

血液 RNA & DNA 小量提取试剂盒

一、产品简介

Buffer BR1 可作为血液 RNA & DNA 保护液 (见四、实验原理与注意事项)。

血液样品与 Buffer BR1 按照 1:2.5 的比例混合后室温放置 2 小时, 样品中的 DNA 和 RNA 被固化为容易被离心沉淀的粉末状凝集物。

Buffer BR2 悬浮沉淀物, Buffer BR3 释放 DNA 和 RNA; DNA 吸附柱-RD 选择行吸附 DNA, 保留 RNA 于滤液中。滤液中加入 Buffer BR4 调整结合条件后, RNA 吸附柱-A 有效吸附大分子 RNA (包括 mRNA 和 rRNA, 不包括 tRNA 和降解为 5S 的小 RNA)。

DNA 吸附柱-RD 和 RNA 吸附柱-A 分别洗涤后, 使用去离子水或低盐溶液分别洗脱 DNA 和 RNA, 可直接用于后续实验。

本试剂盒适合从 ≤1ml 新鲜的人或哺乳动物全血, ≤3ml 冻存的人或哺乳动物全血中分别提取 DNA 和 RNA, 适合处理的血液为 EDTA-K₂ 抗凝血, 不适合处理肝素或者柠檬酸抗凝的血液。

RNA 产量与应用: 3-8 μg RNA/ml 新鲜血液, 1-2 μg RNA/ml 冻存血液; 最小洗脱体积 15 μl。

已去除大部分 tRNA 和降解为 5S 的小 RNA, 可直接用于 5' RACE 和 3' RACE。

DNA 产量与应用: 5-10 μg DNA/ml 血液; 最小洗脱体积 50 μl。

纯度低于血液基因组 DNA 提取系列试剂盒, 可用于酶切和常规 PCR。

二、试剂盒组成和储存

组成内容	RK206-01 (20 次)	RK206-02 (50 次)	原理与用途
Buffer BR1 [◇]	60 ml	125 ml	固定 RNA
Buffer BR2	6 ml	6 ml	悬浮固定的 RNA
Buffer BR3 [*]	10 ml	17 ml	释放 RNA
Buffer BR4	10 ml	17 ml	调整 RNA 结合条件
Buffer BR5	25 ml	60 ml	漂洗去除抑制物
Buffer WD	15 ml	30 ml	漂洗去除 DNA
Buffer RW2 [§]	16 ml	16 ml×2	漂洗去除盐
diH ₂ O [*]	15 ml	15 ml	洗脱 RNA
TE [*]	15 ml	30 ml	洗脱 DNA
DNA 吸附柱-RD	20 个	50 个	吸附 DNA, 保留 RNA 于滤液
RNA 吸附柱-A	20 个	50 个	吸附 RNA
收集管	40 个×2	50 个×4	接收废液
1.5 ml 离心管	20 个×2	50 个×2	分别收集 RNA、DNA
说明书	1 份	1 份	

[◇] Buffer BR1: 储存温度低于 10°C 时, 会析出白色沉淀物, 需 55-70°C 加热溶解, 并且恢复至室温后使用 (可使用冰水浴降温)。

试剂的量适合处理 ≤1ml 血液; 如果处理 1-3 ml 冻存血液, 需单独订购 Buffer BR1。

^{*} Buffer BR3: 储存温度低于 10°C 时, 会析出晶状不溶物, 需 55-55°C 加热溶解, 并且恢复至室温后使用 (可使用冰水浴降温)。

第一次使用前加入 β-巯基乙醇至终浓度为 1%, 室温放置一周稳定, 重复加入 β-巯基乙醇至终浓度 5% 不影响使用效果; 如果实验间隔时间较长, 也可以在每次使用时加入 β-巯基乙醇 (见七、RNA 提取操作步骤 4)。

