

Flying Shark[®] Plus Blood RNA Kit

Flying Shark[®] 血液总 RNA 提取试剂盒

目录号: **RNE07**

试剂盒组成

Component	RNE07 (50 preps)
10X RBC Lysis Buffer	50 ml
Buffer RL	30 ml
70%乙醇	9 ml// (使用前按瓶上标签加入无水乙醇)
Buffer RW2 (concentrate)	13 ml// (使用前按瓶上标签加入无水乙醇)
RNase-free H ₂ O	10 ml
gDNA-Filter Columns with Collection Tubes	50
Spin Columns RA with Collection Tubes	50

保存方法

室温 (15-30℃) 保存。

产品介绍

本试剂盒适用于**新鲜抗凝全血** (≤1.5 ml) 的高纯度 RNA 抽提。首先使用主要含 NH₄Cl 的红细胞裂解液 (RBC Lysis Buffer) 去除红细胞, 然后使用独特的裂解液迅速裂解细胞并灭活细胞 RNA 酶, 使用 **gDNA-Filter Columns 去除基因组 DNA**, 乙醇调节结合条件后, RNA 吸附于硅基质膜上, 再通过两步漂洗, 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。提取的 RNA 纯度极高, 质量稳定可靠, 可直接用于 RT-PCR、芯片分析、分子克隆等多种下游实验。

实验前准备及重要注意事项

1. 需自备无水乙醇。
2. Buffer RL 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, 要用大量清水或生理盐水冲洗。

- 第一次使用 Buffer RW2 前应按照试剂瓶标签的说明加入指定量无水乙醇，加入后请及时打钩标记已加入乙醇，以免重复加入！
- 本试剂盒最多能处理 1.5 ml 健康的人类全血（白细胞数量不超过 1×10^7 ）。病人血液中白细胞数量可能会升高，此时可减少血液用量。
- 若血液无法在短时间内进行全部的提取操作，可在第 6 步白细胞沉淀加入 Buffer RL 匀浆后，将裂解物保存在 -80°C （详细参考步骤 6）。
- 本试剂盒不适用于冻存的全血。若提取冻存血液 RNA，推荐使用全血 RNA 提取试剂盒（NOBELAB 官网查询 www.nobelab.com，货号 RNE04）。

操作步骤

i. 白细胞的分离

- 在 15 ml 离心管中，加入 1 倍体积的**新鲜抗凝血液**（ ≤ 1.5 ml）和 5 倍体积 1x RBC Lysis Buffer，颠倒混匀 5-10 次。例如，1.5 ml 的血液，需加入 7.5 ml 1x RBC Lysis Buffer。
注意：试剂盒提供的 10x RBC Lysis Buffer，使用前需用灭菌水稀释至 1x。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 。
- 冰上放置 10-15 min，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 min。
- 4°C 2,100 rpm ($\sim 400 \times g$) 离心 10 min，小心倒弃上清。
- 向沉淀中加入 2 倍血液体积的 1x RBC Lysis Buffer，轻轻涡旋，充分重悬白细胞。例如，若血液起始量为 1.5 ml，则需加入 3 ml 1x RBC Lysis Buffer。
- 4°C 2,100 rpm ($\sim 400 \times g$) 离心 10 min，小心并彻底吸弃上清。
注意：此步一定要完全去除上清，否则可能会导致最后 RNA 产量和纯度下降。

ii. 白细胞裂解及 RNA 过柱纯化（以下离心均在室温下进行！）

- 加入适量裂解液 Buffer RL（见下表），反复吸打混匀或涡旋振荡 20 s 至细胞团溶解消失，充分裂解。（病人血样中白细胞数量可能大幅增加，应该适当减少处理量，或者根据白细胞数量来确定 RL 加入量）

Buffer RL(μl)	健康人类全血(ml)	白细胞数量
350	≤ 0.5	$\leq 2 \times 10^6$
600	0.5-1.5	2×10^6 - 2×10^7

注意：RNA 在 Buffer RL 中不会被 RNase 降解，如果细胞在加入 Buffer RL 裂解后不立即提取，可存放于 -80°C 一个月以上（注意正确操作是细胞充分裂解之后再冻存）。

7. 将上清液或裂解混合物转移到已装入收集管的 gDNA 清除柱 (gDNA-Filter Columns) 中,
12,000 rpm 离心 2 min, 弃掉 gDNA-Filter Columns, **保留滤液 (RNA 在滤液中)**。
 8. 加入与滤液等体积的 **70%乙醇** (通常为 350 μ l 或 600 μ l, 使用前检查是否加入无水乙醇),
反复吸打充分混匀 (此时可能会出现沉淀), 将得到的溶液和可能产生的沉淀一起转入
已装入收集管的吸附柱 (Spin Columns RA) 中, 若一次不能将全部溶液加入吸附柱中,
请分两次转入。12,000 rpm 离心 1 min, 弃废液。
 9. 向吸附柱 RA 中加入 **600 μ l Buffer RW2** (使用前检查是否加入无水乙醇!), 12,000 rpm
离心 30 s, 弃废液。
 10. 重复步骤 9。
 11. 将吸附柱放回空收集管内, 12,000 rpm 离心 2 min, 弃收集管。
注意: 这一步的目的是去除吸附柱中残余乙醇, 乙醇残留会影响后续的酶促反应 (酶
切、PCR 等)。
 12. 将吸附柱 RA 放入新的 RNase-free 离心管中, 向吸附膜的中间部位悬空滴加 **30-50 μ l**
RNase-Free H₂O, 室温放置 2 min, 12,000 rpm 离心 1 min, 得到 RNA 溶液, -70℃ 保存。
注意: RNase-Free H₂O 体积不应少于 30 μ l, 体积过小影响回收效率。
-

