

M5 Quickspin 全血 RNA 快速提取试剂盒 (无苯酚氯仿)使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 Quickspin 全血 RNA 快速提取试剂盒(无苯酚氯仿)	50T	MF612-05

【储存条件】

室温

【产品简介】

红细胞裂解液选择性裂解红细胞,然后独特的裂解液/ β -巯基乙醇迅速裂解白细胞和灭活细胞 RNA 酶,然后用乙醇调节结合条件后,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 H₂O 将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱。

【产品特点】

1. 不需要使用有毒的苯酚/氯仿等试剂,也不需要乙醇沉淀等步骤。
2. 反复优化的红细胞裂解液配方,裂解效果快速完全。
3. 快速,简捷,单个样品操作一般可在 40 分钟内完成。
4. 多次柱漂洗确保高纯度,OD260/OD280 典型的比值达 1.9~2.1,基本无 DNA 残留,可用于 RT-PCR, Northern-blot 和各种实验。

【产品组分】

试剂盒组成	保存	50T
10X 红细胞裂解液 RLB	室温	25 ml
裂解液 RLT	室温	50 ml
去蛋白液 RW1	室温	40 ml
漂洗液 RW	室温	10 ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇
70%乙醇	室温	9ml RNase-free H ₂ O 第一次使用前按说明加指定量乙醇
RNase-free H ₂ O	室温	10 ml
RNase-free 吸附柱 RA 和收集管	室温	50 套

1. 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。
2. 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。
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。

【注意事项】

1. 所有的离心步骤均在室温完成，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。
2. 需要自备乙醇， β -巯基乙醇。
3. 裂解液 RLT 和去蛋白液 RW1 中含有刺激性化合物，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. 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，本公司的 EASYspin 系列 RNA 提取产品，由于采取了本公司独特的缓冲体系和选择了特殊吸附能力的吸附膜，在大多数 RT-PCR 扩增过程中极其微量的 DNA 残留影响不是很大，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：

- (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。或者选择基因组 DNA 和 cDNA 上扩增的产物大小不一样的引物对。缩短延伸时间，使 DNA 来源模板无法参与扩增反应。
- (2) 将 RNA 提取物用 RNase-free 的 DNase I 处理。本试剂盒还可以用于 DNase I 处理后的 RNA 清洁(cleanup)，请联系我们索取具体操作说明书。
- (3) 在步骤去蛋白液 RW1 漂洗前，直接在吸附柱 RA 上进行 DNase I 处理（货号：RN3401 DNase I 柱上消化试剂盒）。参见附录 1。

附录 1：DNA 酶柱上消化（详细请参考 DNase I 柱上消化试剂盒说明书）

1. 按照前面所列 MF612 试剂盒操作步骤操作，直到做完操作步骤 7。
2. 取 45 μ l DNase I buffer 和 5 μ l RNase free DNase I 在离心管轻轻吹打混匀成工作液（处理多个离心柱子要按照比例放大制备工作液）。
3. 向吸附柱 RA 中加入 350 μ l 去蛋白液 RW1，12,000 rpm 离心 30 秒，弃废液，将吸附柱放回收集管中。
4. 向吸附柱 RA 中央加入 50 μ l 的 DNase I 工作液，室温（20 $^{\circ}$ C-30 $^{\circ}$ C）放置 15 分钟。注意直接将工作液滴在膜中央上向膜四周浸润充分和膜接触，不要让工作液滴在 O 型垫圈或是离心柱管壁上挂壁或者挂在垫圈上不能充分和膜接触。
5. 向吸附柱 RA 中加入 350 μ l 去蛋白液 RW1，12,000 rpm 离心 30-60 秒，弃废液，将吸附柱放回收集管中。
6. 接操作步骤 9 完成后续步骤。

【操作流程】

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无水乙醇!

使用前将 10X 红细胞裂解液 RLB 用 DEPC 处理水稀释到 1X。

操作前在裂解液 RLT 中加入 β -巯基乙醇至终浓度 1%，如 1 ml RLT 中加入 10 μ l β -巯基乙醇。此裂解液最好现用现配。配好的 RLT 4 $^{\circ}$ C 可放置一个月。

1. 在适合大小的 RNase free 离心管中加入 1 体积（<1.5 ml）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。
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 350 μ l (<0.5 ml 全血) 或者 600 μ l (0.5-1.5ml 全血) 裂解液 RLT，吹打混匀后用手剧烈振荡 20 秒，充分裂解。病人正常血样白细胞数量为 4000-7000/ μ l，如果血样中白细胞数量可能大幅增加，应该适当减少处理量。或者按照 350 μ l (<2 $\times$ 10⁶ 白细胞) 或者 600 μ l (2 $\times$ 10⁶-1 $\times$ 10⁷ 白细胞) 比例加 RLT。
5. 用吸头吹打混匀帮助裂解或者剧烈涡旋震荡直到得到满意匀浆结果(或者电动匀浆 30 秒)，可以剪切 DNA，降低粘稠度和提高产量。
6. 较精确估计裂解物体积，加入等体积的 70%乙醇（请先检查是否已加入无水乙醇!），此时可能出现沉淀，但是不影响提取过程，立即吹打混匀，不要离心。
7. 立刻将混合物(每次小于 700 μ l，多可以分两次加入)加入一个吸附柱 RA 中，（吸附柱放入收集管中）13,000 rpm 离心 60 秒，弃掉废液。
8. 加 700 μ l 去蛋白液 RW1，室温放置 1 分钟，12,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。
9. 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 30 秒，弃掉废液。加入 500 μ l 漂洗液 RW，重复一遍。
10. 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。
11. 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 μ l RNase free water（事先在 70-80 $^{\circ}$ C 水浴中加热效果更好），室温放置 1 分钟，12,000 rpm 离心 1 分钟。
12. 如果提取全血>0.5 ml 或者>2 $\times$ 10⁶ 白细胞，加 30-50 μ l RNase free water 重复步骤 11，可以得到更多的 RNA，或者使用第一次的洗脱液加回到吸附柱重复步骤一遍(如果需要 RNA 浓度高)。

洗脱两遍的 RNA 洗脱液浓度高，分两次洗脱后如果合并洗脱液的 RNA 产量比前者高 15–30%，但是浓度要低，用户根据需要选择。

【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。