

目 录

简 介-----	2
原 理-----	2
试剂盒组成-----	3
保质期-----	3
准备工作-----	4
方案:血液 RNA 的保护和提取-----	5
常见问题回答-----	8

版本: 2021-01

简介

HiPure PX Blood RNA Kit是专门为血液RNA保存和提取而设计的。试剂盒适合从Qiagen Paxgene Tube, Magen RNASafer LS Reagent保存的血液样品中高效回收RNA。试剂盒莫基于硅胶柱纯化的试剂,整个提取过程只需60分钟。试剂盒适合于从 $\leq 2.5\text{ml}$ 的血液中抽提总RNA。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。

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(如盐酸胍或异硫氰酸胍)条件下,可通过氢键和静电等物理化学作用吸附核酸,而蛋白质和其它杂质则不被吸附而去除。吸附了核酸的滤膜经洗涤去除残留的蛋白质和盐,最后可以用低盐缓冲液(如 Buffer TE)或水,洗脱出滤膜上吸附的核酸。得到的核酸纯度高,可直接用于各种下游实验。

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 分子的半衰期会比管家基因的 mRNA 分子的半衰期短很多。直接提取血液 RNA 时,新鲜抗凝血液在 2-8°C 放置时间最好不要超过 2 小时。血液在冻藏过程中会引起细胞破裂, mRNA 会发生降解,因此血液样品不能低温冻藏。试剂盒携带的 RNASafer LS Reagent 含阳离子表面活性剂,能快速裂解细胞,并和 RNA 形成稳定的电中性复合物,保护 RNA 不降解。血液与 RNASafer LS Reagent 混合后,可在 2-8°C 保存 1 周, -20°C 保存一个月, -8°C 长期六个月以上。

血液与 RNASafer LS Reagent/Paxgene Tube 混合后,离心收集 RNA/阳离子表面活性剂复合物,加入裂解液和蛋白酶 K 消化核酸复合物,让 RNA 释放到裂解液中。消化液经 gDNA 过滤柱去除杂质和基因组 DNA 后,加入乙醇至滤液中调节结合条件,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。柱子经 Buffer RW1 洗涤蛋白质和其它杂质,可选择 DNASE 膜上消化去除残留的 DNA,经 Buffer RW2 洗涤去除盐分,最后 RNA 被 RNASE-Free Water 洗脱。洗脱的 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。

组 成

HiPure PX Blood RNA Kit

产品编号	R4168-02	R4168-03
纯化次数	10 次	50 次
HiPure RNA Mini Columns I	10	50
gDNA Filter Mini Columns	10	50
2ml Collection Tubes	30	150
RNase Free Water	60 ml	250 ml
Buffer MBR1 (RTL Lysis Buffer)	10 ml	30 ml
Buffer MBR2 (RNA Digestion Buffer)	5 ml	15 ml
Buffer MBR3(Buffer RW1)	10 ml	60 ml
Buffer MBR4*(Buffer RW2)	5 ml	20 ml
Buffer MBR5 (RNase Free Water)	1.8 ml	10 ml
Proteinase K	12 mg	50 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	5 ml
DNase I	120 μ l	650 μ l
DNase Buffer	6 ml	30 ml
说明书	1	1

保质期

HiPure PX Blood RNA Kit 除 Proteinase K 和 DNase I 外，其它组分可在室温下(15-25℃)干燥保存 18 个月。长期保存时需置于 2-8℃。Proteinase K 干粉和 DNase I 干粉采用室温运输。收到产品后，请把 Proteinase K、DNase I 和 DNase Buffer 保存于-20℃。RNASafer LS Reagent 在低温下可能会有沉淀析出，55℃水浴溶解后再使用。因 RNase Free Water 中不含任何抑菌因子(抑菌因子会影响 RT-PCR 等)，室温放置或操作时可能会引入细菌或真菌污染。推荐分装 RNase Free Water 处理水并保存于-20℃，以减少污染。若 RNase Free Water 受到污染，请重新配制或重新订购。

需要准备材料和工具

- 无水乙醇(96-100%)
- 灭菌的 15ml 离心管
- 无 RNase 酶的 1.5ml 离心管和无 RNase 酶的枪头
- (<15,000 x g)小型离心机
- 适合于 15ml 离心管的离心机(3,000-5,000 x g)
- 用无水乙醇稀释 Buffer MBR4，并于室温保存。
- 溶解 Proteinase K (20mg/ml): 加入适量的 Protease Dissolve Buffer 溶解 Proteinase K 至终浓度为 20mg/ml，轻轻颠倒让蛋白酶 K 充分溶解。Proteinase K 干粉可在室温下保存一年，但溶解的 Proteinase K 须分装保存于-20~8℃。

