

EZ-press RNA Purification Kit说明书

Cat.No.:B0004D

使用本试剂盒前, 请务必仔细阅读本说明书, 以保证操作正确

产品组分

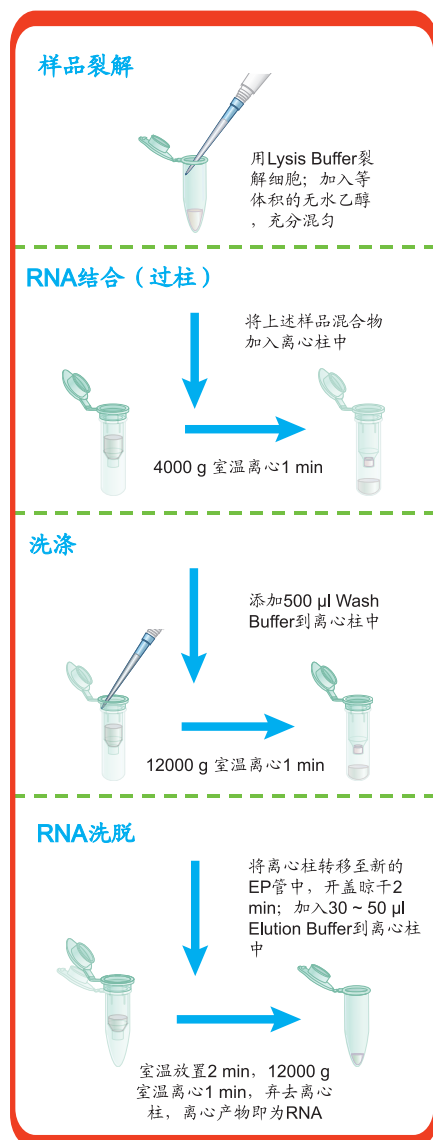
组分	B0004D (100 Preps)
Lysis Buffer	55 ml
Wash Buffer ¹	13 ml
Elution Buffer	10 ml
gDNA Remover	220 μ l
Spin Columns for RNA (with Collection Tubes)	100 Preps

注: ¹ Wash Buffer首次使用前, 请加入52 ml的无水乙醇并充分混匀。

保存条件

gDNA Remover置于-20°C保存; 其余组分室温保存, 有效期12个月。

实验流程



注意

1. Wash Buffer首次使用前须加入52 ml的无水乙醇并充分混匀 (Wash Buffer与无水乙醇的体积比为1:4)。
2. 建议使用前把Elution Buffer分装为3~4份, 以减小污染的概率。
3. RNA提取须在室温进行, 提取过程中不可置于冰上。
4. 建议用6孔板或35 mm培养皿培养细胞, 培养至细胞密度达到80%以上时进行RNA提取, 不建议用100 mm培养皿培养的细胞直接裂解提取RNA, 否则可能导致细胞裂解不充分或离心柱堵塞或导致基因组残留。
5. 样品裂解时为了防止吹打过程中产生过多的气泡, 可在加入裂解液后将移液器量程调至450 μ l, 吹打30下左右 (吹时, 液体不要完全吹出, 枪头内可以留一点; 吸时, 液体也不要完全吸完, 防止吸入气泡), 使细胞充分裂解【裂解充分以后, 如果不打算继续进行RNA提取, 可将裂解产物转移到EP管中直接冻存在-80°C, 下次解冻后恢复到室温使用, 加无水乙醇混匀后继续进行后续的操作即可】。
6. RNA洗脱时一定要将洗脱液加到柱中央的膜上 (如果洗脱液加到侧壁上, 会导致RNA没有被溶解而使产量大大减少), 同时注意避免移液器枪尖将膜刺破。

样品裂解

1A. 对于细胞数 $\leq 3 \times 10^6$ 的贴壁细胞样品

- a) 弃去培养基, 用PBS清洗细胞 (沿侧壁加入PBS轻轻晃动后, 再沿侧壁吸去PBS; 如果样品数较多, 应分批操作, 防止因细胞晾干导致RNA严重降解)。
- b) 加入500 μ l裂解液 (Lysis Buffer), 置于摇床上室温摇5 min (转速调至150 rpm左右), 或用移液器吹打30下左右 (将移液器量程调至450 μ l; 吹时, 液体不要完全吹出, 枪头内可以留一点; 吸时, 液体也不要完全吸完, 防止吸入气泡), 使细胞充分裂解。

