

## HiPure Blood RNA Midi Kit

全血 RNA 中提试剂盒

### 产品简介

本产品适合于从 5~10ml 新鲜血液或冻藏血液样品中抽提 RNA 和 miRNA，试剂盒基于硅胶柱纯化技术和 MagZol Reagent 抽提技术，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。

### 产品组份

产品编号	R4162-01	R4162-02	R4162-03
纯化次数	2 次	10 次	50 次
HiPure RNA Mini Column	2	10	50
2ml Collection Tubes	2	10	50
Extender Tubes	2	10	50
Support Tubes	2	10	50
50ml Collection Tubes	2	10	50
10 x RBC Lysis Buffer	20 ml	100 ml	500 ml
MagZol Reagent	20 ml	70 ml	350 ml
Buffer BCP	1 ml	10 ml	40 ml
Buffer RW2*	6 ml	6 ml	20 ml
RNase Free Water	1.8 ml	10 ml	30 ml

### 保存条件

本产品除 MagZol Reagent 和 Buffer BCP 外，其它组分可在常温下(15-25℃)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℃。

## 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。试剂盒先选择性裂解去除红细胞，离心收集白细胞后，在 MagZol Reagent 匀浆裂解，RNA 释放到裂解液中。经 BCP 或氯仿抽提去除基因组 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，而蛋白质则不被吸附而去除，经 Buffer RW2 洗涤去除盐分，最后 RNA 被 RNase-Free Water 洗脱。

## 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, CPD-A 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℃ 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：**按实验方案分离得到到白细胞，得到的白细胞可直接保存于-80℃。
- **裂解保存：**按实验方案分离得到到白细胞，涡旋重悬后，加入 1ml MagZol Reagent 涡旋 5-15 秒打散细胞，室温放置 10 分钟让细胞充分裂解。该裂解液在 4℃ 保存 3 天，-20℃ 保存六个月以上。
- **RNAsafer LS Reagent：**将 1 倍体积抗凝血液和 3 倍 RNAsafer LS Reagent 颠倒混合。该混合液可在 2-8℃ 保存 1 周，-20℃/-80℃ 长期保存。
- **MagZol 3BD Reagent：**将 1 倍体积抗凝血液和 1.5 倍 MagZol 3BD Reagent 颠倒混合。该混合液可在 2-8℃ 保存 1 周，-20℃/-80℃ 长期保存。
- **冻血 RNA 提取：**转移血液离心管中，并在-70℃ 下储存。提取 RNA 时，在不解冻情况下，在冷冻血液（用称重估算血液体积）中加入 1.2~1.5 倍体积的 MagZol 3BD 颠倒或摇动直至样品完全解冻，不要在没有试剂的情况下解冻血液样本，这将导致 RNA 降解。

## 准备事项

- 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。

## 实验步骤

1. 在 50ml 离心管中，加入 1 倍体积的血液[5~10ml]和 3 倍体积 1x RBC lysis Buffer，颠倒混匀 5-10 次。冰上放置 10-15 分钟，其间颠倒混匀 2~3 次。4℃，2000 x g 离心 10 分钟，小心倒弃上清液。

试剂盒提供 10 x RBC lysis Buffer，使用前须用灭菌水稀释至 1 x。

2. 加入 2 倍体积 1 x RBC lysis Buffer，涡旋重悬细胞。4℃，2000 x g 离心 10 分钟。小心倒弃上清液，余下~200 $\mu$ l 残液和细胞沉淀。

大部分骨髓样品离心后会产生大量的淋巴细胞沉淀，是常规血液的 3-5 倍。对淋巴细胞沉淀量的进行控制是必须的，过多的细胞会引起裂解液过于粘稠或提取质量下降。当细胞沉淀量过多时，倒弃上清液时留下更多残液，如 500~600 $\mu$ l 残液，涡旋重悬后吸出多余悬液，于-80℃保存备用，余下 100~200 $\mu$ l 细胞悬液进行 RNA 抽提。若细胞沉淀量是正常的，与常规血液相当时，倒弃上清液时，只余下 200 $\mu$ l 残液，涡旋重悬后，按第 3 步进行操作。处理全血样品时，倒弃上清液，反扣于吸水纸上吸尽多余的残液，余下不超过 200 $\mu$ l 残液，涡旋重悬。收集的白细胞沉淀可直接保存于-80℃。

3. 涡旋重悬淋巴细胞，加入 8ml MagZol Reagent，立即涡旋 5-15 秒打散细胞，用注射器或移液器反复吸打 5-6 次匀浆样品，室温静置 5-10 分钟充分裂解细胞。
4. 加入 1.6ml 氯仿或 800 $\mu$ l Buffer BCP 至裂解液中，用手上下剧烈振荡 20 秒，转移混合液至 10~15ml 高速离心管中，室温放置 5 分钟。

用涡旋取代振荡会带来更多的基因组 DNA 污染。氯仿/BCP 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。

5. 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。

6. 转移上清至新的离心管中，加入 0.5 倍或 1.5 倍体积的无水乙醇，颠倒混匀 6-8 次。

若需要提取 miRNA，加入 1.5 倍体积的无水乙醇至上清液中。若只需提取 mRNA(>200nt)，加入 0.5 倍无水乙醇时，可有效去除小于 200nt 的 5S RNA, tRNA 等短片段 RNA，提高 mRNA 的纯度。

7. 把 Extender Tubes 插到 HiPure RNA Mini Column 中，然后再 Column 插到 Support Tube 中。把三个连接好的组件一起放到 50ml Centrifuge Tube 中。

8. 转移全部混合液至 Extender Tubes 中，盖上盖子。2000 × g 离心 5 分钟。

9. 打开离心管的盖子，取出柱子，弃去 50ml 离心管、Support Tubes 和 Extender Tube。

10. 把柱子装回 2ml 收集管。加入 0.7ml Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。12,000 × g 离心 1 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。

11. 把柱子装回 2ml 收集管。加入 0.7ml Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。12,000 × g 离心 1 分钟。

12. 把柱子装回 2ml 收集管。12,000 × g 离心 1 分钟。

13. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管中，加入 100µl RNase Free Water 至柱子的膜中央。室温放置 3 分钟。12,000 × g 离心 1 分钟。

14. 丢弃 RNA 结合柱，把 RNA 保存于-80°C。