

GF-1 血液总 RNA 提取试剂盒说明书

版本 2.1

产品简介

GF-1 血液总 RNA 提取试剂盒, 用于从 1ml 新鲜或冷冻抗凝全血中分离总 RNA (长度超过 200 个碱基)。在一种特殊配制的灭活细胞 RNA 酶的缓冲液的存在下对样品进行裂解。同时, 样品通过加到一个特殊设计的均化柱后, DNA 片段被简单地去除, 随后通过 DNA 酶 I 处理。加入优化的缓冲液和乙醇, 可选择性地将 RNA 结合到柱子上, 污染物被有效地洗涤。高品质的 RNA 在无 RNase 水中被洗脱。分离的 RNA 备用于下游应用, 如去磷酸化, 杂交, cDNA 的合成等。

试剂盒组成成份

产品目录号	5 次 样品	25 次 CN/GF- TB-025	100 次 CN/GF- TB-100	200 次 CN/GF- TB-200
组份				
均化柱(Homogenization columns)	5	25	100	200
RNA 吸附柱 (RNA binding columns)	5	25	100	200
收集管 (Collection tubes)	10	50	200	400
缓冲液 BR* (Buffer BR*)	2ml	10ml	40ml	80ml
抑制剂去除缓冲液* (Inhibitor Removal Buffer*)	1.5ml	8ml	30ml	60ml
洗涤液* (Wash Buffer*)	3ml	15ml	2 x30ml	4 x30ml
蛋白酶 K* (Proteinase K*)	0.11ml	0.55ml	2 x1.05 ml	4 x1.05 ml
DNA 酶 I* (DNase I*)	0.04ml	0.2ml	0.8ml	2 x0.8 ml
消化缓冲液 (Digestion Buffer)	0.35ml	2ml	8ml	16ml
消化增强剂 (Digestion Enhancer)	0.04ml	0.2ml	0.8ml	1.6ml
无 RNA 酶水 (RNase-free Water)	1ml	10ml	30ml	60ml
使用说明 (Handbook)	1	1	1	1

注意: 标*的请参照配制方案以及其储存条件和稳定性。

GF-1 血液总 RNA 提取试剂盒有 25 次、100 次、200 次包装。本试剂盒仅供研究使用。

自备材料

80%乙醇

无水乙醇 (>95%)

β-巯基乙醇

配制方案

贴有抑制剂去除缓冲液和洗涤液标签的浓缩液, 在使用前需用无水乙醇 (>95%) 稀释。

样品 (5 次):

在抑制剂去除缓冲液中加入 1.5ml 无水乙醇。

在洗涤液中加入 7ml 无水乙醇。

CN/GF-TB-025 (25 次):

在抑制剂去除缓冲液中加入 8ml 无水乙醇。

在洗涤液中加入 35ml 无水乙醇。

CN/GF-TB-100 (100 次):

在抑制剂去除缓冲液中加入 30ml 无水乙醇。

在洗涤液中加入 70ml 无水乙醇。使用完后再以同样的方法稀释第二瓶洗涤液。

CN/GF-TB-200 (200 次):

在抑制剂去除缓冲液中加入 60ml 无水乙醇。

在洗涤液中加入 70ml 无水乙醇。使用完后再以同样的方法稀释第二瓶洗涤液。

DNA 酶 I 对物理变性处理非常敏感, 混匀时轻轻颠倒试管混匀, 不能漩涡振荡。按 7 μl 每支分装, 避免反复冻融, -20°C 保存。

抑制剂去除缓冲液和洗涤液使用后拧紧瓶盖, 室温保存。

储存及稳定性

- 所有溶液 (除 DNA 酶 I 和蛋白酶 K) 20°C-30°C 保存。
- DNA 酶 I 和蛋白酶 K -20°C 保存。
- 缓冲液 BR 加入 β-巯基乙醇后能保存一个月 (根据需要准备)。试剂盒各组份自生产之日起可稳定保存 12 个月。缓冲液 BR 和抑制剂去除缓冲液在室温过低时易出现结晶, 使用前请置于 55°C-65°C 环境中至晶体完全溶解。

化学危害

缓冲液 BR 和抑制剂去除缓冲液含有胍盐, 当接触皮肤或吞服时可能造成危害。使用时一定要戴上手套并做好安全防护措施。不能将含有漂白剂或任何形式的酸性溶液加入到含有胍盐的提取废料中来进行消毒。清洁沾染试剂的物品, 不需要用漂白剂和酸性溶液清洗, 只需浸泡在洗涤剂和水即可除去胍盐。

操作步骤

提示

- 所有操作均在室温下进行, 除非另有说明。
- 血液样本体积不要超过 1ml, 以防止降低产量和纯度。
- 在整个提取过程中需戴上手套, 防止带入 RNA 酶。
- 预先设定 65°C 水浴锅。
- 使用前, 1ml 缓冲液 BR 中加入 10 μl β-巯基乙醇, 加入了 β-巯基乙醇的缓冲液 BR 能保存一个月。
- DNA 酶 I 消化混合液的准备:

DNA 酶 I	7 μl
消化缓冲液	56 μl
消化增强剂	7 μl

轻轻吹打混匀 DNA 酶 I 消化混合液 (不能振荡混匀)。当进行 RNA 提取的初始步骤时, 将 DNA 酶 I 消化混合液保存在冰盒中备用。

1、血液裂解

取一个干净的微量离心管, 加入 400 μl 血液样本, 样本中再加入 300 μl 缓冲液 BR, 脉冲漩涡振荡充分混匀。加入 180 μl 无 RNase 水和 20 μl 蛋白酶 K, 立即混匀。65°C 温育 10 分钟。

