

Second Edition

April 2010

QIAamp[®] RNA Blood Mini Handbook

从人类全血中提取总 RNA

声明：本中文操作说明由 QIAGEN 上海员工内部翻译，仅供参考，以英文操作说明为准。
鉴于个人理解差异，如有中英文不符合的地方，请即时联系我们。

翻译者：章涛（Tina Zhang）



Sample & Assay Technologies

试剂盒组分

（备注：英文手册第4页）

QIAamp RNA Blood Mini Kit	
Catalog no.	52304
Preparations per Kit	50
QIAamp Spin Columns (clear)	50
QIAshredder Spin Columns (lilac)	50
Collection Tubes (1.5 ml)	50
Collection Tubes (2 ml)	200
Buffer EL*	5 x 120 ml
Buffer RLT*†	45 ml
Buffer RW1†	45 ml
Buffer RPE‡	11 ml
RNase-free Water	10 ml
Handbook	1

* 也可以单独购买（参见第 44 页订购信息）

† 含有离液盐，与含有漂白剂的消毒水不兼容。参见第 6 页安全信息。

‡ Buffer RPE 是浓缩液，使用之前，需要加入 4 倍体积的乙醇（96-100%），从而达到工作浓度。

储存

请在室温（15–25°C）、干燥的环境中保存 QIAamp® RNA Blood Mini Kits，在这种条件下，至少可以保存 9 个月。

原理和过程

(备注：英文手册第9页)

QIAamp RNA Blood Mini 操作过程

全血

选择性的裂解红细胞



裂解的红细胞

完整的白细胞沉淀



裂解白细胞



用 QIAshredder 均质化细胞



加入乙醇



总 RNA 结合到 QIAamp 膜上



清洗 3 次



洗脱



可以直接使用的 RNA

操作手册：从人类全血中提取细胞内总 RNA

（备注：英文手册第18页）

开始实验前的重要事项

- 如果您是第一次使用QIAamp RNA Blood Mini Kit，请阅读第11页的“重要事项”。
- 如果您是第一次提取RNA，请阅读第35页附录A中的“操作RNA的常规注意事项”。
- 所有人类的全血和体液都被认为是有潜在的感染性的。因此，当您的起始样本是全血时，必须要遵循FDA（美国）、Bundesseuchengesetz（德国）或您所在国家相应的机构推荐的所有必要的预防措施。
- 人类全血的最大处理量（1.5ml）是根据健康成人的全血（每μl全血约含4000-7000白细胞）来计算的。如果起始样本中白细胞的含量过高，要相应的减少全血的体积。QIAamp spin column最多能处理 1×10^7 白细胞。
- 红细胞裂解后，要尽快在室温下（15–25°C）完成该操作手册中的所有步骤。
- 步骤6中得到的均质化的细胞裂解液可以在–70°C储存几个月。再次使用时，要在37°C水浴中完全融化冰冻的裂解液和溶解盐。避免延长孵育时间，因为这可能影响RNA的完整性。不推荐使用冰冻的白细胞沉淀（没有加入Buffer RLT）来继续步骤7。
- 不能使用冰冻的全血作为起始样本。

开始实验前需要准备的事情

- Buffer RPE是浓缩液，在第一次使用之前，加入4倍体积的乙醇(96–100%)，以获得工作浓度的缓冲液。
- Buffer RLT在储存的过程中可能会形成沉淀。如果有必要的话，适当加热使其溶解。
- 使用前必须在Buffer RLT中加入β-巯基乙醇。1ml Buffer RLT加入10 μl β-巯基乙醇。室温条件下(15–25°C)，Buffer RLT在加入β-巯基乙醇后可稳定保存1个月。
- 如果要选择柱上 DNase 消化，请参照第 41 页的附录 D 准备 DNase I 储存液。

操作过程

1. 将1倍体积的人类全血与5倍体积的Buffer EL在相应体积的管子（试剂盒不提供）中混合。

为了得到最优的结果，混合液（全血+Buffer EL）的体积不应该超过管子体积的3/4，从而使溶液充分混合。例如：1ml的全血与5ml的Buffer EL混合，最好使用8ml以上体积的管子。

注意：全血的起始量要适当，每个柱子大概能处理1.5ml的健康全血（每 μl 全血约含4000-7000白细胞）。如果白细胞含量过多，请将全血的体积调整到合适的起始量（在这种情况下，步骤6中Buffer RLT的量也要调整。）

