

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: 2016-01

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 ≤ 2.5 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℃ 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℃ 保存 1 周, -20℃ 保存一个月, -8℃ 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	R4168-01	R4168-02	R4168-03
纯化次数	2 次	10 次	50 次
HiPure RNA Mini Columns I	2	10	50
gDNA Filter Mini Columns	2	10	50
2ml Collection Tubes	6	30	150
RNase Free Water	1.5 ml	60 ml	250 ml
Buffer MBR1	1.8 ml	10 ml	30 ml
Buffer MBR2	1 ml	5 ml	15 ml
Buffer MBR3	10 ml	10 ml	50 ml
Buffer MBR4*	5 ml	5 ml	20 ml
Buffer MBR5	1.8 ml	1.8 ml	10 ml
Proteinase K	6 mg	12 mg	50 mg
Protease Dissolve Buffer	2 ml	1.8 ml	5 ml
DNase I	120 µl	120 µl	10 mg
DNase Buffer	1 ml	6 ml	30 ml
说明书	1	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，请重新制配或重新订购。

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。

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 DNase I: 加入 650ul 的 Protease Dissolve Buffer 溶解 DNase I，颠倒混匀让 DNase I 充分溶解，溶解的 DNase I 须保存于-20~8℃。
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 x 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 x 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 500ul Buffer MBR1 至沉淀团中**，高速涡旋 15 秒打散沉淀。
 6. **加入 200ul Buffer MBR2 和 40ul Proteinase K 至裂解液中**。涡旋混匀 5 秒，55℃ 振荡温育 15 分钟。

7. 取 gDNA Filter Mini Column 柱装在 2ml 收集管中。把 700 μ l 混合液转移至 gDNA 过滤柱子中。10,000 \times g 离心 1 分钟。
8. 弃去 gDNA 过滤柱子。加入 400 μ l 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。8,000 \times 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。8,000 \times g 离心 1 分钟。
11. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。加入 350 μ l Buffer MBR3 至柱子上。8,000 \times 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	60 μ l
DNase I(20Units/ μ l)	10 μ l

13. 加 350 μ l Buffer MBR3 至柱子中。室温静置 5 分钟 8,000 \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 MBRR4 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. 弃去柱子，把洗脱产物放置于 65°C 水浴中放置 5 分钟，然后立即于冰上放置冷却样品变性 RNA。把 RNA 保存于-20°C 和-80°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 RW2 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: