

目 录

简介	2
原理	2
试剂盒组成	3
保质期	4
准备工作	5
血液样品的保存	6
方案 1:血液总 RNA 小量抽提	5
方案 2:血液总 RNA 中量抽提	7
常见问题回答	13

版本: 2018-04

简介

HiPure Blood RNA Kits 是从新鲜血液或冻藏血液样品中抽提 RNA 最为简单可靠的方法。试剂盒基于硅胶柱纯化技术，提取过程无需进行耗时的醇类沉淀，整个提取过程只需 40 分钟。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。该系列产品提供了 3 种规格以满足不同的需求。

参数	Mini Kit	Midi Kit	Mini Kit
产品编号	R4161	R4162	R4163
样品的类型	人体新鲜或冻藏的血液 哺乳动物血液(猪, 牛, 狗, 猴等)		哺乳类, 鸟类, 鱼类等血液, 分泌物等液体样品; 长时间 冻藏保存的血液
用量	≤1.5 ml 全血	≤10 ml 全血	≤0.25 ml 液体样品
处理方法	分离得到白细胞后再进行操作		无需分离白细胞, 直接裂解
结合力	50µg	1mg	50µg
洗脱体积(µl)	15-50	150-300	15-30

原理

HiPure 硅胶柱以高结合力的玻璃纤维滤膜为基质。滤膜在高浓度离子化剂条件下，可通过氢键和静电等物理作用吸附核酸，而蛋白质和其它杂质则不被吸附而去除。吸附了核酸的滤膜经洗涤去除残留的蛋白质和盐，最后可以用低盐缓冲液(如 Buffer TE)或水洗脱出核酸。得到的核酸纯度高，可直接用于各种下游实验。DNA 过滤柱采用特殊的吸附膜，能高效选择性地吸附基因组 DNA，而不吸附 RNA。DNA 过滤柱可高效地去除基因组 DNA，减少 DNA 污染。HiPure Blood RNA Kits 基于硅胶柱纯化方式。试剂盒先选择性裂解去除红细胞，离心收集白细胞后，在含高浓度异硫氰酸胍裂解液中匀浆裂解，RNA 释放到裂解液中。裂解液中含有高浓度异硫氰酸胍，可快速失活内源性或外源性的 RNASE，RNA 被保护。裂解液经 gDNA 柱过滤去除基因组 DNA；滤液中加入乙醇调节结合条件，混合液转移至柱子中过滤，RNA 被吸附上柱子的膜上，而基因组 DNA 和蛋白质则不被吸附而去除。柱子经 Buffer RM1 洗涤蛋白质和其它杂质，可插入式的 DNASE 膜上消化去除残留的 DNA，经 Buffer RW2 洗涤去除盐分，最后 RNA 被 RNASE-Free Water 洗脱。

组 成

HiPure Blood RNA Mini Kit

产品编号	R4161-01	R4161-02	R4161-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns I	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
10 x RBC Lysis Buffer	10 ml	50 ml	250 ml
MagZol Reagent	12 ml	60 ml	270 ml
Buffer BCP	1 ml	7 ml	30 ml
Buffer RW2*	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
RNase Free Water	1.8 ml	10 ml	30 ml
说明书	1	1	1

HiPure Blood RNA Midi Kit

产品编号	R4162-01	R4162-02	R4162-03
纯化次数	2 次	10 次	50 次
HiPure RNA Midi Columns I	2	10	50
1.5ml Collection Tubes	2	10	50
10 x RBC Lysis Buffer	20 ml	100 ml	500 ml
MagZol Reagent	20 ml	90 ml	450 ml
Buffer BCP	1 ml	10 ml	50 ml
Buffer RW2*	5 ml	20 ml	50 ml
RNase Free Water	1.8 ml	10 ml	30 ml
说明书	1	1	1

保质期

HiPure Blood RNA Kits 除 MagZol Reagent 和 Buffer BCP 外，其它组分可在常温下 (15-25°C) 干燥保存 18 个月。MagZol Reagent 和 Buffer BCP 采用室温运输，收到产品后，请保存于 2-8°C。

血液的收集，保存及用量

血液最好采用 EDTA 进行抗凝，其它抗凝剂如 ACD, CPDA 和肝素也可使用。由于肝素对 DNA 聚合酶有抑制作用，需尽量避免。血液收集后最好保存在 2-8°C。血液中 mRNA 分子有不同的半衰期，约为 0.5 小时至 12 小时。用于调节基因表达的 mRNA 分子的半衰期会比看家基因的 mRNA 分子的半衰期短很多。若 mRNA 完整性非常关键，血液样品在 2-8°C 放置时间不要超过 2 小时。血液在冻藏/解冻过程中会引起细胞破裂，最好避免冻藏。