2. 在冰上孵育10-15分钟，在孵育的过程中可以通过涡旋的方法简单的混匀2次。

在孵育的过程中，云雾状的悬浮液会变成透明的，这表示红细胞已经裂解了。如果有必要的话，可以将孵育时间延长到20分钟。

3. 400 x g，4°C离心10分钟，全部去除并丢弃上清液。

离心后，白细胞将形成沉淀。请确保上清液全部被移走。痕量的红细胞将在沉淀中显示为红色的晕，并在接下来的清洗步骤中被去除。如果有大量的红细胞残留，请参见第32页。

4. 将Buffer EL加到细胞沉淀中去（Buffer EL的体积为步骤1中使用的全血的2倍体积的），用涡旋的方法简单的重悬细胞。

例如：步骤1中使用1ml全血，本步骤中加入2ml Buffer EL。

5. 400 x g，4°C离心10分钟，全部去除并丢弃上清。

注意：上清液的去除如果不完全的话，将会干扰后续的裂解以及接下来的RNA与QIAamp spin column的结合，导致RNA的产量不高。

6. 根据下表将相应体积的Buffer RLT加到白细胞沉淀中。涡旋或者用移液枪重悬沉淀。

如果使用的不是健康成人的全血，根据白细胞的含量来决定 Buffer RLT 的体积。

Buffer RLT 是裂解白细胞的。在进行均质化步骤之前，不能有任何可见的细胞团。

涡旋或者用移液枪去除任何细胞团。

Buffer RLT*(μl)	健康全血 (ml)	白细胞数目
350	<0.5	< 2×10^6
600	0.5-1.5	2×10^6 - 1×10^7

*确保 β -ME 以及加入到 Buffer RLT 中（参见“开始实验前需要准备的事情”）

7. 将裂解液用移液枪加入已经放置在2ml收集管（试剂盒提供）的QIAshredder spin column中，用最大的速度离心2分钟，使裂解液均质化。丢弃QIAshredder spin column，保存均质化的裂解液。

为了避免气溶胶的形成，将移液枪调整到750 µl，确保裂解液在一次转移过程中就被全部加入QIAshredder spin column中。如果使用的细胞过多，在均质化步骤后，裂解液会太粘稠从而很难用移液枪吸起来。如果出现这种情况，请参见第32页。

8. 在均质化的裂解液中加入1倍体积的70%乙醇（350 µl或600µl），用移液枪充分混匀，不要离心。

乙醇加入后，可能会形成沉淀，这不会影响QIAamp步骤。

9. 用移液枪小心的将样品（包括任何可能形成的沉淀物），转移到新的已经放置在2ml收集管（试剂盒提供）上的QIAamp spin column中，不要弄湿边缘。8000 x g（10,000 rpm）离心15s。柱子最大的上样体积为700 µl。如果样本量超过700µl，将样本分为几份，依次的加入到柱子中并离心。

丢弃流出液*和收集管。

可选的步骤：如果要选择柱上DNase消化（参见第41页DNase处理），可以在这步后接着操作步骤D1-D4（参加第42页）。

10. 将QIAamp spin column转移到新的2ml收集管中（试剂盒提供），加入700 µl Buffer RW1。≥8000 x g（≥10,000 rpm）离心15s，清洗RNA。

丢弃流出液*和收集管。

11. 将QIAamp spin column转移到新的2ml收集管中（试剂盒提供），用移液枪加入500 µl Buffer RPE，≥8000 x g（≥10,000 rpm）离心15s。

丢弃流出液*和收集管。

注意：确保乙醇已经加入到Buffer RPE中（参见“开始实验前需要准备的事情”）。

*流出液包含 Buffer RW1 或 RLT，因此与漂白剂不兼容，参见第 6 页的安全信息。

12. 小心的打开QIAamp spin column，并加入500 µl Buffer RPE。盖上盖子，在最高转速（20,000 x g, 14,000 rpm）离心3min。

注意：有些离心机的转子在降速的过程中可能会有细微的扭曲，将会使含有 Buffer RPE 的流出液中与 QIAamp spin column 接触。将 QIAamp spin column 和收集管从转子中拿出的时候也可能导致流出液与 QIAamp spin column 接触。

13. 推荐的步骤：将QIAamp spin column放置在新的2ml收集管（试剂盒不提供）上，并丢弃有滤除液的收集管。然后，在最高转速离心1min。

该步骤可以减少柱子携带Buffer RPE的可能性。

14. 将 QIAamp spin column 转移到 1.5ml 离心管（试剂盒提供）上，用移液枪将 30–50 µl RNase-free water（试剂盒提供）加到柱子的膜上。≥8000 x g（≥10,000 rpm）离心 1min，洗脱 RNA。如果样本量>0.5 ml 全血（或 2×10^6 白细胞），重复该步骤。