[§] Buffer RW2: 试剂瓶内为浓缩液, 第一次使用前按照试剂瓶标签注明体积加入无水乙醇, 混合均匀。

^{*} diH₂O: 无 DNase & RNase, 不含叠氮化钠等防腐剂, 用于洗脱 RNA, 建议分装后存放于 4°C 避免污染和长菌。

TE: 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 0.025% NaN₃, pH 8.0 (25°C), 用于洗脱 DNA。

所有试剂盒组成成分可于室温储存。

三、安全注意事项

1. Buffer BR1、Buffer BR3 和 Buffer BR5 含刺激性化合物，避免沾染皮肤、眼睛和衣服、谨防吸入口鼻。若沾染皮肤、眼睛，立即使用大量水或生理盐水冲洗沾染处，必要时寻求医疗咨询。
2. RNA 或者 DNA 洗脱步骤，如果离心机转子没有盖子或者使用气密型盖子，在将 1.5 ml 离心管盖子扣在吸附柱上后，务必去除吸附柱的盖子(剪掉或拧断，见相应步骤图示)；因为高速离心时未扣在吸附柱上的盖子容易脱落，造成安全隐患。

四、实验原理与注意事项

(一)血液样品 RNA 与 DNA 的固定与稳定保存：

Buffer BR1 含有阳离子多聚物，缓慢裂解细胞的同时屏蔽 RNA 和 DNA 的负电荷，使之形成容易被离心沉淀的粉末状凝集物(简称**固定的 RNA&DNA**)。固定的 RNA&DNA 可避免内源核酸酶的降解作用，如下保存方式和时间内获得的 RNA 电泳带型不会发生明显的变化：

室温保存 24 小时；2-8℃保存 7 天；冻存条件下(比如-20℃或-80℃)保存至少 2 年。

血液样品 RNA 与 DNA 的固定方法与注意事项：



1. 尽可能使用液态抗凝剂，不要使用干粉状抗凝剂；采血至采血管指定体积；采血后应温和、缓慢翻转采血管，避免机械力损伤细胞，造成 RNA 降解。
2. 采血后立即加入 2.5 倍血液体积的 Buffer BR1。
3. 冻存期间未反复冻融。
4. 采血后立即冻存，未产生血凝块，冻存期间未反复冻融。
5. 血液与 Buffer BR1 的比例为 1:2.5，体积偏差±10%不影响实验结果。体积偏差过大可能会导致样品粘稠或凝固。
6. 血液与 Buffer BR1 混合方式为温和、缓慢翻转 3-6 次，避免机械力损伤细胞，造成 RNA 降解。
7. 放置于室温自然融化，不可水浴加热和剧烈摇晃。如果血液体积已知并且全部用于 RNA 提取，建议直接加入 Buffer BR1。
8. 室温：**18-25℃**，避免局部环境因素影响温度，比如远离水浴锅和 PCR 仪等热源、避免阳光直射、避开空调暖风等。
9. 室温静置 2 小时内不要翻转或者晃动离心管，静置 2 小时后 RNA 和 DNA 被固定可稳定保存或运输。静置时间可以延长至 24 小时，不影响使用效果。

(二) DNA 吸附柱-RD 选择性吸附 DNA：

DNA 吸附柱-RD 能吸附完整性较高的基因组 DNA，不能吸附 RNA 和降解或断裂的 DNA；降解或断裂的 DNA 最终会污染 RNA。

2-8℃长时间放置或冻存后溶血的样品，部分 DNA 已降解、断裂，最终获得的 RNA 中会有少量 DNA 残留。

(三) RNA 提取使用的耗材、试剂、加样器与离心机：

在七、RNA 提取操作步骤¹⁰之前 RNase 活性被有效抑制，在 Buffer BR4 洗涤后最终去除，使用的耗材、试剂、加样器与离心机等无需特殊处理，但应避免大量 RNase 污染的可能，比如不能用与质粒 DNA（大量使用 RNase A）提取共用耗材、试剂和加样器等。

