****

**血液RNA小提试剂盒简明说明书（R6411）**

**产品简介**

本试剂盒提供一种简便、快速的方法，可在30分钟内从白细胞中分离总RNA。结合ezBind RNA技术的可逆结合特性，并配有专门设计的缓冲液系统，可在RNA分离前有效去除DNA。裂解液通过DNA Clearance Column，去除基因组DNA。必要时，使用DNase I（详见操作步骤）可消除微量的基因组DNA。

**产品构成**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Catalog#** | **-00** | **-01** | **-02** |
| Preps | 10 | 50 | 250 |
| Buffer LY | 6 mL | 28 mL | 135 mL |
| Buffer RB | 6 mL | 30 mL | 135 mL |
| RNA Wash Buffer | 3 mL | 24 mL | 3x24 mL |
| 10 x Red Blood Cell Lysis Solution | 6 mL | 30 mL | 135 mL |
| DEPC-Treated ddH2O | 2 mL | 10 mL | 30 mL |
| DNA Clearance Columns | 10 | 50 | 250 |
| RNA Columns | 10 | 50 | 250 |
| 2 mL Collection Tubes | 20 | 100 | 500 |
| 1.5 mL RNase-free Microfuge Tubes | 10 | 50 | 250 |
| User Manual | 1 | 1 | 1 |

**要点**

* RNA Wash Buffer：使用前请将12 mL (R6411-00)或96 mL (R6411-01)或96 mL (R6411-02) 96-100%乙醇加入至每个RNA Wash Buffer瓶内。
* Buffer LY：使用前在Buffer LY内加入1%的β-巯基乙醇，并储存于4℃。
* 本试剂盒提供的是10 x Red Blood Cell Lysis Solution，使用前请计算并加入一定体积的ddH2O稀释至1 x Red Blood Cell Lysis Solution。
* 所有操作（包括离心）均在室温下进行。

**产品贮存及稳定性**

本试剂盒自生产之日起可保存12个月。所有试剂及用品可保存于4-28℃。

**实验前需准备的材料**

* 96-100%乙醇
* 小型台式离心机

**操作步骤**

1. 将1 mL全血（收集于肝素化或EDTA处理过的试管内）转移至一个15 mL尖底试管。加入**3倍体积**的**Red Blood Cell Lysis Solution**（使用前请按说明稀释），颠倒混匀5次，冰上静置10 min。
2. 4℃，3,000 rpm（600 x g）离心5 min，小心弃去上清（不要吸到沉淀中的白细胞颗粒）。加入**2 mLRed Blood Cell Lysis Solution**小心洗涤沉淀，4℃，3,000 rpm（600 x g）离心5 min。
3. 弃上清，避免吸到沉淀。
4. 加入**500 μL Buffer LY**，涡旋1 min。
5. 转移上清液至一个**DNA Clearance Column**（自带**2 mL Collection Tube**），13,000 rpm离心2 min，丢弃**DNA Clearance Column**，保留上清液。

**注：**该步骤用于去除基因组DNA。

1. 加入0.5倍体积的100%乙醇（例如：250 µL 100%乙醇加入至500 µL裂解液中）。
2. 将上述混合液转移至一个**RNA Column**中，13,000 rpm离心1 min，丢弃**2 mL Collection Tube**及滤液，将**RNA Column**置于一个新的**2 mL Collection Tube**中。
3. 加入**500 μL Buffer RB**，13,000 rpm离心30 s，弃滤液。
4. 加入**500 μLRNA Wash Buffer**，13,000 rpm离心1 min，弃滤液。

**注：**确保使用前在RNA Wash Buffer中按说要求加入一定量的乙醇。

1. 加入**500 μLRNA Wash Buffer**，14,000 rpm离心30 s，弃滤液。
2. 13,000 rpm离心1 min，弃滤液和收集管。
3. 将**RNA Column**置于一个新的**2 mL Collection Tube**，打开柱子盖子，13,000 rpm离心2 min。

**注：**这一步对于残留的乙醇去除非常重要。

1. 将**RNA Column**转移至一个**1.5 mL RNase-free Microfuge Tube**，在膜中央加入**50~100 μLDEPC-Treated ddH2O**，13,000 rpm离心2 min。RNA存在于滤液中，将RNA溶液储存在-20℃。

**注：**强烈建议在开始下游实验前确定RNA的质量，RNA的质量可通过溴化乙锭染色变性琼脂糖凝胶电泳测定。凝胶上应该出现几条清晰的条带，包括28 S和18 S核糖体RNA条带，以及一定的mRNA条带。若这些条带向较低分子量的RNA弥散，那么RNA在制备、处理或储存过程中发生了很大降解，低于200个碱基的RNA分子不能有效地结合RNA Column。A260/A280的值在1.8~2.0相当于90~100%的纯核酸。

**可选步骤：使用DNase消化去除基因组DNA**

一些下游实验例如低丰度的靶基因RT-PCR，对少量的DNA非常敏感，需要用到DNase消化。通常来说，不需要这样做，因为本试剂盒已选择性提取RNA并去除了绝大部分DNA。若存在DNA污染，要么减少组织或细胞的使用量。

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Catalog# | D001-00 | D001-01 | D001-02 |
| Preps | 10 | 50 | 250 |
| DNase I\* | 60 u | 260 u | 1300 u |
| 1 x DNase I Buffer\* | 600 μL | 3 mL | 15 mL |
| DNase Stop Buffer\* | 480 μL | 2.4 mL | 12 mL |

\*DNase I可向Biomiga单独购买。

**操作步骤（DNase消化去除基因组DNA）**

1. 将样品转移至RNA Column后，按下面操作进行DNase I消化。
2. 将RNA Column置于2 mL Collection Tube，加入**500 μLBuffer RB**，按先前的操作步骤离心并弃上清，重复使用收集管。
3. 加入**50 μLDNase I**至**RNA Column**膜中央，室温静置15 min。加入**200 μLDNase Stop Buffer**，13,000 rpm离心1 min，弃滤液。加入**300 μLRNA Wash Buffer**，13,000 rpm离心1 min，弃滤液。

**常见问题解答**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **问题** | **可能原因** | **建议** |
| A260/A280比值低 | 蛋白污染 | 使用苯酚：氯仿萃取，RNA损失预计在40%以内。 |
| 硫氰酸胍污染 | 加入2.5倍体积的乙醇和0.1 M的NaCl（终浓度）来沉降RNA，-20℃孵育30 min，4℃，10,000 x g离心15 min，用DEPC-Treated ddH2O重悬RNA沉淀。 |
| 低得率 | 样品中RNA已降解 | 采集样品后快速液氮冷冻并储存于-70℃。 |
| 样品加载量超过了RNA柱的最大吸附能力 | 减少组织样品的加入量。 |
| 乙醇没有加入至RNA Wash Buffer中 | 纯化前在RNA Wash Buffer内按要求加入一定量的乙醇。 |
| 基因组DNA污染 | RT-PCR加入过量RNA | 减少RT-PCR反应时RNA的加入量，控制在50~100 ng。 |
| 样品富含DNA | 减少样品初始使用量，30 mg左右的样品初始使用量大多会出现基因组污染的情况。减少细胞数目至1~2 x 106，增加buffer的使用量，分批次多上几次RNA柱子。 |

**杭州倍沃医学科技有限公司**

**BIOMIGA（中国）**

**[www.biomiga.com.cn](http://www.biomiga.com.cn)**

**400-115-2855**

**[info@biomiga.com.cn](mailto:Info@biomiga.com.cn)**