

## FastPure Blood RNA Kit Handbook

### FastPure 血液样品 RNA 提取试剂盒说明书

#### 产品组成

FastPure Blood RNA Mini Kit		
产品编号	EK-1304-50T	EK-1304-100T
纯化次数	50 次	100 次
Buffer EL	250mL	500mL
Buffer RLT	40mL	80mL
Buffer RW1	32mL	64mL
Buffer RPE	12mL	24mL
RNase-Free Water	10mL	20mL
RNase-Free 吸附柱	50 个	100 个
2 mL 收集管	50 个	100 个
使用手册	1	1

#### 产品介绍

本试剂盒可以快速地从不多于 1.5mL 全血中提取总 RNA，不含酚氯仿等有毒试剂。其提取的总 RNA 纯度高，无蛋白质及其它杂质污染，可用于 RT-PCR、qPCR、cDNA 合成、引物延伸、芯片分析、Northern Blot、Dot Blot、Slot Blot、Poly A 筛选、体外翻译、RNase 保护分析和分子克隆等多种下游实验。本产品仅供科研使用，请勿用于医药、临床治疗、食品级化妆品等用途。

#### 存储条件

室温干燥保存可至少稳定 12 个月。

#### 需要额外准备的材料

- 14.3 M  $\beta$ -巯基乙醇( $\beta$ -ME) (常规购买商业化商品即为 14.3 M)
- 70%乙醇: 使用 RNase-Free 水配制
- 无水乙醇 (96%-100%)
- 无酶的 1.5mL 离心管
- 无酶吸头
- 高速离心机

#### 开始前注意事项 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

- 操作前在 Buffer RLT 中加入  $\beta$ -巯基乙醇( $\beta$ -ME) 至终浓度为 1% (建议现配现用), 如 1 mL Buffer RLT 中加入 10 $\mu$ L  $\beta$ -巯基乙醇 (或 40 $\mu$ L 1M DTT 溶液亦可)。配好的 Buffer RLT 可在 4 $^{\circ}$ C 维持稳定一个月。
- Buffer RLT 在储存时可能会形成沉淀, 如果有沉淀出现, 请 37 $^{\circ}$ C 加热溶解后室温使用。
- Buffer RPE 和 Buffer RW1 作为浓缩液提供, 在第一次使用前根据标签指示加入适量乙醇 (96-100%) 以获得工作溶液。
- RNase-Free Water 中不含任何抑菌因子, 室温放置或操作时可能会引入细菌或真菌污染, 使用时尽量注意, 推荐开瓶后分装保存以减少污染风险保证实验稳定性。
- RNA 在 Buffer RLT 中时不会被 RNase 降解。但提取后继续处理过程中应使用不含 RNase 的离心管或玻璃器皿。
- Buffer EL 处理阶段建议在 4 $^{\circ}$ C 离心以抑制 RNase 活性并稳定细胞状态; 上柱后的洗涤步骤可室温进行。

**操作步骤:**

**1. 在适当大小的离心管中将 1 体积的全血与 5 体积的 Buffer EL 混合。**

为了获得最佳结果，混合物的体积（血液+Buffer EL）不应超过离心管体积的 3/4，以实现有效混合。例如，将 5mL Buffer EL 加到 1mL 全血中，并混入总体积为 8mL 以上的离心管中

注意：使用适量的全血。最多可处理 1.5mL 健康血液（通常每微升全血有 4000-7000 个白细胞）。如果使用白细胞数量增加的血液，则适当减少剂量。（在这种情况下，还要在步骤 6 中调整 Buffer RLT 的数量。）

**2. 在冰上孵育 10–15min。在孵育过程期间短暂涡旋 2 次以充分混匀。**

在孵育过程中混浊的悬浮液变为半透明，表明红细胞溶解。如有必要，孵育时间可延长至 20min。

**3. 在 4°C 下以 400×g 离心 10min，然后完全去除并丢弃上清液。**

离心后白细胞将形成沉淀，确保上清液完全清除。残留痕量红细胞会使沉淀呈红色，这在随后洗涤步骤中将消除。

**4. 将 Buffer EL 加到细胞沉淀中（根据步骤 1 所用血液体积计算，按每体积全血使用 2 体积 Buffer EL）。通过短暂涡旋重悬细胞。**

例如，对于在步骤 1 中使用 1mL 全血，则此步骤添加 2mL Buffer EL。

**5. 在 4°C 下以 400×g 离心 10min，然后完全去除并丢弃上清液。**

注意：上清液的不完全去除会干扰裂解以及随后的 RNA 与核酸吸附柱的结合，从而导致收率降低。

**6. 按下表将 Buffer RLT（使用前请检查 Buffer RLT 是否加入 β-巯基乙醇或 DTT）添加到沉淀的白细胞中，充分混匀涡旋 30s 混匀。**

注：加入 β-巯基乙醇或 DTT 可彻底断开 RNase 的二硫键使其永久失活，是防止胰腺、肝脏、血液等样本 RNA 降解及降低裂解液粘度、防止堵柱的关键，也是减少 RNA 降解风险的重要补充手段。

当使用非健康血液时，请参考白细胞的数量来确定所需的 Buffer RLT 的体积。在继续进行均质化步骤之前，应该看不到任何细胞团块。若有细胞团块，则涡旋或移液吹打以清除。若上述操作后依然有明显沉淀块存在，则高速离心沉淀取上清进入第 7 步实验操作。

Buffer RLT (μL)	Healthy whole blood (mL)	No. of leukocytes
350	Up to 0.5	Up to 2× 10 <sup>6</sup>
600	0.5 to 1.5	2× 10 <sup>6</sup> to 1× 10 <sup>7</sup>

**7. 向混合液中加入 1 倍体积 70%乙醇(通常为 350μL 或 600μL)，并通过移液器吹打**

**混匀(不要涡旋)。将得到的溶液一起转入吸附柱中(吸附柱提前放入收集管中)，≥8000×g(≥10,000 rpm) 离心 30s，弃废液。**

加入乙醇后可能会形成沉淀，这不会影响后续的提取程序。吸附柱最大上柱量为 700μL，若溶液过多可分多次上柱。

**8. 向吸附柱中加入 700μL Buffer RW1（使用前请确认按瓶身要求加入无水乙醇），≥8000×g(≥10,000 rpm) 离心 30s，弃废液。**

**9. 将吸附柱重收套回收集管中，向吸附柱中加入 500μL Buffer RPE（使用前请确认按瓶身要求加入无水乙醇），≥8000×g(≥10,000 rpm) 离心 30s，弃废液。**

**10. 重复步骤 9 一次。**

**11. 倒弃滤液，将吸附柱放入收集管中，以最大转速(~13,400×g)离心 3min 干燥柱膜。**

**12. 将吸附柱套入新的无酶 1.5mL 离心管管中，并置于无酶的环境中开盖静置 5-10min 至乙醇晾干。**

若吸附柱中残留乙醇将会对纯化后的 RNA 的下游实验造成影响。

**13. 向吸附柱膜正中央加入 50-100μL RNase-Free Water，盖上盖子室温静置 3-5 min。后置于离心机中 ≥12,000×g(≥13,000 rpm) 离心 2min 得到 RNA 溶液。**

RNA 洗脱体积不应少于 30μL，否则影响洗脱效率。洗脱后的 RNA 溶液应置于-80°C 储存。