从七、RNA 提取操作步骤⁹开始，应注意外源 RNase 活性污染的可能：更换手套，使用 RNA 提取专用的离心管架、耗材和试剂，如果有条件使用 RNA 提取专用的加样器和离心机，在操作时应尽可能避免人为因素带来的外源 RNase 污染。

五、实验准备

1. 检查 Buffer BR1 和 Buffer BR3 是否析出不溶物，如果析出不溶物 55-70℃加热溶解，并且恢复至室温后使用(可使用冰水浴降温)。

2. 如果使用 10-15 ml 离心管操作，需准备 1-5 ml 一次性塑料滴管，无需去除 DNase& RNase 处理。

3. 去离子水，无需特殊处理。

4. 如果样品粘稠或凝固，需单独订购 Buffer MGv。

5. 第一次使用前，在 Buffer RW2 中按试剂瓶标签注明体积加入无水乙醇，混合均匀。

！在 Buffer RW2 添加的乙醇和量取乙醇的容器需 RNA 提取专用，如果没有合适的容器量取乙醇，可根据乙醇的密度计算重量直接加入试剂瓶中。

比如：无水乙醇的密度为 0.7893 g/ml，20 ml 无水乙醇为 15.8 g，45 ml 无水乙醇为 35.5 g。

6. β-巯基乙醇。第一次使用前在 Buffer BR3 中加入 β-巯基乙醇至终浓度为 1%，室温放置一周稳定，重复加入 β-巯基乙醇至终浓度 5% 不影响使用效果；

如果实验间隔时间较长，也可以在每次使用时加入 1% Buffer RLA 体积的 β-巯基乙醇。

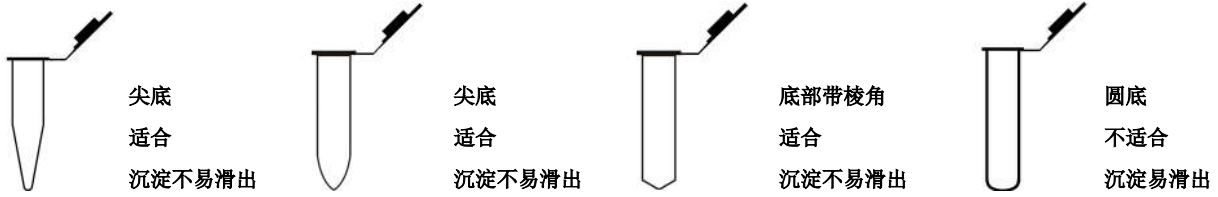
7. 可选：55-70℃预热 diH₂O 或客户自备的 DEPC 水 (pH 6.5-7.0) 和 TE。预热 diH₂O 和 TE 能提高 RNA 和 DNA 的洗脱效率；并且高温能使 RNA 二级结构均一化，有利于电泳鉴定。

六、根据血液体积和离心条件选择合适大小的离心管

血液样品与 Buffer BR1 的比例为 1:2.5，体积偏差±10%不影响实验结果；体积偏差过大可能会导致样品粘稠或凝固，后续 RNA 提取需单独订购 Buffer MGV。

每次最大处理量为来源于 1ml 新鲜全血或 3 ml 冻存全血的固定液，最大体积分别为 3.5 ml 和 10.5 ml；剩余的样品可继续冻存。

实验前需根据血液体积和离心条件选择合适大小的离心管，并且离心管为尖底或底部带棱角(见图示)，以免沉淀物从离心管滑落。



≤0.4 ml 血液样品 (≤1.5 ml 固定液) 建议使用尖底 1.5 ml 离心管；

0.4-0.5 ml 血液样品 (1.5-1.75 ml 固定液) 建议使用尖底或底部带棱角的 2 ml 离心管；

0.5-1 ml 血液样品 (1.75-3.5 ml 固定液) 可以使用 10-15ml 尖底离心管，使用合适大小的转子离心机操作，也可以将血液样品与 Buffer BR1 在合适大小的容器(采血管或者 5-15 ml 离心管)中混合后，在七、RNA 提取操作步骤 2.A 将部分混合液转入 1.5-2 ml 离心管离心后倒弃上清，再将剩余部分样品加入同个离心管中进行处理。