方案 1. 从保存的血液样品中提取 RNA

该方案适合于处理 Paxgene Tube 或 RNASafer LS Reagent 保存的样品中提取总 RNA。

1. 取出 Paxgene Tube 或 RNASafer LS Reagent 保存的样品，室温静置 2 小时恢复至室温（室温保存样品无需静置）。室温，3,000-5,000 × g 离心 10 分钟收集沉淀，倒弃上清液。
2. **加入 4ml RNase Free Water 至沉淀中**，剧烈涡旋 15~30 秒打散沉淀团。
3. 室温，3,000-5,000 × g 离心 10 分钟收集沉淀。
4. 倒弃上清液。短暂离心收集管壁上的液滴，用移液枪吸尽残液。上清液必须尽量去除，残液会稀释裂解液而引起 RNA 的降解。
5. **加入 500µl Buffer MBR1 至沉淀团中**，高速涡旋 15 秒打散沉淀。(这一步要充分打散沉淀)
6. **加入 200µl Buffer MBR2 和 35µl Proteinase K 至样品中**，55°C 振荡温育 15 分钟。
7. 取 gDNA Filter Mini Column 柱装在 2ml 收集管中。**把 700µl 混合液转移至 gDNA 过滤柱子中**。10,000 × g 离心 1 分钟。
8. 弃去 gDNA 过滤柱子。**加入 400µl 无水乙醇至滤液中**，吸打混匀 5 次。
9. 把 HiPure RNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。**转移一半的混合液至 RNA 柱中**。12,000 × g 离心 1 分钟。
10. **倒弃滤液，把柱子装回收集管**。转移剩余混合液至柱子。12,000 × g 离心 1 分钟。
11. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。**加入 350µl Buffer MBR3 至柱子上**。12,000 × g 离心 1 分钟，丢弃收集管和滤液。
12. 把柱子装在新的收集管中。按下表配制 DNase I 反应液，轻轻混匀，把 DNase 反应液加到 RNA Mini Column 的膜中央，室温静置 15 分钟。

成分	用量
DNase Buffer	90 μ l
DNase I(20Units/ μ l)	10 μ l
Proteinase K	5 μ l

13. 加入 500 μ l Buffer MBR3 至柱子中，室温静置 5 分钟。12,000 \times g 离心 1 分钟。
14. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 500 μ l Buffer MBR4(已用乙醇稀释)至柱中，8,000 \times g 离心 1 分钟。
Buffer MBR4 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。
15. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 500 μ l Buffer MBR4 (已用乙醇稀释)至柱中，8,000 \times g 离心 1 分钟。
16. 倒弃流出液，把柱子装回收集管。13,000 \times g 离心 3 分钟甩干柱子。
17. 将柱子转移至 1.5ml 离心管，加入 30~50 μ l Buffer MBR5 至柱子膜中央。静置 3 分钟。13,000 \times g 离心 1 分钟。
18. 把 RNA 保存于-20 $^{\circ}$ C 和-80 $^{\circ}$ C。

常见问题回答

该列表可能有利于解决您在提取过程中所碰到的问题。另外，Magen 的技术人员也可以随时为您提供咨询服务，若您对试剂盒存在疑问或有良好的建议，又或者您在分子生物学实验中碰到问题，都请您联系我们。我们将竭尽所能为您排忧解难。

现象	原因及解决方法
柱子堵塞	
RNA/阳离子复合物洗涤不干净	加入 RNase Free Water 至 RNA/阳离子复合物后，高速涡旋充分打散沉淀。
样品起始用量太多	减少样品用量。试剂盒一次最多能处理 2.5×10^7 白细胞。处理病人血液时，其白细胞数量会发生明显变化。血液用量必调整 2.5ml。
样品消化不彻底	加入 Buffer MBR1 后，必须高速涡旋。若涡旋后仍有较大块的组织块时，延长涡旋时间或用移液枪拍打 10-15 次。延长 Proteinase K 消化时间至 10-30 分钟，让 RNA/阳离子复合物完全消化。
RNA 产量低	
RNA 与保护剂形成的沉淀不充分	血液与保护液混合后，放置时间不能小于 20 分钟，否则 RNA 与保护剂形成的复合物会不充分。
低温离心	血液与保护液混合液须室温离心，低温离心会导致产量下降。
样品消化不彻底	同上
Buffer MBR4 没有加入乙醇稀释	使用前，Buffer MBR4 须加入 4 倍体积的无水乙醇稀释，或按瓶子标签指示进行稀释。
DNA 污染	
膜上 DNase 消化	该产品携带的 gDNA 柱可高效地去除基因组 DNA。但对灵敏的 RT-PCR 应用，推荐另订购 DNase Column Kit 进行膜上 DNase 消化，以彻底去除基因组 DNA 的污染。

若以上的解答还是无法解决您的问题，请您联系我们。

Note: