

# R6814 Blood RNA Kit

## 简易中文步骤

√实验前请按说明书配制和保存以下溶液

- 试剂盒提供的 Buffer ERL 是 10×浓度溶液，使用前必须加入无酶去离子水（客户自备）进行稀释。

货号	加入量
R6814-00	加入 45mL 去离子水
R6814-01	将每瓶 Buffer ERL 全部转移到大小合适的瓶子中,加入 450mL 的去离子水。
R6814-02	

- 使用【无水乙醇】对 RNA Wash Buffer II 进行稀释，稀释后室温保存

货号	加入量
R6814-00	8mL
R6814-01	48mL
R6814-02	48mL (每瓶)

- 选做：制备 DNase I 消化混合液：每份 RNA 样品，需制备 1.5μl DNase I 和 73.5 μl DNase digestion buffer 的混合液。

### 提取步骤：

#### A. 血液 RNA 小量提取方案

1. 将 1 体积的血液与 5 体积的 1×Buffer ERL 混匀。(如 1mL 血液加入 5mL 1×Buffer ERL)

Note: 试剂盒提供的是 10×Buffer ERL, 使用前请用无酶去离子水稀释为 1×的使用。

2. 冰上放置 15min, 期间混匀 2 次。当溶液变为半透明时, 指示红细胞裂解。血细胞比容或 ECR 升高的个体血液样品需将孵育时间延长至 20min。

3. 4°C, 450xg 离心 10min 收集白细胞, 吸弃上清。

4. 加入 2 体积的 1×Buffer ERL 悬浮洗涤白细胞。如: 当血液处理量为 1mL 时, 则需要加入 2mL Buffer ERL。

5. 4°C, 450xg 离心 10min 收集白细胞, 吸弃上清即可得到一团白细胞。

6. 加入 100μl DEPC Water 悬浮白细胞。

7. 加入 MRC Lysis Buffer/β-巯基乙醇涡旋混匀。

如果步骤 1 中加入 ≤500μl 血液, 则加入 350μl MRC Lysis Buffer;

如果步骤 1 中加入 0.5mL-1.0mL 血液, 则加入 600μl MRC Lysis Buffer;

在加入 MRC Lysis Buffer 后, 样品可安全储存在-70°C中。

Note: β-巯基乙醇对于灭活内源 RNase 至关重要, 必须按比例加入 MRC Lysis Buffer

中。每 1mL MRC Lysis Buffer 加入 20 $\mu$ l  $\beta$ -巯基乙醇。该混合液可在室温下稳定储存两周。

8. 用带 20 号针头 (0.9mm) 的 RNase-Free 注射器上下吸打至少 5 次以匀浆白细胞。加入等体积的 70%乙醇, 用枪头吸打混匀样品。如果此时出现沉淀时, 尽量用枪吸打将之打散。

9. 将 HiBind<sup>®</sup> RNA Mini column 套入一个干净的 2mL 收集管(已提供)。转移步骤 8 所得的混合液至 HiBind<sup>®</sup> RNA Mini column 中(一次最多转移 800 $\mu$ l 溶液)。室温下, 10,000xg 离心 30s, 弃滤液。

10. 将 HiBind<sup>®</sup> RNA Mini column 套入同一个 2mL 收集管中, 如果需要进行 DNase I 消化处理, 加入 300 $\mu$ l RNA Wash Buffer I 至 HiBind<sup>®</sup> RNA Mini column 中, 室温下, 10,000xg 离心 30s, 弃滤液, 按步骤 11 操作。如果不需要进行 DNase 消化处理, 加入 700 $\mu$ l RNA Wash Buffer I 至 HiBind<sup>®</sup> RNA Mini column 中, 室温下, 10,000xg 离心 30s, 弃滤液, 按步骤 12 操作。

11. (选做) DNase 消化:

A. DNase I 混合液配制: 将 1.5 $\mu$ l DNase I 加入到有 73.5 $\mu$ l 的 DNase I Digestion 的 1.5mL 离心管中。轻柔颠倒混匀, 不要涡旋, DNase 对物理变性特别敏感。

