



Toll-free:400-611-2007

Order:010-62617225 62979301

Email:zomanbio@126.com

Http://www.zomanbio.com

GREENspin全血RNA快速提取试剂盒

(目录号: ZP408)

ZOMANBIO

为生命科学研究探索提供每一款好的产品

北京庄盟国际生物基因科技有限公司
Beijing Zoman Biotechnology Co.,Ltd.

Order: 010-6261-7225

Free Phone: 400-611-2007

Technical: 010-6297-9301

Fax: 010-6296-8805

Email: zomanbio@126.com

Http://www.zomanbio.com

实验室使用，仅用于科研
北京庄盟国际生物基因科技有限公司
Beijing Zoman Biotechnology Co.,Ltd.

目录编号	包装单位
ZP408-01	50次
ZP408-02	100次

■ 适用范围：

适用于快速提取全血总RNA

■ 试剂盒组成、储存、稳定性：

试剂盒组成	保存	50次	100次
10X红细胞裂解液RLB	室温	25 ml	50ml
裂解液RLT	室温	50 ml	50 ml×2
去蛋白液RW1	室温	40 ml	80ml
漂洗液RW	室温	15ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇	15ml×2
RNase-free H ₂ O	室温	10 ml	20ml
70%乙醇	室温	9ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇	18ml
RNase-free 吸附柱RA和收集管	室温	50套	100套

本试剂盒在室温储存12个月不影响使用效果。

■ 储存事项：

1. 所有的溶液应该是澄清的，如果环境温度低时溶液可能形成沉淀，此时不应该直接使用，可在37°C水浴加热几分钟，即可恢复澄清。
2. 不合适的储存于低温（4°C或者-20°C）会造成溶液沉淀，影响使用效果，因此运输和储存均在室温下（15°C - 25°C）进行。
3. 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、PH值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。

■ 产品介绍：

红细胞裂解液选择性裂解红细胞,然后独特的裂解液/ β -巯基乙醇迅速裂解白细胞和灭活细胞RNA酶,然后用乙醇调节结合条件后,RNA在高离子盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜,再通过一系列快速的漂洗-离心的步骤,去蛋白液和漂洗液将细胞代谢物,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。

■ 产品特点：

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口世界著名公司特制吸附膜,柱与柱之间吸附量差异极小,可重复性好。克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。
2. 不需要使用有毒的苯酚,氯仿等试剂,也不需要乙醇沉淀等步骤。
3. 反复优化的红细胞裂解液配方,裂解效果快速完全。
4. 快速,简捷,单个样品操作一般可在40分钟内完成。
5. 多次柱漂洗确保高纯度,OD₂₆₀/OD₂₈₀典型的比值达1.9~2.0,基本无DNA残留,可用于RT-PCR, Northern-blot和各种实验。

■ 注意事项：

1. **第一次使用前请先在漂洗液RW瓶和70%乙醇瓶中加入指定量乙醇，加入后请及时打钩标记已加入乙醇，以免多次加入！**

2. **所有的离心步骤均在室温完成**，使用转速可以达到13,000 rpm的传统台式离心机，如Eppendorf 5415C 或者类似离心机。

3. 需要自备乙醇, β-巯基乙醇, 一次性注射器, 研钵。

4. 裂解液RLT 和去蛋白液RW1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，要用大量清水或者生理盐水冲洗。**

5. 预防RNase 污染，应注意以下几方面：

1) 经常更换新手套。因为皮肤经常带有细菌，可能导致RNase 污染。

2) 使用无RNase 的塑料制品和枪头避免交叉污染。

3) RNA 在裂解液RLT 中时不会被RNase 降解。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°C烘烤4 小时，塑料器皿可在0.5 M NaOH 中浸泡10 分钟，然后用水彻底清洗，再灭菌，即可去除RNase。

4) 配制溶液应使用无RNase 的水。（将水加入到干净的玻璃瓶中，加入DEPC至终浓度0.1%(v/v)，37°C放置过夜，高压灭菌。）

6. 关于DNA 的微量残留：

一般说来任何总RNA提取试剂在提取过程中无法完全避免DNA的微量残留,本公司的GREENspin系列RNA提取产品，由于采取了本公司独特的缓冲体系和选择了特殊吸附能力的吸附膜，在大多数RT-PCR 扩增过程中极其微量的DNA残留（一般电泳EB染色紫外灯下观察不可见）影响不是很大，如果要进行严格的mRNA表达量分析如荧光定量PCR,我们建议在模板和引物的选择时：

1) 选用跨内含子的引物,以穿过mRNA中的连接区,这样DNA就不能作为模板参与扩增反应。

2) 选择基因组DNA和cDNA上扩增的产物大小不一样的引物对。

3) 将RNA提取物用RNase-free的DNase I 处理。本试剂盒还可以用于DNase I处理后的RNA清洁(cleanup),请联系我们索取具体操作说明书。

4) 在步骤去蛋白液RW1漂洗前，直接在吸附柱RA上进行DNase I处理。请联系我们索取具体操作说明书。

7. RNA 纯度及浓度检测：

完整性：RNA 可用普通琼脂糖凝胶电泳（电泳条件：胶浓度1.2%；0.5×TBE电泳缓冲液；150v，15 分钟）检测完整性。由于细胞中70%-80%的RNA 为rRNA，电泳后UV 下应能看到非常明显的rRNA 条带。动物rRNA 大小分别约为5 kb 和2kb，分别相当于28S 和18S rRNA。动物RNA 样品中最大rRNA 亮度应为次大rRNA亮度的1.5-2.0 倍，否则表示RNA 样品的降解。出现弥散片状或条带消失表明样品严重降解。

纯度：OD260/OD280 比值是衡量蛋白质污染程度的指标。高质量的RNA，OD260/OD280 读数（10mMTris, pH7.5）在1.8-2.1 之间。OD260/OD280 读数受测定所用溶液的pH 值影响。同一个RNA 样品，假定在10mM Tris, pH7.5 溶液中测出的OD260/OD280 读数1.8-2.1 之间，在水溶液中所测读数则可能在1.5-1.9 之间，但这并不表示RNA 不纯。

浓度：取一定量的 RNA 提取物，用RNase-free 水稀释n 倍，用RNase-free水将分光光度计调零，取稀释液进行OD260, OD280 测定，按照以下公式进行RNA浓度的计算：终浓度（ng/μl）=（OD260）×（稀释倍数n）×40

■ 操作步骤：（实验前请先阅读注意事项）

提示：

- 第一次使用前请先在漂洗液RW瓶和70%乙醇瓶中加入指定量无水乙醇!
- 使用前将10X红细胞裂解液RLB用DEPC处理水稀释到1X。
- 操作前在裂解液RLT中加入 β -巯基乙醇至终浓度1%，如1 ml RLT 中加入10 μ l β -巯基乙醇。此裂解液最好现用现配。配好的RLT 4°C可放置一个月。

1. 在适合大小的RNase free离心管中加入1体积 (<1.5 ml) 加入各种抗凝剂新鲜血液 (颠倒混匀后)和3体积的红细胞裂解液RLB,颠倒混匀,可轻弹管壁,确保混匀。

2. 室温放置10分钟 (期间应该颠倒轻弹混匀数次帮助裂解红细胞)。

如果RNA降解严重,可在冰上裂解,但是时间可长一些以充分裂解。

3. 12,000 rpm离心20秒,倒弃红色上清,并小心的尽可能多的吸弃上清 (注意不要吸到管底的细胞团),留下完整的管底白细胞团。

离心后在管底应该见到白色的白细胞团,也可能有一些红细胞残片和白细胞团在一起,但是如果看到的是大部分的红色细胞团,说明红细胞裂解很不充分,应该再加入红细胞裂解液重悬细胞团后重复步骤2,3。

上清尽可能的吸弃,残留过多会稀释裂解液,造成裂解结合异常,产量纯度降低。

4. 涡旋或者轻弹管壁将白细胞沉淀完全松散重悬,加入350 μ l (<0.5 ml全血) 或者600 μ l (0.5-1.5ml全血) 裂解液RLT,吹打混匀后用手剧烈振荡20秒,充分裂解。病人血样中白细胞数量可能大幅增加,应该适当减少处理量。或者按照350 μ l (<2x10⁶白细胞) 或者600 μ l (2x10⁶-1x10⁷白细胞) 比例加RTL。

5. 用带钝针头的一次性 1 ml(配0.9mm针头) 注射器抽打裂解物 5-10 次或直到得到满意匀浆结果(或者电动匀浆30秒),可以剪切DNA,降低粘稠度和提高产量。

6. 较精确估计裂解物体积,加入等体积的70%乙醇 (请先检查是否已加入无水乙醇!),此时可能出现沉淀,但是不影响提取过程,立即吹打混匀,不要离心。

7. 将混合物(每次小于700 μ l,多可以分两次加入)加入一个吸附柱RA中,(吸附柱放入收集管中) 13,000 rpm离心30-60秒,弃掉废液。

8. 加700 μ l 去蛋白液RW1,室温放置30秒,12,000rpm 离心30秒,弃掉废液。

如果DNA残留明显,可在加入RW1后室温放置5分钟再离心。

9. 加入500 μ l漂洗液RW (请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000 rpm 离心30秒,弃掉废液。加入500 μ l漂洗液RW,重复一遍。

10. 将吸附柱RA放回空收集管中, 13,000 rpm离心2分钟,尽量除去漂洗液,以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。

11. 取出吸附柱RA,放入一个RNase free离心管中,根据预期RNA产量在**吸附膜的中间部位**加40-60 μ l RNase free water (事先在 70-80°C水浴中加热效果更好),室温放置1分钟,12,000 rpm 离心1分钟。

12. 如果提取全血>0.5 ml或者>2x10⁶白细胞,加40-60 μ l RNase free water重复步骤11,合并两次洗脱液,或者使用第一次的洗脱液加回到吸附柱重复步骤一遍(如果需要RNA浓度高)。

洗脱两遍的RNA洗脱液浓度高,分两次洗脱合并洗脱液的RNA产量比前者高15-30%,但是浓度要低,用户根据需要选择。