



产品简介

本试剂盒采用具有独特分离作用的超顺磁珠和独特的缓冲液系统，从血液中分离纯化高质量总RNA。样品中的核酸在裂解液作用下被释放出来，在裂解液的存在下，释放出来的核酸特异性的结合在特殊包被的超顺磁珠上，在外加磁场的吸附下，轻松完成对核酸的吸附固定，通过几次的洗涤过程将污染物除去，最后在RNA洗脱液的作用下核酸从磁珠上洗脱下来，同时DNA被DNase I消化，纯化后得到总RNA。整个过程不带来抑制物，不需要离心，高质、便捷、快速，提取的RNA得率高，纯度高，质量稳定可靠，尤其适合高通量工作站的自动化提取。

使用本试剂盒纯化的RNA可适用于各种常规操作，包括测序、酶切、RT-PCR、文库构建等实验。

试剂盒组成

产品组成	24rxns	48 rxns	96 rxns
10× 红细胞裂解液	8mL	15mL	30mL
Buffer BRL	10mL	20mL	40mL
磁珠悬浮液 (MB)	0.8mL	1.5mL	3mL
Buffer BRW 0	30mL	60mL	120mL
Buffer BRW I	12mL	25mL	50mL
DNase I 缓冲液	0.9mL	1.8 mL	3.6mL
DNase I	0.8mL	1.5mL	3mL
洗脱液 (EB)	75mL	150 mL	300 mL
β-巯基乙醇	0.2mL	0.4mL	0.8mL

保存条件

DNase I、DNase I 缓冲液：-20℃；

磁珠悬浮液：4℃；其它组分：室温，可稳定保存12 个月

适用范围

脊髓液/全血：20 μL-2mL；

注意事项

- ◆ 样品应避免反复冻融，否则会导致提取的RNA降解且提取量也下降；
- ◆ 需要自备材料：无水乙醇、PBS缓冲液、磁铁或磁架、无RNase离心管；
- ◆ 整个过程请勿离心，以免磁珠不可逆聚集而影响提取效果。
- ◆ 已加入抗凝剂的血液样品可在2-8℃储存不超过3天（推荐使用EDTA作为抗凝剂），长期贮存请置于-70℃；
- ◆ 全程使用无RNase的塑料制品和枪头，操作人员戴一次性口罩和手套，实验过程中要勤换手套；
- ◆ 玻璃器皿应在使用前于180℃高温下干烤4小时，塑料器皿可在0.5 M NaOH中浸泡10分钟，用水彻底冲洗后高压灭菌



实验准备

- ◆ 磁珠使用前一定要充分混匀；
- ◆ 37℃加热源；
- ◆ Buffer BRL在使用前应加入2%的β-巯基乙醇（例如单个反应400 μl Buffer BRL，应加入8ulβ-巯基乙醇，充分混匀备用），且现配现用。
- ◆ 配制Buffer BRW I：Buffer BRW I 使用前加入相应体积的无水乙醇；
- ◆ 配制1×红细胞裂解液：10×红细胞裂解液需用洗脱液(EB)稀释成1×红细胞裂解液，且需现配现用。
- ◆ 配制DNase I 反应液：对于单个样品，取10 μl洗脱液(EB)，向其中加入35 μl DNase I缓冲液和30 μl DNase I，最终配置成终体积为75 μL的反应液(置于4℃备用)，按照样品的数量按比例放大。
- ◆ 冻存血液应在室温或37℃缓慢解冻，不可高温加热，以免血凝成块；将冻存的血液置于37℃摇床150-200 rpm融化，效果最佳；也可提前一天放在4℃解冻；新鲜和融化的冻存血液2500g离心5分钟后，沉淀备用；

操作步骤

1. 样本前处理：

A、血液体积小于200 μl，可直接跳至步骤2进行提取

B、血液体积大于200 μl，在血液中加入3倍体积的1×红细胞裂解液，颠倒混匀6-8次，室温放置10 min，期间不时颠倒轻弹混匀数次，500g离心3 min,倒弃红色上清,并小心的尽可能多的吸弃上清，不要吸走底部沉淀（沉淀有点呈红色），留下完整的管底白细胞团；

2. 裂解结合：在100-200 μL血液或细胞沉淀中，加入400 μL Buffer BRL重悬细胞、400 μl异丙醇和30 μl磁珠，颠倒混匀，室温放置10分钟（期间不时颠倒混匀，重悬磁珠），将离心管放置于磁力架上，待磁珠完全吸附后吸弃液体。；

注意：如果改变样品使用量，裂解液、磁珠悬浮液和异丙醇醇的使用量也需要按比例做相应的调整。

4. 漂洗：

(1)将离心管从磁力架上取下，向离心管中加入500 μl Buffer BRW 0, 轻微振荡混匀（或用移液器吹打混匀），重悬磁珠，将离心管放置于磁力架上，待磁珠完全吸附后吸弃液体；

