

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°C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°C 水浴加热几分钟，即可恢复澄清。不合适的储存于低温（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 RLS 可以常温运输，收到后 4°C 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，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°C - 70°C 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，12000 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 ，体积小降低 RNA 洗脱效率，减少 RNA 产量。