注: 确保在使用前 β-巯基乙醇已加入到缓冲液 BR 中。血液样本白细胞的数量不尽相同, 取决于个体、年龄、供体的健康状况和储存时间。处理过多的细胞可能导致玻璃滤膜超载, 因此, 确保样

本中的白细胞数量不超过 5×10^6 个。如果样本体积小于 $400 \mu\text{l}$ ，加入相同体积的缓冲液BR，并用无RNase水补足至总体积为 $880 \mu\text{l}$ 。如果样本体积大于 $400 \mu\text{l}$ ，按照比例调整缓冲液BR和无RNase水的体积。

2、从细胞碎片中分离

以最大转速离心 3 分钟。

3、装载到均化柱

取 $650 \mu\text{l}$ 裂解产物至带有收集管的均化柱中，以最大转速离心 2 分钟，保留通过柱子的液体至一干净的 1.5ml 微量离心管中。重复步骤 2 中剩余的样本。

4、加入乙醇

加入 0.5 倍体积的 80% 乙醇至上述通过柱子的液体中，反复吹打至充分混匀。

5、装载到RNA吸附柱

将最大体积不超过 $650 \mu\text{l}$ 上述液体，包括任何沉淀物转移至带有收集管的RNA吸附柱中， $10,000 \times g$ ($11,000 \text{ rpm}$) 离心 1 分钟，丢弃废液。

6、柱子洗涤 1

加入 $500 \mu\text{l}$ 洗涤液，以最大转速离心 1 分钟，丢弃废液。

注：使用前确保洗涤液已用无水乙醇稀释（参照配制方案）。

7、DNA酶I消化

吸取 $70 \mu\text{l}$ DNA酶I消化混合液至RNA吸附柱中，室温温育 15 分钟。

注：有些样本基因组 DNA 含量较高，如有必要，延长温育时间（需凭经验确定）。

8、抑制剂去除

加入 $500 \mu\text{l}$ 抑制剂去除缓冲液，以最大转速离心 1 分钟，丢弃废液。

注：使用前确保抑制剂去除缓冲液已用无水乙醇稀释（参照配制方案）。

9、柱子洗涤 2

加入 $500 \mu\text{l}$ 洗涤液， $10,000 \times g$ ($11,000 \text{ rpm}$) 离心 1 分钟，丢弃废液。重复洗涤一次， $10,000 \times g$ ($11,000 \text{ rpm}$) 离心 1 分钟，丢弃废液。

注：使用前确保洗涤液已用无水乙醇稀释（参照配制方案）。

10、柱子干燥

$10,000 \times g$ ($11,000 \text{ rpm}$) 离心柱子 1 分钟，除去残留乙醇。

注：务必去除残留乙醇，因为乙醇会抑制后续反应。

11、RNA洗脱

将RNA吸附柱放入一干净的微量离心管中，取 $40-60 \mu\text{l}$ 无RNase水直接分配到柱子的膜中央，室温静置 1 分钟， $10,000 \times g$ ($11,000 \text{ rpm}$) 离心 1 分钟。RNA -20°C 或 -80°C 保存。

注：确保无RNase水被直接分配到膜中央。

故障排除

不按照给定的说明进行操作将会出现不符合标准的结果，将影响 RNA 的得率和质量，如果出现此类问题，请参照以下内容处理：

问题	可能的原因	建议
均化柱堵塞	样品材料过多	使用新样本重新提取，减少样品材料。
	裂解产物太粘稠	可以用裂解液再作稀释。
RNA 得率低	样品转移至 RNA 吸附柱之前没有加入 80% 乙醇	使用新样本重新提取。
	配制错误浓度的乙醇（乙醇浓度不是 80%）	使用新样本重新提取。
	抑制剂去除缓冲液和洗涤液的浓缩液未稀释	请参照“配制方案”。使用新样本重新提取。
RNA 降解或污染	样本保存不当	新鲜血液样本应 4°C 保存，采集后数小时内处理。
		如不立即处理， -70°C 保存。
	处理不当	冷冻的血液样本应在冰盒里解冻。
		使用一次性塑料耗材和吸头。
		确保在无 RNA 酶环境中提取，整个实验过程带手套。
基因组 DNA 污染	样品转移至 RNA 吸附柱之前没有加入 80% 乙醇	使用新样本重新提取。
	配制错误浓度的乙醇（乙醇浓度不是 80%）	使用新样本重新提取。
	裂解产物转移至 RNA 吸附柱之前没有通过均化柱	使用新样本重新提取。
	没有正确进行 DNA 酶 I 消化	请参照 DNA 酶 I 消化混合液的准备方案并吸取 DNA 酶 I 消化混合液直接加至 RNA 吸附柱的膜中央。
洗脱的 RNA 在下游应用中性能差	洗脱下来的 RNA 含有残留乙醇	确保在洗脱之前柱子已进行离心干燥。
	RNA 降解	请参照问题“RNA 降解或污染”。

上海凯斯泰尔生物科技有限公司

地址：上海市浦东新区康新公路 3377 号 2 号楼 604 室

电话：021-68060114

传真：021-68060114

邮箱：info@kestrel-china.com

网址：www.kestrel-china.com

Vivantis Technologies Sdn Bhd

1012 S.Coast Highway Suite 1,Oceanside CA 92054, USA.

Tel: +6 03 8025 1603

Fax: +6 03 8025 1637

Email: info@vivanttechnologies.com

international@vivanttechnologies.com

Web: www.vivanttechnologies.com