

For research use only

Version Number : 1.0

Blood Total RNA Isolation Kit

For total RNA purification from whole blood ($10^4 \leq$ White Blood Cells $\leq 10^7$)

试剂盒组成	RE-04011	RE-04013
	50 T	200 T
Buffer RCL (10×)	52.5 mL	210 mL
Buffer BRL1*	30 mL	120 mL
Buffer BRL2*	18 mL	66 mL
Buffer RW1 *	25 mL	100 mL
Buffer RW2	24 mL	96 mL
RNase-Free ddH ₂ O	10 mL	40 mL
RNA-Only Column	50 套	200 套
DNA-Cleaning Column	50 套	200 套
说明书	1 份	1 份

*: Buffer BRL1、Buffer RW1 中含有具刺激性的离液盐，操作时请注意戴上手套和进行相关防护措施。
Buffer RCL (10×)请用 RNase-Free ddH₂O 稀释，如实验室无 RNase-Free ddH₂O，可单独购买。

产品简介

该试剂盒采用本公司研制的离心柱和配方，可以高效率的从抗凝全血中提取得到高纯度高质量的总 RNA。试剂盒提供红细胞裂解液(Buffer RCL)能快速高效的裂解红细胞并保留白细胞，高效的 DNA-Cleaning Column，能轻松的让上清液和细胞裂解物分离并吸附除去基因组 DNA，操作简便、省时；该 RNA-only Column 能高效的结合 RNA，搭配独特的配方，可以同时处理大量样品。

全体系 RNase-Free，使得提取的 RNA 无降解；Buffer RW1、Buffer RW2 缓冲液洗涤体系，使得获得的 RNA 无蛋白、无 DNA、无离子、无有机化合物污染。

储存条件

- ❖ Buffer RCL (10×)于 2-8°C 保存。
- ❖ 试剂盒其余组分在常温(15-25°C)干燥条件下，可保存 12 个月；如需保存更长时间可置于 2-8°C。
- ❖ Buffer BRL1 在加入β-巯基乙醇(可选择不加)后可在 4°C 放置 1 个月(建议现用现配)。

注意：若低温保存，溶液容易产生沉淀。在使用前务必将试剂盒内的溶液在室温中放置一段时间，必要时可在 37°C 水浴中预热 10 分钟，以溶解沉淀，混匀后再使用。

注意事项：(请务必在使用试剂盒前仔细阅读注意事项)

- ❖ 试剂盒收到后 Buffer RCL(10×)保存于 2-8°C，常温保存会导致其红细胞裂解效果减弱。
- ❖ Buffer RCL(10×)在每次使用前进行稀释，现用先稀释。
- ❖ 使用新鲜采取的抗凝全血(2-8°C 保存时间不超过 24 小时)。
- ❖ 如提取的 RNA 不用于克隆全长 cDNA，仅用于 qPCR 或测序分析等其他下游操作，可以选择不加β-巯基乙醇，不会影响提取效果。如提取的 RNA 用于长 cDNA 克隆，在 Buffer BRL1 中加入β-巯基乙醇。每 1 mL Buffer BRL1 加入 10 μL β-巯基乙醇，建议现配现用，Buffer BRL1 在加入β-巯基乙醇后可在 4°C 放置 1 个月。
- ❖ 试剂盒使用前，请务必检查 Buffer BRL2 是否按说明添加了无水乙醇。Buffer BRL2 在使用前添加 36 mL 无水乙醇(RE-04011)、132 mL 无水乙醇(RE-04013)。
- ❖ 试剂盒使用前，请务必检查 Buffer RW2 是否按说明添加了无水乙醇。Buffer RW2 在使用前添加 60 mL 无水乙醇(RE-04011)、240 mL 无水乙醇(RE-04013)。
- ❖ RNA 产率和质量与血液样本用量和洗脱体积有关；建议每 600 μL Buffer BRL1 使用血液的量不超过 1.5 mL。
- ❖ 洗脱体积：洗脱液体积不应少于 30 μL，否则会影响 RNA 产量。

材料取用说明

单次处理，用量请勿超过 1.5 mL (健康人的全血中白细胞含量为：4000-7000 个白细胞/μL 血液，如果血液中白细胞的含量较高，可按比例减少血液的用量，本试剂盒最多可处理的白细胞数量为：1×10⁷)

操作步骤

使用前请先在 Buffer BRL2 和 Buffer RW2 中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。如提取的 RNA 不用于克隆全长 cDNA，仅用于 qPCR 或测序分析等其他下游操作，Buffer BRL1 可以选择不加β-巯基乙醇，不会影响提取效果。

A. 红细胞裂解

1. 准备红细胞裂解液(Buffer RCL(1×)): 根据处理的血液样品的体积配制 7 倍体积的红细胞裂解液(例如待处理的血液样品体积为 200 μL, 则取 140 μL Buffer RCL(10×), 用 RNase-Free ddH₂O 稀释成 1400 μL Buffer RCL(1×), 即为红细胞裂解液。如样品份数较多, 可适量多配制一些红细胞裂解液。

