

血液（液体样本）总 RNA 提取试剂盒（离心柱型）

货号： NG302S 50 次
NG302M 100 次

试剂盒组成	保存	50 次	100 次
裂解液 RLS	4℃避光	50 ml	100 ml
去蛋白液 RE	室温	25 ml	50 ml
漂洗液 RW	室温	10 ml	25 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	20 ml
70%乙醇	室温	9 ml	18 ml
		第一次使用前按说明加指定量乙醇	
RNase-free 吸附柱 RA	室温	50 个	100 个
收集管（2ml）	室温	50 个	100 个

储存事项：

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。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。

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 在高离子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特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。
- 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。多次漂洗去蛋白过程，提取 RNA 纯度更高。
- 4.有效的去除了 5S 在总 RNA 中含量，提高了纯度。

注意事项：

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！所有离心步骤如未加说明，均在室温进行。离心机转速需达到13,000 rpm。

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。

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。

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。

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。

加入裂解液RLS后，加氯仿前，样品可在 -60℃-70℃ 保存一个月以上。

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, 我们建议在进行模板和引物的选择时：

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。

选择基因组 DNA 和 cDNA 上扩增的产物大小不一样的引物对。

将 RNA 提取物用 RNase-free 的 DNase I 处理。

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0.25 ml 液体样品(血清, 血浆, 脑脊液等等)加入0.75 ml 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0.75 ml 裂解液RLS。裂解液RLS 和液体样品的终体积比总是3:1。将样品剧烈震荡混匀, 在 $15\sim 30^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育5 min 以使核蛋白体完全分解。
2. 每0.75 ml 裂解液RLS加0.2 ml 氯仿, 剧烈振荡15 sec 并室温下放置2 min。于 4°C 12,000 rpm 离心10 min, 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。
3. 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)。
4. 12000 rpm 离心45 sec, 弃掉废液, 将吸附柱重新套回收集管。
5. 加500 μl 去蛋白液RE, 12000 rpm 离心45 sec, 弃掉废液。
6. 加入500 μl 漂洗液RW(请先检查是否已加入无水乙醇!), 12000 rpm 离心45 sec, 弃掉废液。
7. 加入500 μl 漂洗液RW, 12,000 rpm 离心45 sec, 弃掉废液。将吸附柱RA放回空收集管中, 13,000 rpm离心2 min, 尽量除去漂洗液, 以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
8. 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 μl RNase free water (事先在 $65\sim 70^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热效果更好), 室温放置2 min, 12000 rpm 离心1 min。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 μl RNase free water, 离心1 min, 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 μl , 体积过小降低 RNA 洗脱效率, 减少 RNA 产量。