



(DP433) 血液总RNA提取试剂盒操作指南

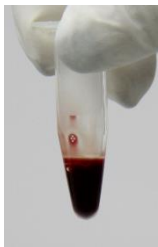
天根生化科技（北京）有限公司

版本号：20170331

WWW.TIANGEN.COM

实验准备

1. 新鲜血液样品（200 μ l）
2. 无水乙醇， β -巯基乙醇
3. 一次性无菌注射器（DNase I配置），移液器及配套RNase-Free无菌枪头（200 μ l，1ml）1.5 ml，2.0ml 离心管（RNase-free）
4. 通风橱 涡旋振荡器 金属浴 台式低温离心机



实验准备-试剂盒准备1

第一次使用前应在漂洗液RW中加入无水乙醇，加入量请参见瓶上标签。并在加入无水乙醇后在瓶身做好标记。

DNase I储存液的配制

将DNase I干粉（1500 U）溶解在550 μ l RNase-Free ddH₂O中，轻柔混匀，分装后-20 $^{\circ}$ C贮存（可保存9个月）。



注意：从-20 $^{\circ}$ C融化后的DNase I储存液保存于4 $^{\circ}$ C（可保存6周），不要再次冻存。

实验准备-试剂盒准备2

建议在通风橱内操作

操作前在RL中加入 β -巯基乙醇至终浓度为1%，如1 ml RL中加入10 μ l β -巯基乙醇。此裂解液最好现用现配。配好的RL 4°C可放置一个月，裂解液RL在储存时可能会形成沉淀，如果有沉淀出现，请加热溶解后使用。



Step 1



红细胞裂解液的稀释

如待处理的血液样品体积为200 μl ，则取140 μl 10 \times 红细胞裂解液，用RNase-Free ddH₂O稀释至1 \times 红细胞裂解液。

如同时提取多个样品，建议混合统一配置DNase I工作液。如样品较多建议在配置时预留出一定的量，以免因移液器的误差或枪头吸附造成总量不够的情况。

Step 2



向200 μ l人类全血中加1 ml
1 \times 红细胞裂解液

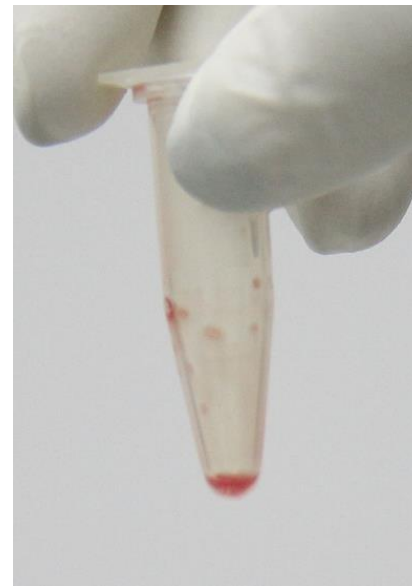
Step 3



在冰上孵育10-15 min，在孵育过程中涡旋振荡混匀2次。

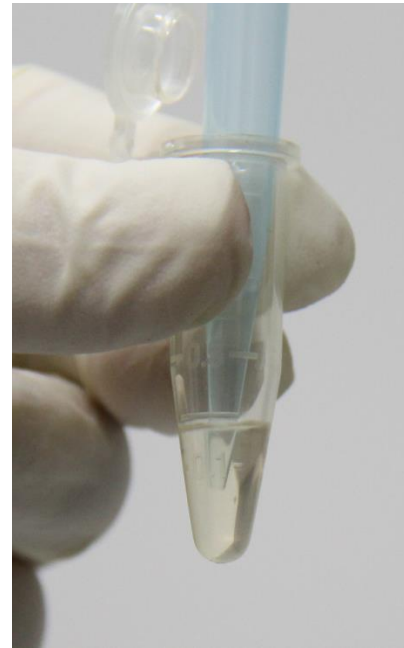
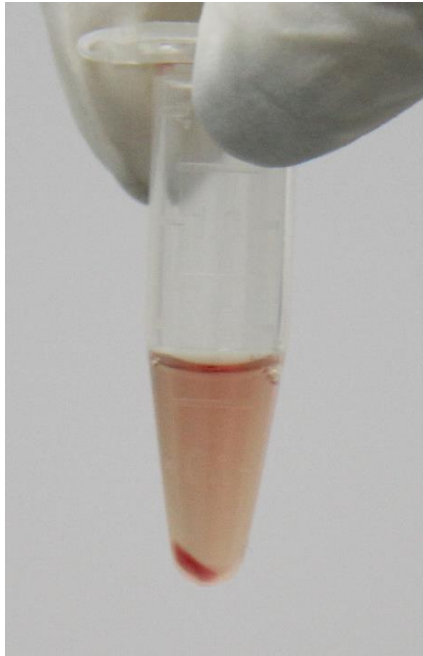
注意：在孵育的过程中溶液将变成半透明状态，表明红细胞裂解。如果必要的话，孵育时间可延长至20 min。

