一般电泳 EB 染色紫外灯下观察不可见）影响不是很大，如果要进行严格的 mRNA 表达量分析如荧光定量 PCR,我们建议在模板和引物的选择时：

-
- 
- 1) 选用跨内含子的引物,以穿过 mRNA 中的连接区,这样 DNA 就不能作为模板参与扩增反应。
 - 2) 选择基因组 DNA 和 cDNA 上扩增的产物大小不一样的引物对。
 - 3) 将 RNA 提取物用 RNase-free 的 DNase I 处理。
 - 4) 在步骤去蛋白液 RE 漂洗前,直接在吸附柱 RA 上进行 DNase I 消化处理。

❖ **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 瓶和 70%乙醇瓶中加入指定量乙醇！

1. 每0.25ml液体样品(血清，血浆，脑脊液等等)加入0.75ml 裂解液RLS，用加样枪吹打液体样品几次以帮助裂解样品中细胞。每 $5\sim 10\times 10^6$ 个细胞至少加入0.75ml 裂解液RLS。裂解液RLS 和液体样品的终体积比总是3：1。
2. 将样品剧烈震荡混匀，在15 -30 ℃条件下孵育5分钟以使核蛋白体完全分解。
3. 每0.75ml 裂解液RLS加0.2ml氯仿，剧烈振荡15秒并室温下放置2分钟。
4. 于4℃ 12, 000rpm 离心10分钟，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RLS体积的70%，把水相转移到新管中，进行下一步操作。
5. 加入1倍体积70%乙醇（请先检查是否已加入无水乙醇!），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RA中（吸附柱套在收集管内）。
6. 12, 000rpm 离心45秒，弃掉废液，将吸附柱重新套回收集管。
7. 加500 μ l 去蛋白液RE，12, 000rpm 离心45秒，弃掉废液。
8. 加入500 μ l漂洗液RW（请先检查是否已加入无水乙醇!），12,000 rpm 离心45秒，弃掉废液。
9. 加入500 μ l漂洗液RW，12,000 rpm 离心45秒，弃掉废液。
10. 将吸附柱RA放回空收集管中，13,000 rpm离心2分钟，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
11. 取出吸附柱RA，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30-50 μ l RNase free water（事先在 65-70℃水浴中加热效果更好），室温放置2分钟， 12,000 rpm 离心1分钟。如果需要较多RNA，可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，离心1分钟,或者另外再加30 μ l RNase free water，离心1分钟，

合并两次洗脱液。

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。