

TRNpure Hi-Blood RNA Kit

TRNpure 高效血液总 RNA 提取试剂盒

目录号：RNE09

试剂盒组成

Component	RNE09 (50 preps)
10X RBC Lysis Buffer	50 ml
Buffer RZ	50 ml
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
Spin Columns RA with Collection Tubes	50

保存方法

Buffer RZ 可室温稳定保存 12 个月，为达到最佳效果，建议收到后置于 2-8℃ 避光保存，其它组分 RT（15-30℃）。

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，然后使用改进的异硫氰酸胍/酚一步法迅速裂解白细胞和灭活细胞 RNA 酶；用乙醇调节结合条件后，总 RNA 选择性吸附于离心柱内硅基质膜上，再通过一系列快速的漂洗—离心的步骤将细胞代谢物，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 纯度高，质量稳定可靠，可应用于下游 RT-PCR、Northern Blot、Dot Blot 和体外翻译等实验。

实验前准备及重要注意事项

1. 需自备氯仿和无水乙醇。
2. Buffer RZ 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。
3. 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！

4. 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。
5. 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 RZ 匀浆后，加氯仿前，将裂解物保存在 -80°C （详细参考步骤 6）。
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 TRNpure LS Blood RNA Kit（NOBELAB 官网查询 www.nobelab.com，货号 RNE04）。

操作步骤

i. 白细胞的分离

1. 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 。
2. 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。
3. 4°C 2,100 rpm（ $\sim 400 \times g$ ）离心 10 min，小心倒弃上清。
4. 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。
5. 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

6. 涡旋或轻弹管壁松散白细胞沉淀，立即加入 1ml Buffer RZ，用移液枪反复吸打充分裂解白细胞。裂解后，可将裂解物转移至 1.5 ml 离心管，以方便后续操作。
注意：此时若不立即提取，可将裂解物保存在 -80°C （6 个月），待使用时，将其室温溶解后进行操作步骤第 7 步进行后续提取。
 7. 将裂解物在室温（ $15-30^{\circ}\text{C}$ ）放置 5 min，使得核酸蛋白复合物完全分离。
 8. 加入 200 μl 氯仿，用手剧烈振荡 15 s，室温放置 3 min。
 9. 4°C ，12,000 rpm 离心 10 min。离心后会形成三相体系：上层为水相层含有 RNA，DNA 和蛋白质位于有机层（下层）和中间层。转移上清（约 500 μl ，无需全部吸取，以免碰触中间层）到新的离心管中。
-

iii. RNA 过柱纯化（以下离心均在室温下进行！）

10. 加入 **0.5 倍上清体积无水乙醇**，涡旋混匀（可能会出现沉淀，不影响后续操作），将得到的溶液和可能产生的沉淀转入已装入收集管的吸附柱（Spin Columns RA）中，12,000 rpm 离心 30 s，弃废液。
注意：若需要提取小分子 RNA（miRNA、siRNA、snRNA 等小于 200 nt），则加入 1.5 倍体积的无水乙醇至上清中。
 11. 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。
 12. 重复步骤 11。
 13. 将吸附柱放回空收集管内，12,000 rpm 离心 2 min。
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）。
 14. 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°C 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。如需提高终浓度，可将洗脱的 RNA 溶液再次加入到吸附柱中二次洗脱。
-