B. 将配制好的 DNase I 混合物加入到 HiBind<sup>®</sup> RNA Mini column 中央, 室温静置 15min;

C. 加入 500 $\mu$ l RNA Wash Buffer I 至柱子中, 室温静置 5min, 10,000xg 离心 30s, 弃滤液和收集管。

12. 将 HiBind<sup>®</sup> RNA Mini column 套入到新的 2mL 收集管中, 加入 500 $\mu$ l RNA Wash Buffer II, 离心, 弃滤液;

Note: RNA Wash Buffer II 在使用前必须按照说明书加入无水乙醇稀释。

13. 重复步骤 12, 再次加入 500 $\mu$ l RNA Wash Buffer II 进行洗涤;

14. 将 HiBind<sup>®</sup> RNA Mini column 套入同一个 2mL 收集管中, 最大速度离心 2min 干燥柱子;

15. 将 HiBind<sup>®</sup> RNA Mini column 套入到新的 1.5mL 离心管中, 加入 30-50 $\mu$ l DEPC-treated water, 最大速度离心 1min。如果血液样品 > 0.5mL (> 2 $\times$ 10<sup>6</sup> 个细胞), 可以进行二次洗脱。

## **B. X-press 新鲜或冻存血液快提方案**

1. 取 150 $\mu$ l 血液样品至微量离心管中;

2. 加入 350 $\mu$ l MRC Lysis Buffer/ $\beta$ -巯基乙醇, 涡旋混匀 30s;

3. 在 65 $^{\circ}$ C 孵育 10min, 期间取出涡旋混匀 2 次;

4. 13,000xg 离心 3min, 转移 450 $\mu$ l 上清液至新的离心管中;
5. 加入 250 $\mu$ l 无水乙醇, 涡旋混匀 10s, 按照“方案 A”中“步骤 9”继续进行。

冻存的血液裂解红细胞和白细胞, 由于血红蛋白等污染物比较丰富, 超过 150 $\mu$ l 的冻存血液无法进行实验, 但不会对 RNA 的质量造成不利影响。由于白细胞中的 RNA 含量相对较低, 该方案的最大产量通常 < 1 $\mu$ g。对于 RT-PCR, 应使用 30 $\mu$ l 水进行 RNA 的单次洗脱, 以使得最终浓度最大化。

### C. 无细胞体液的病毒 RNA 提取 (血浆、血清、尿液等)

为获得更好的提取效果, 建议使用 R6874 病毒 RNA 提取试剂盒进行病毒 RNA 提取

1. 取不超过 5mL 的样品在 5,000xg 离心 20min;
2. 通过 0.22 $\mu$ l 的无菌过滤器过滤, 去除细胞, 该过程可避免将细胞核酸共同纯化。
3. 选做: 有些样品中可能的病毒粒子非常少, 可能需要使用离心微量浓缩器浓缩过滤样品。合适的装置包括 Centricon™100 (Amicon, 2mL, Cat#4211), Ultrafree™CL (Millipore, 2 mL, Cat# UFC4 THK 25) 等, 根据说明书中的方案离心 3-5mL 样品以获得 10-20 倍浓度 (最终体积 200-300 $\mu$ l)。
4. 将 150 $\mu$ l 样品加入到 1.5mL 的微量离心管中, 加入 750 $\mu$ l 含有 5 $\mu$ l yeast tRNA (客户自备) 的 MRC Lysis Buffer。加入 600 $\mu$ l 无水乙醇, 涡旋混匀。

Note: 每 1mL MRC Lysis Buffer 需加入 20 $\mu$ l  $\beta$ -巯基乙醇。

5. 按照“方案 A”中的步骤 8 继续实验, 使用 30-50 $\mu$ l DEPC-treated water 进行洗脱以获得更高浓度的 RNA。

中文翻译仅供辅助阅读, 详情请以英文说明书为准