

Version: AC 6.0 (2024.02.22修订)

SPARKeasy Superpure blood total RNA kit

超纯全血总RNA快速提取试剂盒

(离心柱型)

目录号: AC0903

01/产品组分

序号	组分	50 次 AC0903
1	10×红细胞裂解液 RLB	25 mL
2	裂解液 RL	50 mL
3	去蛋白液 RE	25 mL
4	漂洗液 RW	10 mL 第一次使用前加入 42 mL 无水乙醇
5	RNase Free H ₂ O	10 mL
6	70%乙醇	9 mL RNase Free H ₂ O 第一次使用前加入 21 mL 无水乙醇
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

裂解液RL于4°C避光保存, 其他组分室温 (15-25°C) 保存。

03/产品概述

改进的异硫氰酸胍/酚一步法裂解细胞和灭活 RNA 酶, 然后总 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 50 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、氯仿、DEPC 水

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，加入后请及时打钩标记已加入乙醇，以免多次加入！
- ◇ 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。
- ◇ 所有离心操作步骤，均在室温（15-25℃）下进行。
- ◇ 使用前将 10×红细胞裂解液 RLB 用 DEPC 处理水稀释到 1×。

06/使用方案

1. 在适合的 RNase Free 离心管中加入 1 倍体积的（0.5-1.0 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。
 - ▲ 病人血样中白细胞数量可能大幅增加或者减少，应该适当增加或者减少处理量。
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 1 mL 的裂解液 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℃ 条件下孵育 5 min 以使核蛋白体完全分解。
6. 每 1 mL 裂解液 RL 加 0.2 mL 氯仿。盖紧样品管盖，剧烈振荡 15 s 并室温下放置 2 min。
7. 于 4℃ 12,000 rpm（13,400×g）离心 10 min，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裂解液 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. 12,000 rpm（13,400×g）离心 45 s，弃掉废液，将吸附柱重新套回收集管。
10. 加 500 μL 去蛋白液 RE，12,000rpm（13,400×g）离心 45 s，弃掉废液。
11. 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×g）离心 45 s，弃掉废液。加入 500 μL

漂洗液 RW，重复一遍。

12. 将吸附柱 RA 放回空收集管中，12,500 rpm (14,500×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。

13. 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 H₂O（事先在 65-70°C 水浴中加热效果更好），室温放置 2 min，12,000 rpm (13,400×g) 离心 1 min。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 min，或者另外再加 30 μL RNase Free H₂O，离心 1 min，合并两次洗脱液。

▲ 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，但是最小体积应不少于 30 μL，体积过小会降低 RNA 洗脱效率，减少 RNA 产量。

07/流程简图



裂解红细胞：1体积（0.5-1.0 mL）各种抗凝剂新鲜血液（颠倒混匀后）
3体积的**1×红细胞裂解液RLB**，颠倒混匀
室温10 min，13,400×g离心20 s

裂解白细胞：弃红色上清，轻弹管壁重悬白细胞
1 mL**裂解液RL**，吹打混匀，15-30 °C 5 min，充分裂解

分层：0.2 mL氯仿，剧烈振荡15 s
室温2 min，4°C，13,400×g离心10 min

结合：转移上层水相至新管，等体积的**70%乙醇**
颠倒混匀，转移混合液至**吸附柱RA**，13,400×g离心45 s，弃滤液

去蛋白：500 μL**去蛋白液RE**，13,400×g离心45s，弃滤液
漂洗：500 μL**漂洗液RW**，13,400×g离心45 s，弃滤液，重复一遍
去残留乙醇：14,500×g空甩2 min

洗脱：30-50 μL **RNase Free H₂O**，室温2 min，13,400×g离心1 min
可重复洗脱一次，储存于-70°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）

AC0901 SPARKeasy 全血总RNA 快速提取试剂盒

AC0902 SPARKeasy 冻存全血总RNA 快速提取试剂盒

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