若血液无法在短时间内进行操作，可按如下方式进行保存：

- **分离白细胞：**按方案 1 或方案 2 进行操作，分离出白细胞。得到的白细胞可直接保存于 -80°C。
- **RNA Safer LS Reagent：**将 1 倍体积抗凝血液和 3 倍 RNA Safer LS Reagent 颠倒混合。该混合液可在 2-8°C 保存 1 周，-20°C/-80°C 长期保存。

每微升健康人体血液中含有 4000-7000 个白细胞，1ml 健康人体血液则含有 $4-7 \times 10^6$ 个白细胞。病人血液中白细胞含量可能会升高，此时减少血液用量以确保白细胞用量不超过 1×10^7 (Mini Kit) / 1×10^8 (Midi Kit)。血液用量过多会导致柱子堵塞，RNA 的纯度下降。

方案 1. 血液总 RNA 小量抽提 (R4161)

该方案适合于从 $\leq 1.5\text{ml}$ 新鲜的人体血液样品中提取高纯度的总 RNA。该方案也适合部分哺乳类动物的血液总 RNA 的抽提。由于 RBC Lysis Buffer 是专门为人体血液而设计的红细胞裂解液，处理其它哺乳类动物时，RBC Lysis Buffer 可能需要优化。

需要准备材料和工具

- 氯仿
- 灭菌水
- 无水乙醇(96-100%)
- 按瓶子标签所示，加入适量的无水乙醇稀释 Buffer RW2，并于室温保存。
- 10 x RBC Lysis Buffer 使用前用灭菌水稀释至 1 x，并装在合适的瓶子中。

白细胞的分离与保存

1. 在 15ml 离心管中，加入 1 倍体积的血液($\leq 1.5\text{ml}$)和 5 倍体积 1x RBC Lysis Buffer，颠倒混匀 5-10 次。
试剂盒提供 10 x RBC Lysis Buffer，使用前须用灭菌水稀释至 1 x。病人血液的白细胞可能会上升，需调整血液用量，以确保白细胞数量不超过 1×10^7 。举例，1.5 ml 的血液，需加入 7.5 ml 1 x RBC Lysis Buffer。
2. 冰上放置 10-15 分钟，其间颠倒混匀两次。在放置过程中，血液会从雾状变成透亮的溶液。透亮的溶液就表明了红细胞已裂解。处理病人的血液时，有可能需要延长至 20 分钟。
3. 4℃，500 x g 离心 10 分钟，小心倒弃上清液。
4. 加入 2 倍体积 1 x RBC Lysis Buffer，短暂涡旋重悬细胞。
若血液的起始用量为 1.5ml，则需要加入 3ml 1 x RBC Lysis Buffer。
5. 4℃，500 x g 离心 10 分钟，小心吸弃上清液。
尽量吸弃残留的溶液，残液不能超过 100 μl 。收集的白细胞沉淀可直接保存于-80℃。

白细胞裂解和抽提

6. 涡旋 10 秒或剧烈弹打松散白细胞沉淀。立即加入 1ml MagZol Reagent 至白细胞沉淀中。涡旋重悬细胞。

可选，用注射器或移液枪抽打 5-10 次以匀浆样品，有利于提高产量或稳定性。

7. 室温静置 5-10 分钟充分裂解细胞。
8. **加入 200 μ l 氯仿或 100 μ l Buffer BCP 至裂解液中。**用手剧烈振荡 15 秒；室温放置 3 分钟。
用涡旋取代振荡会带来更多的基因组 DNA 污染。氯仿必须按比例加入，过多的氯仿会迫使 DNA 和蛋白质回到水相中，导致 RNA 的纯度下降。由于氯仿挥发性强，毒性较大，可用 100 μ l BCP(1-Bromo-2 chloropropane)代替。
9. 4 $^{\circ}$ C，12,000 \times g 离心 15 分钟。
离心后会形成三相体系。上层为水相层含有 RNA，而 DNA 和蛋白质位于有机层(下层)和中间层。中间层的多少取决于样本类型，有些样品的中间层非常少。
10. 转移上清至新的离心管中。**加入等倍体积的 Buffer RW2。**涡旋混匀 15 秒。
若需要提取小分子 RNA，加入 1.5 倍体积的无水乙醇至上清中。

过柱纯化 RNA(以下离心均在室温下进行!)