Step 4



4°C 2,100 rpm (~400×g)离心10 min, 将上清完全去除。

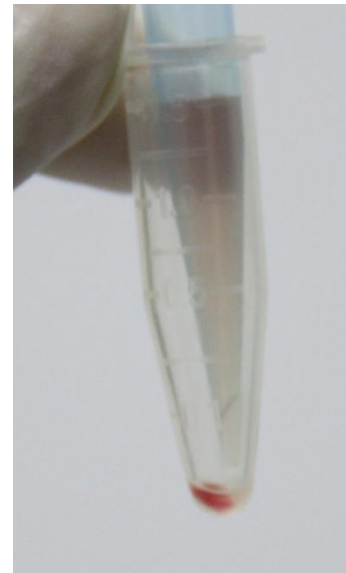
Step 5



向白细胞沉淀中加入1×红细胞裂解液（加入1×红细胞裂解液的体积是第1步中全血用量的2倍）

用移液枪反复吹打重悬细胞

Step 6



4°C, 2,100 rpm (~400×g)离心10 min, 将上清完全去除。

Step 7

向白细胞沉淀中加入裂解液RL（使用前请加入 β -巯基乙醇），具体加量按照下表进行，涡旋或使用移液器混匀。

注：如果血液不是健康人的全血，需要根据血液中白细胞的数量来确定所需裂解液RL的体积，此时细胞应完全裂解，块状细胞沉淀消失。



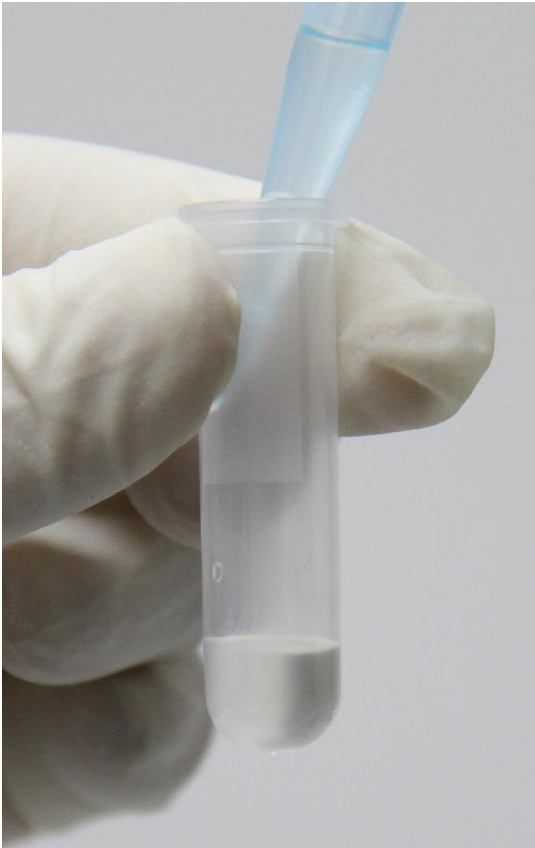
裂解液RL(μ l)	健康人类全血(ml)	白细胞数量
350	小于0.5	多至 2×10^6
600	0.5-1.5	2×10^6 至 1×10^7

Step 8



将溶液转移至过滤柱CS中（过滤柱CS放在收集管中），12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$)离心2 min，弃去过滤柱CS，收集滤液。

Step 9



向滤液中加入1倍体积70%乙醇，混匀（此时可能会出现沉淀），得到的溶液和沉淀一起转入吸附柱CR2中，12,000 rpm($\sim 13,400 \times g$)离心30-60sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CR2放回收集管中。

Step 10



向吸附柱CR2中加入350 μ l 去蛋白液RW1，
12,000 rpm(\sim 13,400 \times g)离心30-60 sec，
弃废液，将吸附柱放回收集管中。

Step 11



DNase I 工作液的配制:

以一个样品为例：取10 μl DNase I 储存液放入新的RNase-free离心管中，加入70 μl RDD溶液，轻柔混匀（用移液枪轻柔吹打混匀）。

如同时提取多个样品，建议混合统一配置DNase I 工作液。如样品较多建议在配置时预留出一定的量，以免因移液器的误差或枪头吸附造成总量不够的情况。

Step 12



向吸附柱CR2中央加入80 μ l
的DNase I 工作液，
室温放置15 min。

Step 13



向吸附柱CR2中加入350 μ l 去蛋白液RW1，
12,000 rpm(\sim 13,400 \times g)离心30-60 sec，
弃废液，将吸附柱放回收集管中。

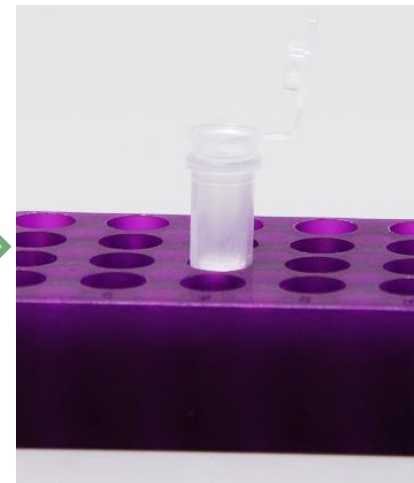
Step 14



向吸附柱CR2中加入500 μ l漂洗液RW
(使用前请先检查是否已加入乙醇)，
室温放置2 min，12,000 rpm(\sim 13,400 \times g)
离心30-60 sec，倒掉废液，将吸附柱CR2
放回收集管中。

Step 15 重复操作步骤14

Step 16



将吸附柱放入新的2 ml收集管中，
12,000 rpm (~13,400 × g) 离心2 min，去除残余液体。

离心后将吸附柱CR2在室温放置片刻，或置于超净工作台上通风片刻，以充分晾干。

注意：漂洗液中乙醇的残留会影响后续的酶反应（RT、qPCR等）实验。
但也不要时间过长以免过分干燥核酸不易溶解或RNA降解。

Step 17



将吸附柱CR2转入试剂盒自带的离心管中，加30–50 μl RNase-Free ddH₂O，室温放置2 min，4°C 12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$)离心2 min。

洗脱缓冲液体积不应少于30 μl ，体积过小影响回收效率。且RNA应保存在-70°C，以防降解。