

## SafPure Blood RNA Kit

### 血液 RNA 保存和提取试剂盒

SafPure Blood RNA Kit 是专门为血液 RNA 保存和提取设计的。1-2.5ml 新鲜血液样品与 RNASafer LS Reagent 混匀后，可直接操作，也可以在低温下保存。经 RNASafer LS Reagent 处理后，大体积的血液 RNA 经离心收集后，可以用小量的提取试剂盒进行简单的操作。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	R4211-01	R4211-02
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
RNASafer LS Reagent	110 ml	550 ml
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：2023-06-09

### 保存条件

SafPure 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 Proteinae 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. 在 10~15ml 离心管中，加入 4 倍体积 RNASafer LS Reagent, 然后加入 1 倍体积新鲜抗凝血液，颠倒混匀 10~15 次，室温放置 30~60 分钟，其间颠倒混匀 2~3 次。裂解后混合液可室温(15-25°C)保存 2 天，2-8°C 保存 7 天，或-20°C/-80°C 保存 12 个月以上，RNA 不会降解。

受提取试剂盒中柱子吸附力限制，健康人体血液最大处理量不要超过 2.5ml。由于血液 RNA 含量比较低，建议最低不低于 1ml，以获得充足 RNA 用于下游检测。处理其它哺乳动物血液时，因白细胞含量较高，血液用量建议在 1-1.5ml。鸟类等红细胞带核的血液 (~100ul)，用灭菌水先稀释 10 倍后再加入 RNASafer Ls Reagent。

处理冻存血液：若冻存血液只有 1-3ml 时(目测)，在血液解冻前，直接加入 3-4 倍的 RNASafer Ls Reagent，室温颠倒混匀直接样品完全解冻。提前加入 RNASafer LS Reagent 可以防止血液在解冻过程中因细胞破解时产生的 RNA 降解。

2. 取出保存样品，室温静置 2 小时恢复至室温(室温保存样品无需静置)。室温下，3,000-5,000 x 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，短暂离心后用移液枪吸尽所有的残液。残液超过 50 $\mu$ l 时会明显影响 RNA 产量。

3. 加入 700 $\mu$ l Buffer PXL 和 20 $\mu$ l Proteinase K 至样品中，涡旋重悬沉淀，55°C 振荡温育 15 分钟。12,000~15,000 x g 离心 3 分钟去除未消化的杂质。

若第 2 步残液充分去除后，这一步可以不需要离心。

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 x g 离心 1 分钟。

5. 弃去 gDNA 过滤柱子。加入 400 $\mu$ l 无水乙醇至滤液中，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  $\times$  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  $\times$  g 离心 1 分钟。
8. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。加入 500 $\mu$ l Buffer RW1 至柱子上。12,000  $\times$  g 离心 1 分钟，丢弃收集管和滤液。
9. 把柱子装在新的收集管中。按下表配制 DNase I 反应液，轻轻混匀，把 DNase 反应液加到 RNA Mini Column 的膜中央，室温静置 10 分钟。

成分	用量
DNase Buffer	70 $\mu$ l
DNase I(20Units/ $\mu$ l)	10 $\mu$ l

10. 加入 500 $\mu$ l Buffer RW1 至柱子中，室温静置 3 分钟。12,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
11. 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)至柱中，12,000  $\times$  g 离心 1 分钟。  
Buffer RW2 在使用之前，必须按说明书或瓶子标签所示用无水乙醇进行稀释。
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)至柱中，12,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
13. 倒弃流出液，把柱子装回收集管。12,000  $\times$  g 离心 3 分钟甩干柱子。
14. 将柱子转移至 1.5ml 离心管，加入 30~50 $\mu$ l RNase Free Water 至柱子膜中央。静置 3 分钟。12,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
15. 把 RNA 保存于-20 $^{\circ}$ C 和-80 $^{\circ}$ C。

## 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。