

AxyPrep 血RNA小量制备试剂盒

本试剂盒用于从全血中提取 RNA。提取的 RNA 分子完整、纯度高，适用于 Northern Blot、RT-PCR、体外翻译、Primer Extension、RNase 保护测定、构建 cDNA 文库等各种分子生物学实验。

一、试剂盒组成、贮存、稳定性

Cat. No.	AP-MN-BL-RNA-4	AP-MN-BL-RNA-50	AP-MN-BL-RNA-250
Kit size	4 preps	50 preps	250 preps
Spin/vac mini column	4	50	250
2 ml Microfuge tube	8	100	500
1.5 ml Microfuge tube	4	50	250
Buffer RL	14 ml	180 ml	2×450 ml
Buffer R-I	2 ml	24 ml	120 ml
Buffer R-II	1 ml	12 ml	60 ml
Buffer W1A concentrate	2.4 ml	24 ml	120 ml
Buffer W2 concentrate	2.4 ml	24 ml	2×72 ml
Buffer TE (DNase & RNase-free)	1 ml	6 ml	30 ml
Protocol manual	1	1	1

Spin/vac mini column: 小量制备管。

Buffer RL: 红细胞裂解液。室温密闭贮存。

Buffer R-I: 细胞裂解液。室温密闭贮存。

Buffer R-II: 中和液。室温密闭贮存。

Buffer W1A concentrate: 洗涤液。使用前，根据瓶上指定的体积加入乙醇，混合均匀，室温密闭贮存。可用无水乙醇或95%乙醇。

Buffer W2 concentrate: 去盐液。使用前，根据瓶上指定的体积加入乙醇，混合均匀，室温密闭贮存。可用无水乙醇或95%乙醇。

Buffer TE(DNase & RNase-free): 洗脱液。10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.5。室温密闭贮存。

二、注意事项

1. 本试剂盒适合从200-400 μ l 全血中提取RNA。若从200 μ l 样品中提取RNA，需加入1 ml Buffer RL，则可选用2 ml 离心管。实验前请根据加入样品及Buffer RL体积选择适合的离心管，加入样品和 Buffer RL的总体积不能超过离心管体积的3/4。
2. Buffer R-I 和Buffer W1A 含刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套和眼镜，避免沾染皮肤、眼睛衣服，谨防吸入口鼻。若沾染皮肤、眼睛时，要立即用大量清水或生理盐水冲洗，必要时寻求医疗咨询。

三、实验准备

1. 第一次使用时，在Buffer W1A concentrate 和Buffer W2 concentrate中按试剂瓶上指定体积加入无水乙醇或95%乙醇。
2. 所有试剂用DEPC处理过的溶剂配制。请选用RNase-free枪头和离心管，以避免提取过程中RNA被RNase降解。

四、操作步骤

1. 200-400 μ l 全血加入1-2 ml Buffer RL 在离心管中混匀。
 - * 如果血样的体积在200-400 μ l之间，适当调整加入Buffer RL的体积。
2. 冰浴 10-15 min。冰浴期间，温和混匀 2 次。3,000 \times g 离心 5 min。
 - * 4 $^{\circ}$ C条件下离心。
3. 用吸头尽可能丢弃上相。
4. 加入 0.5 ml (血样体积 200 μ l) -1 ml (血样体积 400 μ l) Buffer RL，温和混匀，冰浴 5 min。
 - * 如果血样的体积在 200-400 μ l 之间，适当调整加入 Buffer RL 的体积。
5. 3,000 \times g 离心 5 min，丢弃上相。
 - * 4 $^{\circ}$ C条件下离心。
6. 加入 400 μ l Buffer R-I，用吸头抽吸，混合均匀。
7. 加入 200 μ l Buffer R-II，旋涡振荡 1 min，12,000 \times g 离心 10 min。
 - * 4 $^{\circ}$ C条件下离心。
8. 取上清至 2 ml 离心管中（试剂盒内提供）。加入 250 μ l 异丙醇，混合均匀。

步骤 9-13 可选择离心法或负压法

A. 离心法

- 9A. 将制备管置于 2 ml (试剂盒内提供) 离心管中，转移步骤 8 中的混合液到制备管中，6,000 \times g 离心 1min。
 - * 建议 4 $^{\circ}$ C条件下离心。
- 10A. 弃滤液，将制备管弃滤液，将制备管置回到 2 ml 离心管中，制备管中加入 700 μ l Buffer W1A，12,000 \times g 离心 1 min。
 - * 确认在 Buffer W1A concentrate 中已按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。

11A. 弃滤液，将制备管置回到 2 ml 离心管中，在制备管中加入 700 μ l Buffer W2，12,000 \times g 离心 1 min；以同样的方法再用 700 μ l Buffer W2 洗涤一次。

* 确认在 Buffer W2 concentrate 中已按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。

12A. 弃滤液，将制备管置回到 2 ml 离心管中，12,000 \times g 离心 1 min。

13A. 将制备管放入一干净的1.5 ml离心管（试剂盒内提供）中，在制备管膜中央加60-100 μ l Buffer TE (DNase & RNase-free) 。室温静置1 min，12,000 \times g离心1 min，洗脱得RNA。

B. 负压法

9B. 将制备管插到负压装置的插口上，将步骤 8 中的混合液移入制备管中，开启并调节负压至 -20-30 英寸汞柱，吸尽管中溶液。

10B. 保持负压，加入 700 μ l Buffer W1A，吸尽管中溶液。

* 确认在 Buffer W1A concentrate 中已按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。

11B. 保持负压，沿管壁四周加入700 μ l Buffer W2，吸尽管中溶液；以同样方法再用700 μ l Buffer W2 洗涤一次。

* 确认在 Buffer W2 concentrate 中已按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。

12B. 将制备管置于一个 2 ml 离心管（试剂盒内提供）中，12,000 \times g 离心 1 min。

13B. 将制备管放入一干净的 1.5 ml 离心管（试剂盒内提供）中，在制备管膜中央加 60-100 μ l Buffer TE (DNase & RNase-free) 。室温静置 1 min，12,000 \times g 离心 1 min，洗脱得 RNA。

五、操作流程图

加入样品和 1-2 ml Buffer RL

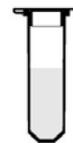


红细胞裂解

离心, 弃上清
加入 0.5-1 ml Buffer RL



离心, 弃上清
加入 400 μ l Buffer R-I



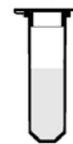
细胞裂解、释放 RNA

加入 200 μ l Buffer R-II
12,000 \times g 离心 10 min



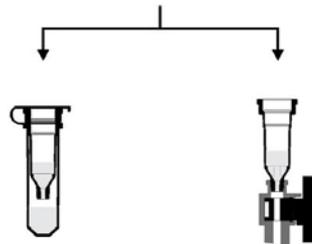
中和

加入 250 μ l 异丙醇



结合

加入 700 μ l Buffer W1A
加入 700 μ l Buffer W2
加入 700 μ l Buffer W2



结合

洗涤

加入 60-100 μ l
Buffer TE(DNase & RNase-free)



洗脱