

**AipPure 超纯全血总 RNA 快速提取试剂盒, TRIzol LS 法(离心柱型)**  
AipPure Ultra-Pure Whole Blood Total RNA Rapid Extraction Kit, TRIzol LS(Centrifugal Column)

**使用说明书**

◆目录号: RE230

◆试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	50 次(RE230-01)
10X 红细胞裂解液 RLB	室温	25mL
裂解液 RL	4°C(避光)	50mL
去蛋白液 RE	室温	25mL
漂洗液 RW	室温	10mL 第一次使用前按说明加指定量乙醇
RNase-free Water	室温	10mL
70%乙醇	室温	9mL RNase-free Water 第一次使用前按说明加指定量乙醇
吸附柱 RA 和 2mL 收集管 (RNase-free)	室温	50 套

◆适用范围: 适用于快速提取全血高纯度总 RNA。

◆储存条件: 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。裂解液 RL 可以常温运输, 收到后 4°C 避光保存。
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: 改进的异硫氰酸胍/酚一步法(TRIzol 法)裂解细胞和灭活 RNA 酶, 然后总 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 Water 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. 结合了异硫氰酸胍/酚一步法试剂稳定性好, 纯度高和离心柱方便快捷的优点, 不需要异丙醇沉淀和乙醇洗涤过程, RNA 可以直接从离心柱上洗脱避免了过度干燥不易溶解问题。
3. 独有的 RL 裂解液配方, 可以有效的消除基因组污染。
4. 多次漂洗去蛋白过程, 提取 RNA 纯度更高。
5. 有效的去除了 5S 在总 RNA 中含量, 提高了纯度。

◆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. 所有离心步骤如未加说明, 均在室温进行。使用转速可以达到13000 rpm 的传统台式离心机, 如Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
3. 裂解液RL和去蛋白液RE中含有刺激性有害化合物, 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。
4. 考虑到环保问题, 本试剂盒不含有实验室常用试剂氯仿, 用户使用前需要自备氯仿。
5. 常规的琼脂糖凝胶电泳和变性胶电泳均可以用来分析RNA的质量。好的RNA产物在电泳后应该可以看到明显的二条优势核糖体RNA带, 分别为~5kb(28S), ~2kb(18S), 条带亮度比值约为2: 1。有时候也可以看到~0.1kb和0.3kb(5S, tRNA)带。但有时候根据不同的物种如某些植物组织可以看到4, 5条带也属于正常现象, 如果RNA未成熟的前体或者不均一核RNA、小核RNA提取出来也可能看到介于7kb和15kb之间的不连续的高分子量条带。
6. 检测OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>吸光度比值时, RNA样品应该溶于TE后检测, 如果用水稀释后检测, 由于一般水离子强度和PH值低, 会使OD<sub>280</sub>升高, 从而使比值降低。
7. 加入裂解液RL匀浆后, 加氯仿前, 样品可在 -60°C-70°C 保存一个月以上。
8. 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, 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, 我们建议在进行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。
- 4) 在步骤去蛋白液 RE 漂洗后, 直接在吸附柱 RA 上进行 DNase I 消化处理。

◆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乙醇! 使用前将10X红细胞裂解液RLB用DEPC处理水稀释到1X。

1. 在适合大小的RNase-free离心管中加入1体积(0.5-1.0mL)加入各种抗凝剂的新鲜血液(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。  
**注:** 病人血样中白细胞数量可能大幅增加或减少, 应该适当增加或减少处理量。
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)。  
**注:** 如果RNA降解严重, 可在冰上裂解, 但是时间可延长一些以充分裂解。
3. 离心机12000 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。  
**注:** 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。  
**注:** 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1mL的RL, 用移液枪反复吹打来裂解细胞。
5. 将匀浆样品剧烈震荡混匀, 在15 -30°C条件下孵育5分钟以使核蛋白体完全分解。
6. 每1mL RL加0.2mL氯仿, 盖紧样品管盖, 剧烈振荡15秒并室温下放置2分钟。
7. 于4°C 12,000 rpm 离心10分钟, 样品会分成三层: 下层有机相, 中间层和上层无色的水相, RNA存在于水相中。水相层的容量大约为所加RL体积的60%, 把水相转移到新管中, 进行下一步操作。
8. 加入等体积70%乙醇(请先检查是否已加入无水乙醇!), 颠倒混匀(此时可能会出现沉淀)。得到的溶液和可能沉淀一起转入吸附柱RA中(吸附柱套在收集管内, 若一次不能将全部溶液和混合物加入吸附柱RA中, 请分两次转入吸附柱RA中)。
9. 离心机12,000 rpm 离心45秒, 弃掉废液, 将吸附柱重新套回收集管。
10. 加500μL 去蛋白液RE, 12,000 rpm 离心45秒, 弃掉废液。
11. 加入500μL漂洗液RW(请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000 rpm 离心45秒, 弃掉废液。
12. 加入500μL漂洗液RW, 12,000 rpm 离心45秒, 弃掉废液。
13. 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。

14. 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50-80 $\mu$ L的RNase-free Water(事先在65-70 $^{\circ}$ C水浴中加热效果更好)，室温放置2分钟，12,000 rpm 离心1分钟。如果需要较多RNA，可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，离心1分钟，或者另外再加30 $\mu$ L的RNase-free Water，离心1分钟，合并两次洗脱液。

**注** 洗脱体积越大，洗脱效率越高，如果需要RNA浓度较高，可以适当减少洗脱体积，但是最小体积最好不少于30 $\mu$ L，体积过小降低RNA洗脱效率，减少RNA产量。

=====