11. 把 HiPure RNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。**转移一半体积的混合液至柱子中。**8,000 \times g 离心 30 秒。
12. 倒弃滤液把柱子装回收集管。转移剩余混合液至柱子中。8,000 \times g 离心 30 秒。
若需彻底去除 DNA，建议订购 (R4911) DNase on Column Kit 进行膜上 DNase 消化。
13. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。**加入 600 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。**8,000 \times g 离心 30 秒。
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。若需彻底去除盐离子污染,可重复第 13 步洗涤柱子一次。
14. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。13,000 \times g 离心空柱 3 分钟甩干柱子的基质。
15. 将柱子转移至 1.5ml 离心管中。**加入 15-30 μ l RNase Free Water 至柱子的膜中央。**室温静置 2 分钟。13,000 \times g 离心 1 分钟。
HiPure RNA Mini Column I 最小的洗脱体积是 10 μ l，小于 10 μ l 会导致 RNA 的洗脱效率下降。若 RNA 产量超过 10 μ g，推荐按进行第二次洗脱以获得更高产量。
16. 丢弃 RNA 柱子，把 RNA 样品保存-80 $^{\circ}$ C。

方案 2. 血液总 RNA 中量抽提(R4162)

该方案适合于从 $\leq 10\text{ml}$ 新鲜的人体血液样品中提取高纯度的总 RNA。该方案也适合部分哺乳类动物的大体积血液总 RNA 的抽提。由于 RBC lysis Buffer 是专门为人血液而设计的红细胞裂解液，处理其它哺乳类血液时，RBC lysis Buffer 可能需要优化。

需要准备材料和工具

- 氯仿
- 灭菌水
- 无水乙醇(96-100%)
- 按瓶子标签所示，加入适量的无水乙醇稀释 Buffer RW2，并于室温保存。
- 10 x RBC lysis Buffer 使用前用灭菌水稀释至 1 x，并装在合适的瓶子中。

白细胞的分离与保存

1. 在 50ml 离心管中，加入 1 倍体积的血液($\leq 10\text{ml}$)和 3 倍体积 1x RBC lysis Buffer，颠倒混匀 5-10 次。
试剂盒提供 10 x RBC lysis Buffer，使用前须用灭菌水稀释至 1 x。若血液中白细胞有上升，需减少血液用量，以确保白细胞用量不超过 1×10^8 。举例来说，10ml 的血液，需加入 30ml 1 x RBC lysis Buffer。
2. 冰上放置 10 分钟，其间颠倒混匀两次；在放置过程中，血液会从雾状变成透亮的溶液。透亮的溶液就表明了红细胞已裂解。处理病人的血液时，有可能需要延长至 20 分钟。
3. 4°C ， $2000 \times g$ 离心 5 分钟，小心倒弃上清液。
4. 再加入 2 倍体积 1 x RBC lysis Buffer，短暂涡旋重悬细胞。
若血液的起始用量为 10ml，则需要加入 20ml 1 x RBC lysis Buffer。
5. 4°C ， $2000 \times g$ 离心 5 分钟。小心倒弃上清液，余下 $\sim 200\mu\text{l}$ 残液和细胞沉淀。
收集的白细胞沉淀可直接保存于 -80°C 。

白细胞裂解和抽提

6. 剧烈涡旋打散白细胞沉淀，加入 8ml MagZol Reagent 至白细胞重悬液中，涡旋混 15 秒。

7. 用匀浆器或注射器抽打裂解液 5~10 次，然后把样品转移到高速离心管中。
8. **加入 1.6ml 氯仿或 0.8ml Buffer BCP 至裂解液中盖紧盖子。**用手剧烈振荡 15 秒，冰上放置 10 分钟。
9. 4°C, 12,000 × g 离心 15 分钟。
离心后会形成三相体系。上层为水相层含有 RNA，而 DNA 和蛋白质位于有机层(下层)和中间层。中间层的多少取决于样本类型，有些样品的中间层非常少。
10. 转移上清液至新的离心管中。**加入 0.5 倍(或 1.5 倍)体积的无水乙醇，涡旋混匀 15 秒。**
转移上清液时，必须小心转移，不要吸到中间层。推荐只转移~80%的上清液。若需要提取小分子 RNA，加入 1.5 倍体积的无水乙醇。

以下离心条件均在室温下进行(15-25°C)!

