

Version: AC 6.0 (2024.02.22修订)

SPARKeasy whole blood total RNA Kit

全血总RNA快速提取试剂盒

(离心柱型)

目录号: AC0901

01/产品组分

序号	组分	50 次 AC0901
1	10×红细胞裂解液 RLB	25 mL
2	裂解液 RLT	30 mL
3	去蛋白液 RW1	40 mL
4	漂洗液 RW	10 mL 第一次使用前加入 42 mL 无水乙醇
5	70%乙醇	9 mL RNase Free H ₂ O 第一次使用前加入 21 mL 无水乙醇
6	RNase Free H ₂ O	10 mL
7	RNase Free 吸附柱 RA 和收集管	50 套
8	RNase-Free 收集管 (1.5 mL)	50 个

02/保存条件

本试剂盒所有组分室温 (15-25°C) 保存。

03/产品概述

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 在高离序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去蛋白、漂洗的步骤将细胞代谢物、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。该产品可在 30 min 内完成样品 RNA 的提取, 提取的总 RNA 完整性好, 无蛋白和基因组 DNA 污染。

04/自备材料

无水乙醇、β-巯基乙醇

05/注意事项

请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项

- ◇ 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，充分混匀，加入后请及时在方框打钩标记已加入乙醇，以免多次加入！
- ◇ 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。
- ◇ 所有离心操作步骤，均在室温（15-25°C）下进行。
- ◇ 使用前将 10×红细胞裂解液 RLB 用 DEPC 处理水稀释到 1×。
- ◇ 操作前在裂解液 RLT 中加入β-巯基乙醇至终浓度 1%，如 1 mL 裂解液 RLT 中加入 10 μLβ-巯基乙醇。此裂解液最好现用现配，配好的裂解液 RLT 4°C可放置一个月。

06/使用方案

1. 在适合的 RNase Free 离心管中加入 1 倍体积 (<1.5 mL) 加入各种抗凝剂新鲜血液（颠倒混匀后）和 3 倍体积的 1×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 min（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 (13,400×g) 离心 20 s，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 μL (<0.5 mL 全血) 或者 600 μL (0.5-1.5 mL 全血) 裂解液 RLT，吹打混匀后用手剧烈振荡 20 s，充分裂解。
 - ▲病人正常血样白细胞数量为 4000-7000/μL，如果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 μL (<2×10⁶ 白细胞) 或者 600 μL (2×10⁶-1×10⁷ 白细胞) 比例加裂解液 RLT。
5. 用吸头吹打混匀帮助裂解或者剧烈涡旋震荡直到得到满意匀浆结果（或者电动匀浆 30 s），可以剪切 DNA，降低粘稠度和提高产量。

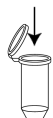
6. 较精确估计裂解物体积，加入等体积的 70%乙醇（请先检查是否已加入无水乙醇!），此时可能出现沉淀，但是不影响提取过程，立即吹打混匀，不要离心。
7. 立刻将混合物（每次小于 700 μL ，多可以分两次加入）加入一个吸附柱 RA 中（吸附柱放入收集管中），12,500 rpm（14,500 \times g）离心 60 s，弃废液。
8. 加 700 μL 去蛋白液 RW1，室温放置 1 min，12,000 rpm（13,400 \times g）离心 30 s，弃废液。
9. 加入 500 μL 漂洗液 RW（请先检查是否已加入无水乙醇!），12,000 rpm（13,400 \times g）离心 30 s，弃废液。加入 500 μL 漂洗液 RW，重复一遍。
10. 将吸附柱 RA 放回空收集管中，12,500 rpm（14,500 \times g）离心 2 min，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 30-50 μL RNase Free H_2O （事先在 70-80 $^\circ\text{C}$ 水浴中加热效果更好），室温放置 1 min，12,000 rpm（13,400 \times g）离心 1 min。
12. 如果提取全血 >0.5 mL 或者 $>2\times 10^6$ 白细胞，加 30-50 μL RNase Free H_2O 重复步骤 11，可以得到更多的 RNA，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）。

▲使用第一次洗脱液重复洗脱两遍的 RNA 浓度高，分两次洗脱后如果合并洗脱液的 RNA 产量比前者高 15-30%，但是浓度要低，用户根据需要选择。

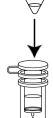
07/流程简图



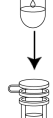
裂解红细胞：1 体积各种抗凝剂新鲜血液，颠倒混匀
3 体积的 1 \times 红细胞裂解液 RLB，颠倒混匀，室温 10 min
13,400 \times g 离心 20 s，弃红色上清



裂解白细胞：600 μL （0.5-1.5 mL 全血）
裂解液 RLT（已加 β -巯基乙醇），充分裂解



结合：等体积的 70%乙醇，立即吹打混匀
分次转移混合物至吸附柱 RA，14,500 \times g 离心 60 s，弃滤液



去蛋白：700 μL 去蛋白液 RW1，室温 1 min，13,400 \times g 离心 30s，弃滤液
漂洗：500 μL 漂洗液 RW，13,400 \times g，离心 30 s，弃滤液，重复一次
去残留乙醇：14,500 \times g 空甩 2 min



洗脱：30-50 μL RNase Free H_2O ，室温 1 min
13,400 \times g 离心 1 min，可重复洗脱一次，储存于 -70 $^\circ\text{C}$

08/相关产品

AA1102 SPARKeasy 全血基因组DNA快速提取试剂盒（小量、含蛋白酶K）

AC0902 SPARKeasy 冻存全血总RNA提取试剂盒

AG0304 SPARKscript II RT Plus Kit（With gDNA Eraser）

AG0305 SPARKscript II All-in-one RT SuperMix for qPCR（With gDNA Eraser）

AH0104 2×SYBR Green qPCR Mix（With ROX）

本产品仅用于科学研究！

Tel: 0531-82387577

Web: <http://www.sparkjade.com>

Support: support@sparkjade.com

