



核酸提取或纯化试剂 说明书

【产品名称】

核酸提取或纯化试剂

【包装规格】

50次/盒

【预期用途】

用于核酸提取、富集、纯化步骤。其处理后的产物用于临床体外检测使用。

【检验原理】

本产品从新鲜血液样本中提取RNA。红细胞裂解液去除血液中的红细胞，白细胞裂解后，RNA特异性结合到吸附柱上，通过两步洗涤可有效地去除血红素、肝素等酶抑制剂和污染物，结合在吸附柱上的RNA可用水或试剂盒中的缓冲液洗脱。得到的RNA可用于各种分子生物学常规实验，如RT-PCR、荧光定量PCR、Northern Blot、Dot Blot、体外翻译等。

【主要组成成分】

试剂名称	50测试/盒	
	规格	数量
红细胞裂解液 (10×)	60 mL/瓶	1 瓶
裂解缓冲液	35 mL/瓶	1 瓶
漂洗缓冲液1	40 mL/瓶	1 瓶
漂洗缓冲液2 (浓缩液)	11 mL/瓶	1 瓶
洗脱缓冲液	10 mL/瓶	1 瓶
过滤柱	50 个/包	1 包
吸附柱	50 个/包	1 包
离心管	50 个/包	1 包

需要实验者自行准备的试剂： β -巯基乙醇、无水乙醇（分析纯）、70%乙醇（无RNase水配制）。

【储存条件及有效期】

0-35℃保存，有效期12个月。

可在0-40℃运输，运输时间建议不超过7天。

【样本要求】

1. 适用标本类型：新鲜全血（用柠檬酸盐、EDTA或肝素等抗凝剂处理过的血液样品）。
2. 标本处理与保存：新鲜血液样本应尽快处理，避免反复冻融。
3. 样本运输：应采用冰壶或者泡沫箱加冰或干冰密封运输。

【检验方法】

实验前准备：红细胞裂解液（10×）需在使用前用无RNase的水进行10倍稀释，成为红细胞裂解液（1×），红细胞裂解液（1×）置于2-8℃保存。

1. 向0.5-1.5mL新鲜的抗凝全血样本中，加入5倍体积的红细胞裂解液（1×），轻轻涡旋或颠倒混匀。冰上孵育10-15分钟，孵育过程中混匀两次。

注意：孵育过程中浑浊的悬液会变透明，证明红细胞被裂解，必要时可以把孵育时间延长至20分钟。

2. 4℃ 2,100 rpm (~400×g) 离心10分钟，小心吸弃上清。
3. 向以上沉淀中加入2倍血液样本体积的红细胞裂解液（1×），轻轻涡旋，充分重悬沉淀。
4. 4℃ 2,100 rpm离心10分钟，小心并彻底吸弃上清。

注意：此步一定要完全去除上清否则影响裂解导致RNA产量下降。

5. 向沉淀中加入裂解缓冲液（使用前检查是否已经加入 β -巯基乙醇），0.5-1.5mL的血液样本加入600 μ L裂解缓冲液，小于0.5 mL的血液样本加入350 μ L裂解缓冲液，混匀。

6. 将所得液体转移到已装入收集管的过滤柱中，12,000 rpm (~13,400×g) 离心2分钟，收集滤液，弃掉过滤柱。
7. 向所得滤液中加入1倍体积（600 μL或350 μL）的70%乙醇（无RNase水配制），混匀。
注意：加入乙醇后可能会产生沉淀，不会影响后续实验。
8. 将上步所得溶液全部加入到已装入收集管的吸附柱中，若一次不能加完溶液，可分多次转入。12,000 rpm离心15秒，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。
9. 向吸附柱中加入700 μL漂洗缓冲液1，12,000 rpm离心15秒，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。
可选步骤：如果要进行对微量DNA非常敏感的RNA实验，则用以下步骤替代步骤9。
 - 1) 向吸附柱中加入350 μL漂洗缓冲液1，12,000 rpm离心15秒，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。
 - 2) 配制DNase I 混合液：取70 μL DNase I反应液和10 μL DNase I储存液，轻柔混匀，配制成终体积为80 μL的混合液。
注意：以上体系为按照我公司产品DNase I（CW2090S）反应体系进行配置，应用其他公司产品请参考相应说明书。
 - 3) 向吸附柱中直接加入80 μL配制好的DNase I混合液，20-30°C孵育15分钟。
 - 4) 向吸附柱中加入350 μL漂洗缓冲液1，12,000 rpm离心15秒，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。
10. 向吸附柱中加入500 μL漂洗缓冲液2（使用前检查是否已加入无水乙醇），12,000 rpm离心15秒，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。
11. 重复步骤10。
12. 12,000 rpm离心2分钟，倒掉收集管中的废液。将吸附柱置于室温数分钟，以彻底晾干。
注意：这一步的目的是将吸附柱中残余的乙醇去除，乙醇的残留会影响后续的酶促反应（酶切、PCR等）。
13. 将吸附柱置于一个新的无RNase离心管中，向吸附柱的中间部位加入30-50 μL洗脱缓冲液，室温放置1分钟，12,000 rpm离心1分钟，收集RNA溶液，-70°C保存RNA，防止降解。
**注意：1) 洗脱缓冲液体积不应小于30 μL，体积小影响回收率。
2) 如果要提高RNA的产量，可用30-50 μL新的洗脱缓冲液重复步骤13。
3) 如果要提高RNA浓度，可将得到的溶液重新加入到吸附柱中，重复步骤13。**

【注意事项】

1. 样品应避免反复冻融，否则影响提取RNA的提取得率和质量。样品在裂解缓冲液中，可于-70°C保存一个月。
2. 裂解缓冲液在使用前请加入β-巯基乙醇，至终浓度为1%，如1mL裂解缓冲液加10μL β-巯基乙醇。加入β-巯基乙醇的裂解缓冲液室温可保存1个月。
3. 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明先在漂洗缓冲液2（浓缩液）中加入无水乙醇。
4. 使用前请检查裂解缓冲液是否出现结晶或者沉淀，如有结晶或沉淀，可置于56°C水浴重新溶解。

5. 本试剂盒不能用于加入抗凝剂的冷冻血液样本RNA的提取。
6. 红细胞裂解液（10×）需在使用前用无RNase的水进行10倍稀释，稀释后置于2-8℃保存。
7. 若下游实验对DNA非常敏感，建议用不含RNase的DNase I对 RNA进行处理。
8. 所有离心步骤如无特殊说明均在室温下进行，且所有操作步骤动作要迅速。
9. 预防RNase污染，应注意以下几方面：
 - 1) 使用无RNase的塑料制品和枪头，避免交叉污染。
 - 2) 玻璃器皿应在使用前于180℃高温下干烤4小时，塑料器皿可在0.5M NaOH中浸泡10分钟，用水彻底冲洗后高压灭菌。
 - 3) 配制溶液应使用无RNase的水。
 - 4) 操作人员戴一次性口罩和手套，实验过程中要勤换手套。