11. 把 HiPure RNA Midi Column I 装在 15ml 收集管中。**转移 ≤4ml 混合液至柱子中。**3,000rpm 离心 3 分钟。
12. 倒弃滤液把柱子装回收集管。转移剩余混合液至柱子中。3,000rpm 离心 3 分钟。
13. (可选)参照第 14 页进行膜上 DNASE 消化以彻底去除 DNA 污染。
14. 倒弃滤液把柱子装回收集管。**加入 3ml Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。**3,000rpm 离心 3 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。
15. 倒弃滤液把柱子装回收集管。5,000rpm 离心 15 分钟以甩干柱子的基质。
16. 取出柱子，室温放置 10 分钟进一步干燥柱子。
17. 将柱子转移至新的 15ml 离心管中。**加入 100µl RNase Free Water 至柱子的膜中央。**室温放置 3 分钟。5,000 rpm 离心 5 分钟。
18. **再加入 100µl RNase Free Water 至柱子的膜中央。**室温放置 3 分钟。5,000rpm 离心 5 分钟。
19. 丢弃 RNA 结合柱，把 RNA 保存于-80°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。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
红细胞裂解不充分	
第一次裂解时，溶液显雾状，不透亮	处理病人血液时，冰上放置时间可延长至 20 分钟，让红细胞充分裂解。
得到的白细胞沉淀团是红色的	白细胞沉淀团应该是白色的，还含有残留的微量红细胞。若红细胞裂解不充分，离心后得到的沉淀团会很大或看不到白色的白细胞沉淀团。遇到这种情况，再加入 2 倍 RBC Lysis Buffer 时，涡旋重悬后冰上放置 5-10 分钟。
裂解液非常粘稠	用注射器抽打 5-10 次打断基因组 DNA，降低溶液的粘稠度。
离心后分层现象不明显	
没有加入氯仿或氯仿不纯	确保加入氯仿，氯仿不要含有异戊醇或其它添加成分。
加入氯仿后混匀效果不好	加入氯仿后，一定要用手剧烈振荡混匀 15 秒。缓慢颠倒或涡旋会导致分层不明显或杂质的污染。如果离心后分层不明显，再剧烈混匀 15 秒后离心。
样品中含有有机溶剂	若样品含有有机溶剂如 DMSO，乙醇，强碱试剂，会影响分层。
柱子堵塞	
样品起始用量太多	减少样品用量。正确的样品用量是获得理想结果的必要条件。
低温离心	试剂盒中除特别指明，所有的离心操作都必须在室温（20-25℃）。离心条件低于 20℃ 时，可能会导致沉淀的形成而引起柱子堵塞。设定离心机的温度为（20-25℃）。
RNA 产量低	
样品匀浆不充分	处理培养细胞时，用注射器抽打裂解液 3-5 次进行匀浆。 处理动物组织时，推荐使用机器匀浆器匀浆。
样品起始用量太多	参照上面

RNA 的洗脱效率低 RNase Free Water 没有加到膜上，或洗脱体积不够。再加入 30-50 μ l RNase Free Water 到膜上，室温静置 2 分钟，然后离心洗脱 RNA。

培养液没有彻底去除

从细胞中提取 RNA 时，要把培养液彻底吸弃。

Buffer RW2 没有加入乙醇稀释

使用前，Buffer RWC/RW2 必须加入无水乙醇进行稀释

70%乙醇加入体积不准确

测量上清液的体积，加入等倍体积的 70%乙醇。处理肝脏和脾脏样品时，用 50%乙醇代替 70%乙醇有利于提高产量。

RNA 降解

组织/细胞用量太多

减少样品用量。正确的样品用量是获得理想结果的必要条件。

RNA 酶污染

操作过程引入 RNA 酶的污染。

DNA 污染

没有进行 DNase I 消化

不要省略 DNase I 膜上消化步骤，确保 DNase I 消化液全部加到膜中央。

氯仿抽提振荡不够

加入氯仿后，盖紧盖子。然后用手剧烈上下振荡 15 秒。不要用涡旋或颠倒混匀。

下游实验结果不理想

盐分污染

加入 Buffer RW2 后，静置 5 分钟后，再离心。

乙醇污染

确保空柱离心速度高于或等于 10,000 \times g，离心时间为 2 分钟。

膜材料脱落

硅胶膜在离心过程中可能会发生脱落。脱落到质粒中硅胶膜是不溶解的，可能过 12,000 \times g 离心 2 分钟去除。

OD260/OD230 比值不正常

增加多一次 Buffer RW2 洗涤

增加多一次 Buffer RW2 洗涤

若以上的解答还是无法解决您的问题，请您联系我们。

Note: