



# Blood Total RNA Isolation Kit

Cat.No.RE-04011/04013

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

For research use only

Store at room temperature



## 目 录

产品介绍	3
产品特点	3
试剂盒应用	4
RNA 的应用	4
RNA 的储存	4
产品质量控制	4
试剂盒内容	5
产品信息	5
储存条件	5
试剂盒组分信息	6
RNA-Only Column 特性	6
DNA-Cleaning Column 特性	6
RNA 提取得率与纯度	7
注意事项	7
操作前准备事项	8
实验材料和设备	8
自备试剂	8
安全性	8
操作指南	9
材料取用说明	10
预防样本间交叉污染	10
RNA 污染预防	10
● 操作步骤	11
RNA 浓度及纯度检测	13
问题分析指南	14

## 产品介绍

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。

## 产品特点

- ◆ 整套试剂盒全 RNase-Free，无需担心 RNA 降解。
- ◆ DNA-Cleaning Column 特异结合 DNA，使得试剂盒无需额外添加 DNase 即可去除基因组 DNA 污染。
- ◆ RNA 得率高：RNA-only Column 和独特配方搭配能高效的纯化 RNA。
- ◆ 速度快：操作简便，可在 40 分钟内完成。
- ◆ 安全：无需有机试剂抽提。
- ◆ 质量高：提取得到的 RNA 纯度高，没有蛋白和其他杂质污染，能够满足后续各种实验。

## 试剂盒应用

适用于哺乳动物全血中总 RNA 的提取纯化。

## RNA 的应用

血液总 RNA 提取试剂盒提取得到的总 RNA 可用于各种下游分子实验，例如：cDNA 合成，RT-PCR、Real Time PCR、Northern Blot、Dot Blot、体外翻译、芯片分析、PolyA 筛选、分子克隆和 RNase 保护分析等。

## RNA 的储存

建议使用 RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 洗脱 RNA，即时用于下游实验或储存于-80°C。在-80°C 存储条件下，RNA 可保存一年。

## 产品质量控制

按照凡晶生物试剂盒质量检测体系标准(FOREGENE's Total Quality Management System)，每一批次的血液总 RNA 提取试剂盒都严格进行多次测试，确保每一批次试剂盒质量的可靠性和稳定性。

## 试剂盒内容

Blood Total RNA Isolation Kit 血液总 RNA 提取试剂盒		
试剂盒组成	RE-04011	RE-04013
		50 次
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 <sub>2</sub> 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 ddH<sub>2</sub>O稀释，如实验室无RNase-Free ddH<sub>2</sub>O，可单独购买。

## 产品信息

型号	离心柱型	纯化组件	Foregene 离心柱、试剂
通量	1-24 个样品	制备时间	~40 min (24 个样品)
离心机	台式离心机	细胞裂解物分离	离心分离
纯化柱 RNA 承载量	60 µg	离心柱液体盛装量	800 µL
最小洗脱体积	30 µL	样本处理量	200 µL-1.5 mL

## 储存条件

Buffer RCL (10×)于 2-8°C保存；试剂盒其余组分均可在常温(15-25°C)干燥条件下，可保存 12 个月。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。

## 试剂盒组分信息

- ◆ Buffer RCL: 提供红细胞裂解所需的环境。
- ◆ Buffer BRL1: 提供白细胞裂解所需的环境。
- ◆ Buffer BRL2: 提供 RNA 的特异上柱环境。
- ◆ Buffer RW1: 去除 RNA 中的蛋白质、DNA 等杂质。
- ◆ Buffer RW2: 去除 RNA 中残留的盐离子。
- ◆ RNase-Free ddH<sub>2</sub>O: 洗脱纯化柱膜上的总 RNA。
- ◆ DNA-Cleaning Column: 特异吸附细胞裂解产物中的 DNA, 并过滤除去裂解产物中的固体杂质。
- ◆ RNA-only Column: 特异吸附上通过 DNA-Cleaning Column 滤液中的总 RNA。

## DNA-Cleaning Column 特性

原理( Mechanism)	特异吸附DNA
功能(Function)	去除DNA污染, 过滤分离裂解物
裂解物最大载量体积(Maximum loading volume)	800 $\mu$ L

## RNA-Only Column 特性

RNA最大结合能力(Maximum binding capacity)	60 $\mu$ g
上清最大载量体积(Maximum loading volume)	800 $\mu$ L
RNA片段大小分布(RNA size distribution)	RNA $\geq$ 200 nt
最小洗脱体积(Minimum elution volume) 1*	30 $\mu$ L
最佳样本选取(Selection of samples)	新鲜抗凝全血
样本最大初始量(Maximum amount of starting material)	1.5 mL (人类)

1\*: 30  $\mu$ L 的最小洗脱体系是在细胞量较少时, 兼顾 RNA 回收率及浓度给出的比较合理的建议体积。如果为了提高 RNA 的产量, 可以适当增加洗脱液体积, 比如采用 50  $\mu$ L 的洗脱体系, 以期得到更多量的 RNA。

## RNA 提取得率与纯度

使用 Blood Total RNA Isolation Kit 纯化得到的 RNA, 其产量与血液初始量、新鲜程度、保存时间以及操作相关。

### 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, 常温保存会导致红细胞裂解效果减弱。
- ◆ Buffer RCL(10×)在每次使用前进行稀释, 现用现稀释。
- ◆ 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, 请在 Buffer BRL2 中添加无水乙醇, 加入量请参照试剂瓶上标签。不同规格的试剂盒无水乙醇的添加量见下表:

产品规格	无水乙醇添加量
RE-04011	36 mL
RE-04013	132 mL

- ◆ 试剂盒使用前, 请在 Buffer RW2 中添加无水乙醇, 加入量请参照试剂瓶上标签。不同规格的试剂盒无水乙醇的添加量见下表:

产品规格	无水乙醇添加量
RE-04011	60 mL
RE-04013	240 mL

- ◆ 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。
- ◆ 请检查试剂盒中的 Buffer BRL1 和 Buffer RW1 是否有晶体析出现象, 若低温存放后有晶体析出, 可将 Buffer 放置于室温或 37°C一段时间, 将晶体溶解后混匀再使用。

## 操作前准备事项

使用本试剂盒前，请务必仔细阅读说明书。血液总 RNA 提取试剂盒操作简单、方便、快速，说明书提供了整个试剂盒的正确使用方法。请在使用前准备好必要的实验材料和设备。

## 实验材料和设备

- ◆ 新鲜采取的哺乳动物血液：0.2-1.5 mL。
- ◆ 2 mL 或 15 mL RNase-Free 管。
- ◆ 台式离心机( $\geq 13,400 \times g$ )、移液器等。

## 自备试剂

- ◆ 无水乙醇
- ◆  $\beta$ -巯基乙醇(选用)

## 安全性

- ◆ 本产品仅供科研使用，请勿用于医药、临床医疗、食品及化妆品等用途。
- ◆ 在使用该试剂盒时，请穿戴实验服、一次性乳胶手套、一次性口罩等以保护自身；并最大程度上避免人为引入的 RNase 污染。
- ◆ Buffer BRL1 含有离液盐：变性剂，刺激性。
- ◆ Buffer BRL2 含有无水乙醇：易燃。
- ◆ Buffer RW1 含有离液盐：变性剂，刺激性。
- ◆ Buffer RW2 含有无水乙醇：易燃。



## 操作指南

### 样品在 Buffer BRL1 中保存

RNA 在 Buffer BRL1 不会受到 RNase 的降解, 如果经去除红细胞处理的样本加入 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。

### 样本初始用量

正确的样本的初始取用量对于 RNA 的最佳产量及纯度十分必要, 样本的最大取用量与下面因素相关:

- ❖ 样本本身的类型以及样本 RNA 的丰度;
- ❖ Buffer BRL1 的用量决定了样本的有效裂解;
- ❖ RNA-Only Column 的 RNA 结合能力。

根据上述因素, 我们推荐血液的初始用量不宜超过 1.5 mL。如果样本用量过多, Buffer BRL1 对细胞裂解不完全, 导致纯化获得的 RNA 纯度不高; 同时可能会超过 RNA-Only Column 的最大承载量而浪费珍贵样本。

### 细胞裂解

在 Buffer BRL1 条件下, 涡旋震荡或使用移液器反复吹打混匀细胞。样本破碎要彻底, 直到见不到细胞团为止, 以完全破坏细胞膜及细胞器以释放 RNA, 否则将影响 RNA 的产量以及在下步进行裂解物分离操作容易发生离心柱堵塞。

## 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/ $\mu\text{L}$  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： $1 \times 10^7$ )。

## 预防样本间交叉污染

为了避免样本间交叉污染，每次取样后都需要将取样器材的刃口或与样本直接接触的部位浸入 2%次氯酸钠溶液中，反复洗刷数次进行清洗，然后用干净的纸巾擦干残余液体后再进行使用。为了试验方便，也可准备多个取样器材，在使用完后进行统一清洗，确保每一单独样本均使用的是无污染的取样器材。

## RNase 污染预防

- ◆ 人体接触是重要的 RNase 污染源，且部分试剂中可能带有刺激性气味，请在操作过程中经常更换手套，并佩戴一次性口罩。
- ◆ 请使用无 RNase 的枪头和其他塑料制品。
- ◆ RNA 在 Buffer BRL1 中时不会被 RNase 污染，但提取后继续处理过程中应使用不含 RNase 的塑料和玻璃器皿。玻璃器皿可在  $150^{\circ}\text{C}$  烘烤 4 小时，塑料制品可在 0.5 M NaOH 中浸泡 10 分钟，然后用水彻底清洗，高压灭菌，即可去除 RNase。
- ◆ 配制溶液应使用无 RNase 的水(将水加入处理过不含 RNase 的玻璃瓶中，加入 DEPC 至终浓度 0.01%(v/v)，混匀后放置过夜，高压灭菌)。

## 基因组 DNA 污染及清除

血液总 RNA 提取试剂盒主要是为了从抗凝全血中获得可观的 RNA，并且有独特的 DNA-Cleaning Column 可有效的除去体系中大部分 DNA 污染，纯化获得的 RNA 通常无需使用 DNase 处理即可用于下游操作。

## 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 $\beta$ -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 $\times$ )): 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  $\mu$ L, 则取 140  $\mu$ L Buffer RCL(10 $\times$ ), 用 RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 稀释成 1400  $\mu$ L Buffer RCL(1 $\times$ ), 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( $\leq 1.5$  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 $\times$ )), 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  $\leq 200$   $\mu$ L 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 $^{\circ}$ C, 400  $\times$ 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 $\times$ ), 涡旋混匀。

6. 4 $^{\circ}$ C, 400  $\times$ 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 $^{\circ}$ 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  $\mu$ L 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 $^{\circ}$ C 中保存约 1 周, 更长时间保存请存放于 -80 $^{\circ}$ C, 使用时将溶液在室温或 37 $^{\circ}$ C 溶解即可。

2. (可选步骤)白细胞裂解后, **12,000 rpm (~13,400  $\times$ 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 ddH<sub>2</sub>O**(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 ddH<sub>2</sub>O 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)。

## RNA 浓度及纯度检测

- ◆ 得到的 RNA 的质量与操作过程中的多种因素有关。RNA 可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测浓度与纯度。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。
- ◆ 用分光光度计测定 RNA 浓度，OD260 值为 1 相当于大约 40 µg/mL 的 RNA。
- ◆ 当细胞量过低导致 RNA 的产量低，分光光度计不能准确的测定其 OD 值，请使用 RT-qPCR 进行 RNA 的检测。
- ◆ RNA 的 OD260/280 比值通常用作核酸纯度的衡量指标，一般情况下，纯 RNA 的 OD260/280 比值在 1.8-2.1。OD260/280 比值会受测定所用溶液的 pH 值的影响，例如，纯化 RNA 在 pH 7.5 的 10mM Tris 缓冲液中 OD260/280 读数在 1.9-2.1 之间，而在中性的水溶液中比值会变低，可能只有 1.8-2.0，这并不意味着 RNA 的质量变差。

## DNA 污染及检测

- ◆ 目前没有有效的纯化方法能保证纯化得到的 RNA 中完全没有 DNA 的污染，即便在凝胶电泳时检测不到 DNA 条带，也可能存在微量的 DNA。而 RNA 提取试剂盒能除去 RNA 中的绝大部分 DNA，然而微量的 DNA 依然可能存在于样品中，它的存在量与样本的用量及其本身性质有关。
- ◆ 对于纯化得到的 RNA 中的微量 DNA 的检测，可以通过不经逆转录进行实时荧光定量 PCR 检测。我们建议，可以设计引物，其退火匹配区域位于基因组 DNA 的内含子中。如果 RNA 中不含有任何基因组 DNA，基于这对引物的 PCR 是不会扩增出相应的 PCR 产物。

## 问题分析指南

以下针对血液 RNA 提取中可能遇到的问题进行分析，希望能对您的实验有所帮助。另外，对于在操作说明和问题分析以外的其他实验或技术上的问题，我们设有专门的技术支持帮助您。如有任何需要可联系我们：028-83361257 或 E-mail:

Tech@foregene.com。

### 提取不到 RNA 或者 RNA 产量低

通常会有多种因素影响回收效率，比如：样本 RNA 含量、操作方法、洗脱体积等。

1. 血液样本保存时间过久。

建议：采取的血液样本不能超过 24 小时。

2. 样本裂解不充分。

建议：在细胞裂解时，请保证细胞完全裂解。

3. 洗脱液添加不正确。

建议：确认 RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 滴加到了纯化柱膜中间位置。

4. Buffer BRL2 或 Buffer RW2 中没有添加正确体积的无水乙醇。

建议：请按照说明书，在试剂盒使用前，Buffer BRL2 和 Buffer RW2 中添加正确体积的无水乙醇并混匀。

5. 样本用量不合适。

建议：每 600  $\mu$ L Buffer BRL1 最多使用 1.5 mL 健康人全血，样本过多会导致 RNA 提取得率及纯度降低。

6. 洗脱体积不合适或洗脱不彻底。

建议：纯化柱的洗脱液体积为 30-50  $\mu$ L；若洗脱效果并不理想，建议在加入预热的 RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 后，延长室温放置的时间，例如放置 5-10 min。

7. 纯化柱在 Buffer RW2 洗涤之后有乙醇残留。

建议：如果在 Buffer RW2 洗涤，空管离心 1 min 后还有乙醇残留，可以将空管离心操作的时间增加至 2 min，或将纯化柱置于室温 5 min，以充分除去残留乙醇。

## 纯化获得的 RNA 有降解

纯化得到的 RNA 的质量和样本的保存、RNase 污染、操作等因素有关。

### 1. 操作间有 RNase 引入或没有佩戴一次性手套、口罩等。

建议：RNA 提取实验最好在单独的 RNA 操作间进行，并在实验前清理好实验桌，实验时佩戴一次性手套、口罩，最大程度上避免 RNase 引入导致的 RNA 降解。

### 2. 试剂在使用过程中被 RNase 污染。

建议：更换新的 Blood Total RNA Isolation Kit 进行相关实验。

### 3. RNA 操作时所用的离心管、枪头等有 RNase 污染。

建议：确认 RNA 提取时所用到的离心管、枪头、移液器等都是 RNase-Free。

## 纯化获得的 RNA 影响下游实验

经纯化柱纯化的 RNA，如果盐离子、蛋白质含量过多会影响下游实验，比如：逆转录、Northern Blot 等。

### 1. 洗脱后的 RNA 有盐离子残留。

建议：确认 Buffer RW2 中添加了正确体积的乙醇，并按操作说明的离心转速进行 2 次纯化柱洗涤；如果还有盐离子残留，可在纯化柱加入 Buffer RW2 后，室温放置 5 min，再进行离心操作，以最大程度上去除盐离子污染。

### 2. 洗脱后的 RNA 有乙醇残留。

建议：确认 Buffer RW2 洗涤后，按操作说明的离心转速进行空管离心操作；如果还有乙醇残留，可以将空管离心操作的时间增加至 2 min，或者在空管离心后在室温放置 5 min，以最大程度上去除乙醇残留。

中国·凡晶      World's Foregene

成都凡晶生物技术有限公司

电话：028-83360257, 028-83361257

E-mail: [info@foregene.com](mailto:info@foregene.com)

[Http://www.foregene.com](http://www.foregene.com)