2. 取 1 倍体积(≤1.5 mL)全血加入自备的管子中, 加入 **5 倍体积** 稀释好的红细胞裂解液(Buffer RCL(1×)), 涡旋混匀。

注意: 为使血液和裂解液能充分混匀, 血液和红细胞裂解液工作液的混合体积不要超过管子体积的 3/4。如血液中白细胞含量较高, 可减少血液使用体积。血液体积≤200 μL 时推荐使用 2 mL 离心管。

3. 在冰上孵育 5 min, 孵育过程中涡旋震荡混匀 2 次。

注意: 在冰浴过程中, 溶液将变成半透明状, 表明红细胞已裂解。如有必要, 冰浴时间可延长至 10 min。

4. 4°C, 400 ×g 离心 10 min, 完全去除上清。

注意: 可以使用移液器小心彻底的吸除上清。

5. 向白细胞沉淀中加入 **2 倍原血液体积** 的红细胞裂解液(Buffer RCL(1×)), 涡旋混匀。

6. 4°C, 400 ×g 离心 10 min, 完全去除上清。

注意: 可以使用移液器小心彻底的吸除上清。

B. RNA 提取(以下操作步骤(全程常温(15-25°C)操作, 切勿冰浴和低温离心))

1. 在 A 步骤处理好的离心沉淀(白细胞)中加入 **600 μL Buffer BRL1**, 涡旋震荡或使用移液器反复吹打混匀, 直到看不到细胞团为止。

注意: RNA 在 Buffer BRL1 不会受到 RNase 的污染, 如果样本在加入 Buffer BRL1 裂解后不即时使用, 在室温条件下可保存约 24h, 在 4°C 中保存约 1 周, 更长时间保存请存放于 -80°C, 使用时将溶液在室温或 37°C 溶解即可。

2. (可选步骤)白细胞裂解后, 12,000 rpm (~13,400 ×g) 离心 1 min。

注: 如裂解后溶液澄清, 无杂质, 不浑浊, 可以直接跳过此步骤, 直接进行第 3 步过柱操作。

3. 将离心后的上清液转移至 DNA-Cleaning Column 中(DNA-Cleaning Column 放入收集管中), 12,000 rpm (~13,400 ×g) 离心 2 min。移除 DNA-Cleaning Column, 保留收集管内上清液。

注意: 如果 DNA-Cleaning Column 收集管底部有沉淀产生, 请将上清液转移至干净离心管中再进行步骤 4, 切勿将其吸入上清液中。

4. 向上述上清液中加入 **960 μL (1.6 倍体积) Buffer BRL2**(使用前请确认已按照说明加入无水乙醇), 轻柔混匀。

注意: 如果混合液出现浑浊或絮状沉淀, 请直接进行步骤 5, 将沉淀一并转移至纯化柱中。

5. 将 800 μL 混合液转移至 RNA-only Column 中(纯化柱放入收集管中), 12,000 rpm (~13,400 ×g) 离心 1 min, 弃掉收集管中的废液。将剩余的混合液全部加入纯化柱中, 12,000 rpm (~13,400 ×g) 离心 1 min, 弃掉收集管中的废液。

6. 向纯化柱中加入 **500 μL Buffer RW1**, 12,000 rpm (~13,400 ×g) 离心 1 min, 弃掉收集管中的废液。

7. 向纯化柱中加入 **700 μL Buffer RW2**(使用前请确认已按照说明加入无水乙醇), 12,000 rpm (~13,400 ×g) 离心 1 min, 弃掉收集管中的废液。

8. 重复步骤 7。

9. 将纯化柱放回收集管中, 12,000 rpm (~13,400 ×g) 空管离心 2 min, 去掉离心柱中残余的 Buffer RW2。

10. 将纯化柱转移至新的 RNA 收集管中, 向纯化柱的膜中央滴加 **30-50 μL** 已于 65°C 预热的 **RNase-Free ddH₂O**(切勿将洗脱液添加到压圈上, 否则会损失较大体积的洗脱液), 室温放置 2 min。12,000 rpm (~13,400 ×g) 离心 1 min 收集 RNA 溶液。

注意: 硅胶膜会吸附少量的液体, 洗脱后所得的 RNA 产物体积会有所偏差。增加洗脱体积可提高 RNA 产量, RNase-Free ddH₂O 加入体积不应低于 30 μL, 体积过小会影响洗脱效率。得到的 RNA 溶液可直接用于下游实验或置于 -80°C 保存。由于本试剂盒对 RNA 二级结构保护较好, 建议凝胶电泳之前, 先将得到的 RNA 溶液置于 72°C 变性处理 5-10 min。

11. 将离心得到的 RNA 溶液重新加至纯化柱中, 重复步骤 10(如对 RNA 得率要求不高, 可忽略此步骤)。