1-3 ml 冻存血液 (3.5-10.5 ml 固定液) 建议使用 10-15 ml 尖底离心管。

七、RNA 提取操作步骤

如未注明，所有离心参数为使用台式快速离心机，室温 12,000-16,000×g；如离心机转速只能设定为 rpm，设定为低于最高转速 1,000 rpm；

RNA 吸附柱-A 中加入溶液后可能会有白色纤维层从底部脱落悬浮于溶液中，不影响使用效果。

1. 将 Buffer BR1 固定的样品恢复到室温，冻存样品室温自然融化后恢复到室温，用力摇晃混合均匀；

样品解冻后部分蛋白析出聚集沉淀于管底，需用力摇晃混合均匀。

如果溶液粘稠加入 1/2 固定液体积的 Buffer MGV，用力摇晃混合均匀，室温放置 5 min。

样品固定时，体积偏差过大会导致溶液粘稠或凝固；Buffer MGV 需单独订购。

2. 沉淀固定的 RNA：根据离心管规格离心选择方法 A 或 B

A. 使用 1.5-2 ml 尖底离心管

离心 2 min，倒弃上清，反复离心处理完固定液；

加入 0.75 ml 去离子水，用枪头吹打悬浮沉淀物；

离心 2 min，倒弃上清；

将离心管倒扣在吸水纸上 1 min，继续操作步骤 3。

B. 使用 10-15 ml 离心管

2000~5000×g 离心 10 min，倒弃上清；

加入 0.75 ml 去离子水，使用 1-5 ml 塑料滴管悬浮沉淀物，转入 1.5-2 ml 尖底离心管；

离心 2 min，倒弃上清；

将离心管倒扣在吸水纸上 1 min，继续操作步骤 3。

3. 加入 100 μl Buffer BR2，反复吹打 10 次悬浮沉淀物。

4. 释放 RNA：

加入 300 μl Buffer BR3(如未在试剂瓶中加入 β-巯基乙醇或加入后时间超过一周，此步骤先加入 3 μl β-巯基乙醇，再加 300 μl Buffer BR3)；

用力摇晃 3 次，室温放置 10 min。

5. 实验准备：根据样品数量，在离心管架上放置 3 排干净的收集管；

其中一排放入 DNA 吸附柱-RD，按顺序编号；

其中一排放入 RNA 吸附柱-A，按顺序编号。

6. 将步骤 4 的溶液转入 DNA 吸附柱-RD(置于收集管), 8,000×g 离心 30 秒-----! 请勿使用更大离心力, 请勿延长离心时间

7. 将步骤 6 的 DNA 吸附柱-RD 连同收集管按顺序放置于离心管架上;

DNA 吸附柱-RD: 转入步骤 5 准备的干净的收集管中, 按照八、DNA 提取操作步骤提取 DNA, 1 小时内进行操作不影响实验结果;

收集管中的滤液: 加入 **300 µl Buffer BR4**, 吹打 3 次混合均匀, 将溶液转入 RNA 吸附柱-A; 继续操作步骤 8。

8. 离心 2 min, 弃废液, 将 RNA 吸附柱-A 放回收集管中。

以下步骤注意避免外源 RNase 污染: 更换手套, 使用 RNA 专用的移液器和枪头, 从试剂瓶中吸取试剂时避免移液器接触试剂瓶内缘。

9. 加入 **500 µl Buffer BR5**, 离心 1 min, 弃废液, 将 RNA 吸附柱-A 放回收集管中。

10. 加入 **500 µl Buffer WD**, 离心 1 min, 丢弃收集管, 将 RNA 吸附柱-A 放入另外一个干净的收集管中。

11. 加入 **700 µl Buffer RW2**, 离心 1 min, 弃废液, 将 RNA 吸附柱-A 放回收集管中。

12. 加入 **100 µl Buffer RW2**, 离心 2 min。

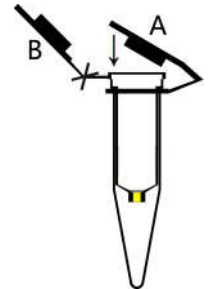
13. 将 RNA 吸附柱-A 转入试剂盒携带的 1.5 ml 离心管中, 在硅胶膜中央加 $\geq 15 \mu\text{l}$ diH₂O, 将 1.5 ml 离心管盖(A)

