

M5 Blood RNA Mini Kit 超纯全血总 RNA

快速提取试剂盒使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 Blood RNA Mini Kit	50T	MF155-01

【储存条件】

1. 所有溶液应该是澄清，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，在 37°C 水浴加热几分钟恢复澄清。
2. 储存于低温（4°C 或者 -20°C）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°C-25°C）进行。裂解液 RL 可以常温运输，收到后 4°C 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。

【产品简介】

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。

【产品特色】

1. 离心吸附柱内硅基质膜为特制吸附膜，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 RL 裂解液配方，可以有效的消除基因组污染。
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。

【产品组份】

	50T	注意事项
10x 红细胞裂解液 RLB	25ml	室温干燥保存
裂解液 RL	50 ml	4°C 避光 ，干燥保存
去蛋白液 RE	25 ml	室温密闭干燥保存
漂洗液 RW	10ml	初次使用前请按瓶标说明加入指定量的无水乙醇
RNase-Free H ₂ O	10ml	室温密闭保存
70%乙醇	9ml RNase-free H ₂ O	初次使用前按说明加指定量乙醇
RNase-Free 吸附柱套管(RA)	50 个	室温密闭干燥保存

【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 RL 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. **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 RL 匀浆后，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,我们建议在选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 漂洗后，直接在吸附柱 RA 上进行 DNase I 消化处理。

【操作步骤】

<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! >

<使用前将 10x 红细胞裂解液 RLB 用 DEPC 处理水稀释到 1x。 >

1. 在适合大小的 RNase free 离心管中加入 1 体积(0.5-1.0ml)加入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 RLB, 颠倒混匀,可轻弹管壁,确保混匀。

病人血样中白细胞数量可能大幅增加或者减少，应该适当增加或者减少处理量。

2. 室温放置 10 分钟（期间应该颠倒轻弹混匀数次帮助裂解红细胞）。

如果 RNA 降解严重,可在冰上裂解,但是时间可长一些以充分裂解。

3. 12,000 rpm 离心 20 秒，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。

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，但是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，应该再加入红细胞裂解液重悬细胞团后重复步骤 2, 3。上清尽可能的吸弃,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 1ml 的 RL，用移液枪反复吹打来裂解细胞。
5. 将匀浆样品剧烈震荡混匀，在 15 -30°C 条件下孵育 5 分钟以使核蛋白体完全分解。

6. 每 1ml RL 加 0.2ml 氯仿。盖紧样品管盖，剧烈振荡 15 秒并室温下放置 2 分钟。
7. 于 4°C 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 RL 体积的 60%，把水相转移到新管中，进行下一步操作。
8. 加入等体积 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，若一次不能将全部溶液和混合物加入吸附柱 RA 中，请分两次转入吸附柱 RA 中。）
9. 12,000rpm 离心 45 秒，弃掉废液，将吸附柱重新套回收集管。
10. 加 500 μ l 去蛋白液 RE，12,000rpm 离心 45 秒，弃掉废液。
11. 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。
12. 加入 500 μ l 漂洗液 RW，12,000 rpm 离心 45 秒，弃掉废液。
13. 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。
14. 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 50-80 μ l RNase free water（事先在 65-70°C 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。



【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。