注: 如果不继续进行RNA提取, 可将裂解产物转移至1.5 ml EP管中直接冻存在-80°C。

1B. 对于悬浮细胞或者细胞数 $\geq 3 \times 10^6$ 的贴壁细胞样品

- a) (悬浮细胞直接从下一步开始) 用胰酶消化细胞, 然后加培养基终止消化。
- b) 取出约 $1 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ 细胞转移至1.5 ml EP管中 (对于体积很小的免疫细胞如T、B细胞等, 建议取 $2 \times 10^6 \sim 8 \times 10^6$), 500 g离心3~5 min, 用移液器吸弃上清。
- c) 加入500 μ l裂解液, 将移液器量程调至450 μ l后吹打10~15次 (或者使用涡旋振荡器高速震荡10 sec亦可), 以使细胞充分裂解。

RNA结合 (过柱)

2. 向上述细胞裂解产物中加入等体积的无水乙醇, 充分混匀。如果加入乙醇后出现沉淀, 建议用移液器吹打至沉淀不可见为止, 然后加入离心柱 (Spin Column) 中, 4000 g (大约相当于实验室常用的Eppendorf、Thermo或Beckman离心机的7000 rpm) 离心1分钟 (若离心后柱中有液体残留, 可用12000 g再次离心1 min), 弃去液体。

3. DNA酶处理: 按照每个样品2 μ l DNA酶 (gDNA Remover), 加10 μ l ddH₂O (需灭菌) 的比例, 根据样品数, 取相应体积的DNA酶和ddH₂O, 用移液器吹打混匀; 取12 μ l 加到每个柱中央的膜上, 室温放置5 min, 以去除可能残留的少量基因组 (DNA酶处理后不要离心, 直接加入洗涤液进行下一步洗涤操作)。

备注: 若想加快RNA提取速度, 可以不用DNA酶处理, 在过柱后直接洗涤。但是为了能够充分去除基因组DNA, 需要在下游实验时使用EZBioscience品牌的带gDNA Remover的逆转录试剂盒进行逆转录实验。

洗涤

4. 加入500 μ l洗涤液 (Wash Buffer) 到离心柱中, 12000 g离心1 min。注意: 将离心柱从收集管中取出时, 应小心操作, 防止离心柱底部接触到液体 (建议操作: 倒掉液体后, 可将收集管倒扣在吸水纸上轻轻叩击两下, 然后将离心柱放回收集管, 12000 g空柱离心1 min)。

5. 无需倒掉废液, 直接将离心柱转移至无RNase的1.5 ml EP管中, 开盖晾干2 min。

RNA洗脱

6. 向离心柱中央的膜上入30~50 μ l洗脱液 (Elution Buffer), 室温放置2 min。 (注: 若想提高RNA产量, 可取适量的洗脱液提前预热到60°C再进行洗脱)。

7. 12000 g离心1 min (可选操作: 在初次洗脱离心后, 可将液体加回离心柱, 再放置3 min, 使RNA充分溶解后再离心, 能增加RNA产量)。弃去离心柱, 所得的RNA应迅速转移到冰上放置并进行浓度测定, 然后进行后续实验, 或储存于-80°C备用。

EZ-press RNA Purification Kit Trouble Shooting

1、RNA产量过低，或用已经验证过的引物检测基因表达，检测到的内参基因Ct值偏大，或无法做出正常的扩增结果。

解决办法：

a. 检查所使用的试剂是否受到污染：可与未使用过的产品作对照，比较两组结果是否一致。建议试剂盒开封后，每种buffer分装为3~4份（可用15 ml离心管分装），每次使用时应严格按照规范操作，防止交叉污染。