扣在 RNA 吸附柱上, 做好标记, 去除 RNA 吸附柱的盖子(B)。离心 1 min。

55-70°C 预热 diH₂O 能提高 RNA 的洗脱效率; 并且高温能使 RNA 二级结构均一化, 有利于电泳鉴定。

重复洗脱可以提高洗脱效率。重复洗脱的两种方法:

- 洗脱的 RNA 溶液转入 RNA 吸附柱中进行洗脱, 获得的 RNA 浓度高于方法 b;
- 重新加入洗脱液进行洗脱, 洗脱效率高于方法 a。



八、DNA 提取操作步骤

续: 七、RNA 提取操作步骤 7

所有离心时间按使用台式快速离心机设定, 通常 10 秒内可达最高转速/离心力; 如使用慢升速离心机, 离心时间需延长 30 秒。

所有离心条件为室温; 如未注明离心力, 均为 12,000-16,000×g; 如离心机只能设定转速, 设定为低于最高转速 1,000 rpm。

1. DNA 吸附柱-RD 中加入 **500 µl Buffer BR5**, 室温放置 1-2 min 或更长时间, 离心 1 min, 弃废液, 将 DNA 吸附柱-RD 放回收集管中。

2. 加入 **500 µl Buffer RW2**, 离心 1 min, 弃废液, 将 DNA 吸附柱-RD 放回收集管中。

3. 重复步骤 2。

4. 离心 2 min。

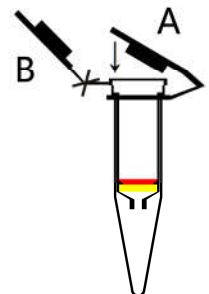
5. 将 DNA 吸附柱-RD 转入试剂盒携带的 1.5 ml 离心管中, 在硅胶膜中央加 50-150 µl TE 或去离子水(pH \geq 7.0),

将 1.5 ml 离心管盖(A)扣在 DNA 吸附柱上, 做好标记, 去除 DNA 吸附柱的盖子(B)。离心 1 min。

向硅胶膜的中央再加入 50-150 µl TE 或者去离子水(pH \geq 7.0), 重复洗脱一次。

▲55-70°C 预热 TE 或者去离子水(pH \geq 7.0), 可以提高洗脱效率。

▲如果使用去离子水洗脱, 需用 NaOH 将去离子水 pH 调整至 \geq 7.0。



九、常见问题解答

Q1 Buffer BR1 固定的样品很粘稠或凝固

A1-1 血液与 Buffer BR1 比例为 1:2.5, 体积偏差 $>$ 10%或反复冻融多次可能会出现溶液粘稠或凝固的情况。

A1-2 使用肝素、柠檬酸钠等抗凝剂, 不适合使用 Buffer BR1 固定样品。

Q2 RNA 产量很低

A2-1 Buffer BR3 含高浓度异硫氰酸胍, 与 β -巯基乙醇共同抑制 RNase, 这种抑制作用依赖于异硫氰酸胍浓度。如果 Buffer RLA 在低温时析出或步骤 3 未倒扣去除上清, 导致异硫氰酸胍终浓度偏低, 不能有效抑制 RNase 活性。降解的 RNA 不能有效被回收。