(2)向离心管中加入500 μl Buffer BRW I, 轻微振荡混匀（或用移液器吹打混匀），重悬磁珠，将离心管放置于磁力架上，待磁珠完全吸附后吸弃液体, 重复上述洗涤步骤1次，第二次洗涤待磁珠完全吸附后充分吸弃液体（不要有残留），室温晾干5-10min。

注意：要将上清尽量弃净，乙醇晾干，以免影响DNase I消化效果



5. DNA消化：将离心管从磁力架上取下，向离心管中加入75 μ l DNase I 反应液，移液器吹打重悬磁珠，37℃ 孵育15分钟，每隔5分钟轻弹管底悬浮磁珠，以防磁珠成团。

6. 漂洗：

(1)将离心管从37℃加热器上离开，加入700 μ l Buffer BRW 0，移液器吹打重悬磁珠，室温颠倒混匀5分钟，将离心管放置于磁力架上，待磁珠完全吸附后吸弃液体；

(2)加500 μ l Buffer BRW I, 轻微振荡混匀（或用移液器吹打混匀），将离心管放置于磁力架上，待磁珠完全吸附后吸弃液体；

(3)再次加入500 μ l Buffer BRW I，轻微振荡混匀（或用移液器吹打混匀），请注意将磁珠聚集在管底，待磁珠完全吸附后吸弃液体，室温晾干2min。

8. 洗脱： 将离心管从磁力架上取下，向离心管中加入50-100 μ l 洗脱液 EB，56℃孵育5分钟，将离心管重新放置于磁力架上，待磁珠完全吸附后小心将总RNA溶液转移至新的离心管，放入-80℃保存备用。

纯度效果评价

通过测定洗脱液中RNA的A260来确定RNA产量，通常情况下A260值在0.1~1.0之间数据比较可信。如果不在此范围内，请稀释或浓缩样品调整；通过测定洗脱液中RNA的A280和A230来确定RNA纯度，A260/A280比值在1.8-2.0之间，小于1.8表示可能有蛋白质污染，A260/A230应该大于2.0，太小表示有盐离子残留。

操作简图

血液>200ul



裂解红细胞，收集白细胞

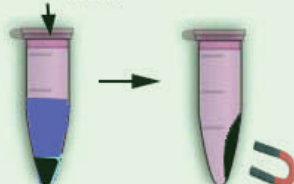
血液≤200 μl



样品



400ul Buffer BRL
400ul 异丙醇
30ul 磁珠



裂解、结合：加入相应体积的Buffer BRL、异丙醇和磁珠，颠倒混匀，室温放置10min（期间不时颠倒混匀磁珠）；于磁力架上吸弃上清。



500ul BRW 0



洗涤I：加入500 μl buffer BRW 0，**吹散磁珠**，再次置于磁力架上，吸弃上清。



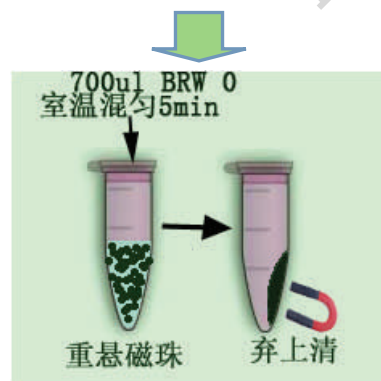
500ul BRW I



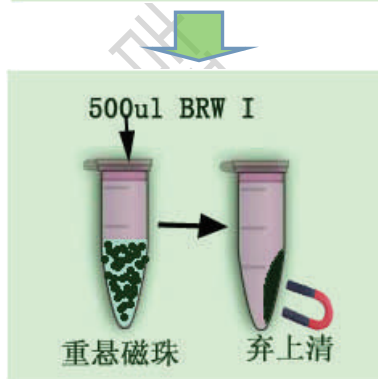
洗涤II：于磁力架上吸弃上清，加入500 μl buffer BRW I，**吹散磁珠**，再次置于磁力架上，吸弃上清，**重复该步骤一次**，室温晾干5-10min。。



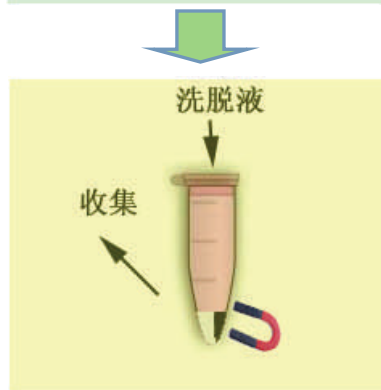
消化DNA：加入相应体积的的DNase I 消化液，吹散磁珠，37℃放置15min，期间不时轻弹混匀磁珠。



再次结合：加入相应体积的Buffer BRW 0，颠倒混匀5min，于磁力架上吸弃上清。



洗涤III：加入500 μl buffer BRW I，吹散磁珠，再次置于磁力架上，吸弃上清，重复该步骤一次，室温晾干2min。



洗脱：加入50-100 μl Buffer EB，尽量吹散磁珠，室温放置5min，吸上清到干净离心管中保存。