b. 溶解好的引物应该分装为小份冻存，以减少引物降解及降低污染的可能性。

c. 检查操作流程是否正确。例如：

1. 整个RNA提取的操作过程必须在室温进行，不可置于冰上（直至洗脱离心后得到RNA方可置于冰上），以避免其间产生不溶物堵塞离心柱。

2. Wash Buffer使用前需加入52 ml无水乙醇并充分混匀（Wash Buffer与无水乙醇的体积比为1:4）。

3. 组织样品裂解前须称重，如果超过5 mg需要研磨两次（详见操作步骤），用Vortex充分振荡混匀，高速离心取上清。

4. 细胞或组织裂解产物，上柱前需要加入等体积的无水乙醇，充

分混匀后，加入离心柱中离心。

5. 洗涤时需用12000 g高速离心充分去除Wash Buffer，然后开盖晾干2 min（此步骤应防止Wash Buffer残留在柱上）。

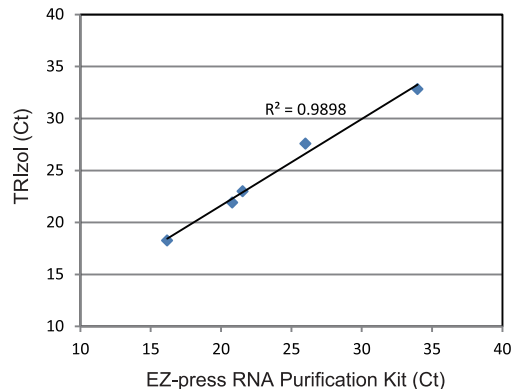
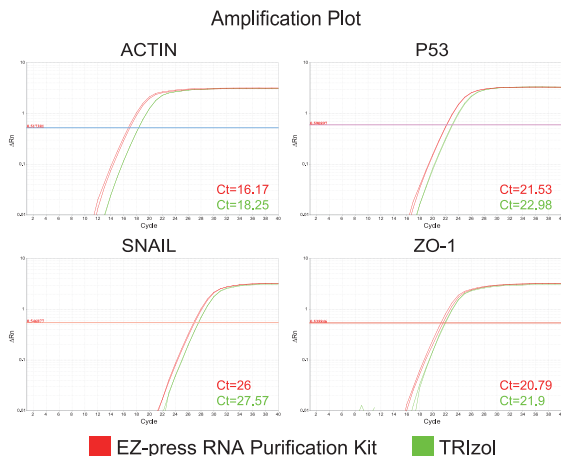
6. 洗脱液的体积可以根据需要在一定范围内调整（一般30~50 μ l，最少不可少于20 μ l，否则无法充分溶解RNA），以浓度满足后续实验需求为宜。重复洗脱一次及延长放置时间至5 min均可提高RNA产量。

7. 关于RNA浓度与纯度：本试剂盒提取的RNA，使用NanoDrop等微量分光光度计测定OD260/280在1.90~2.3之间均属正常（因不同仪器之间存在误差，若OD比值略有超出，但上下不超过0.1，且吸光度曲线正常，也可接受）。经检测，对于少量细胞或组织样品，使用本试剂盒提取的RNA，如果OD 260/280正常，则浓度最低不低于30 ng/ μ l即可使用。经检测，对于低浓度的RNA，使用EZBioscience品牌的逆转录试剂盒（货号为EZB-RT2GQ）与qPCR试剂（货号为A0001），仅需逆转录100 ng总RNA，即可获得优异的检测结果。

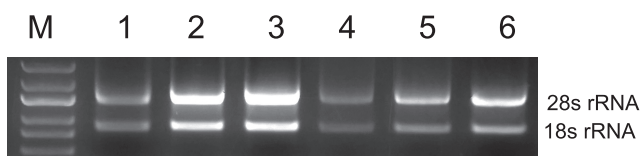
8. 关于RNA产量：经测试，本试剂盒最多大约可提取30 μ g左右的总RNA。

9. 对于细胞数较少的样品（如少于 5×10^4 ），建议使用EZBioscience品牌的EZ-press Cell to cDNA Kit PLUS(货号为B0003)；对于细胞数极少的样品（1~1000），建议使用EZBioscience品牌的EZ-press Single Cell to cDNA Kit(货号为B0011)，以便能做出最佳的实验结果。

代表性实验结果



上图：EZ-press RNA Purification Kit与TRIzol (Invitrogen)方法的对比测试。实验内容：检测A549细胞中4个不同基因的mRNA表达水平。实验结果表明：使用本产品得到了优异的结果，比TRIzol法得到的结果更好，两组结果的相关系数可达 $R^2=0.9898$ 。结论：本产品能够很好地替代TRIzol方法进行细胞RNA的提取及逆转录，得到的结果优于TRIzol方法。



左图：M：250bp DNA Ladder.

A549细胞，Lanes 1~3为本产品提取的RNA；Lanes 4~6为TRIzol (Invitrogen)方法提取的RNA。

Lanes 1、4：20万细胞；

Lanes 2、5：40万细胞；

Lanes 3、6：60万细胞。

由图可见：EZ-press RNA Purification Kit提取RNA的得率明显高于TRIzol方法。