A2-2 Buffer BR3 未添加 β -巯基乙醇或 β -巯基乙醇失效（见图 2）。

A2-3 起始血液样品量太多，沉淀物体积偏大。

Q3 RNA 吸附柱-A 的硅胶膜上残留深颜色不溶物

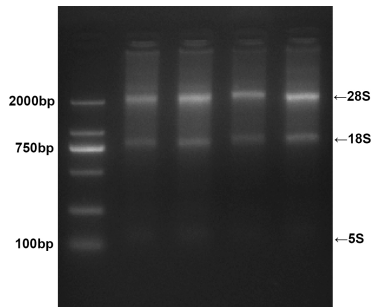
A3 DNA 吸附柱-RD 能去除不溶颗粒物。如离心力偏高，会有不溶物穿透柱子，最终被截留在 RNA 吸附柱-A 中影响 RNA 纯度（见图 2）。

Q4 明显的基因组 DNA 残留

A4-1 冻存血液或长时间放置的血液，部分 DNA 已降解，DNA 吸附柱-RD 无法去除降解的 DNA，导致 DNA 残留（见图 2）。

A4-2 加入 Buffer BR3 后放置时间超过 30 min。Buffer BR3 为酸性溶液，长时间放置会导致 DNA 断裂，同 A4-1 最终导致 DNA 残留（见图 3）。

十、实验示例

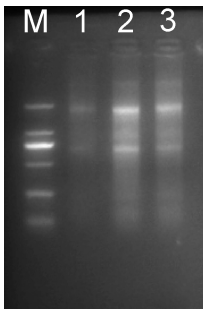


←图 1. 从 0.4ml 新鲜全血中提取 RNA

洗脱体积 25 μ l，电泳体积 2 μ l，1 \times TAE，2% agarose，6.7 V/cm 15 min

从新鲜血液中获得 RNA 无明显的基因组 DNA 和 5S RNA。

在非变性琼脂糖凝胶中，28S、18S 和 5S RNA 迁移率分别与 2000 bp、750 bp 和 100 bp DNA 相似。



←图 2. 从 0.4 ml 冻存血液中提取 RNA

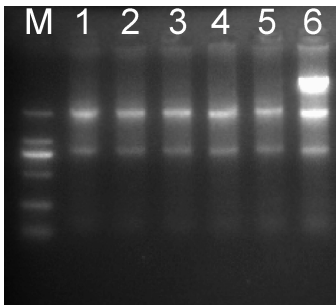
M: DL2000

1. Buffer BR3 中未添加 β -巯基乙醇，部分 RNA 降解，产量明显下降。

2. 严格按说明书操作。

3. 操作步骤七.6 离心力为 12,000 \times g，少量不溶物穿透滤膜，影响 RNA 纯度，导致提取后的 RNA 降解。

从冻存血中获得的 RNA 有少量 DNA 残留。



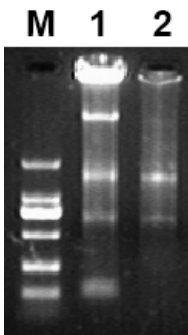
←图 3. 加入 Buffer BR3 后不同放置时间

M: DL2000

1. 加入 Buffer BR3 后立即转入 DNA 吸附柱-RD，不溶物未析出而穿透滤膜，影响 RNA 纯度，导致提取后的 RNA 降解。

2-5 加入 Buffer BR3 后放置时间分别为 5 min，10 min，20 min，30 min，随着时间延长部分 RNA 降解，5S RNA 逐渐增加。

6. 加入 Buffer BR3 放置 1 小时，出现明显的基因组 DNA 残留。



←图 4. RK206 与 Trizol 平行提取血液 RNA

M: DL2000

样品为 1ml 全血，冻融一次，溶解/洗脱体积 30 μ l，电泳体积 2 μ l

1. 使用 Trizol 提取 RNA，浓度 130.6 ng/ μ l，A260/280=1.87

2. 使用 RK206 提取 RNA，浓度 41.7 ng/ μ l，A260/280=1.936

RK206 获得的 RNA 已去除大部分 5S RNA，蛋白和基因组 DNA 残留少，检测浓度低，但 28S 与 18S RNA 的量相当。