

EZ-Press 96 Tissue RNA Purification Kit

说明书

Cat. No.: EZ4004

一、产品简介

EZ-Press 96 Tissue RNA Purification Kit 可用于 96 个或 192 个组织样品（不超过 30 mg）的 RNA 提取。EZ-Press 96 Tissue RNA Purification Kit 为药物筛选、治疗监测和基础研究等领域的研究提供了高效、高通量的 RNA 样品制备解决方案。

本试剂盒取代了目前耗时、复杂的方法，包括乙醇沉淀、大量洗涤步骤或使用苯酚等有毒物质。纯化的 RNA 可用于多种下游应用，包括：cDNA 合成、RT-PCR、RT-qPCR，Northern、dot 和 slot blot 分析等，以及引物延伸、RNase/S1 核酸酶保护和基因芯片检测等。此外，EZ-Press 96 Tissue RNA Purification Kit 可用于纯化来自酶促反应的 RNA，例如：DNA 酶消化、蛋白酶消化、RNA 连接或标记反应等。

二、产品组分

组分	货号（规格）	EZ4004-S (2 × 96 Preps)	EZ4004-L (12 × 96 Preps)
96-Well RNA Plates ^{*1}		2	12
Caps for Elution Plates ^{*1}		2	12
Micro-pore Tape Sheets ^{*1}		4	24
96-Well Collection Plates (Square Hole) ^{*1}		4	24
96-Well Elution Plates (Round Hole) ^{*1}		1 × 2	1 × 12
Lysis Buffer		110 ml	220 ml × 3
Wash Buffer 1 ^{*2}		70 ml × 2	240 ml × 4
Wash Buffer 2 ^{*2}		30 ml	90 ml × 2
Elution Buffer ^{*3}		30 ml	100 ml × 2

注：*1. 为简化叙述，这 5 种装置在本文中的简称依次为：RNA 提取孔板、孔板盖、透气封板膜/封板膜、收集孔板、洗脱孔板；*2. 首次使用 Wash Buffer 1 和 Wash Buffer 2 前，每瓶须加入瓶身标签所示体积的无水乙醇（Wash Buffer 1 与无水乙醇的体积比为 1:1，Wash Buffer 2 与无水乙醇的体积比为 1:4），充分混匀后才可使用；*3. 本试剂盒中的 Elution Buffer 为 Nuclease-free ddH₂O。

三、保存条件

Lysis Buffer 置于 4°C 避光保存，其余组分室温（15~25°C）保存，可稳定保存 12 个月。过期日期详见产品标签中有效期信息。

四、注意事项

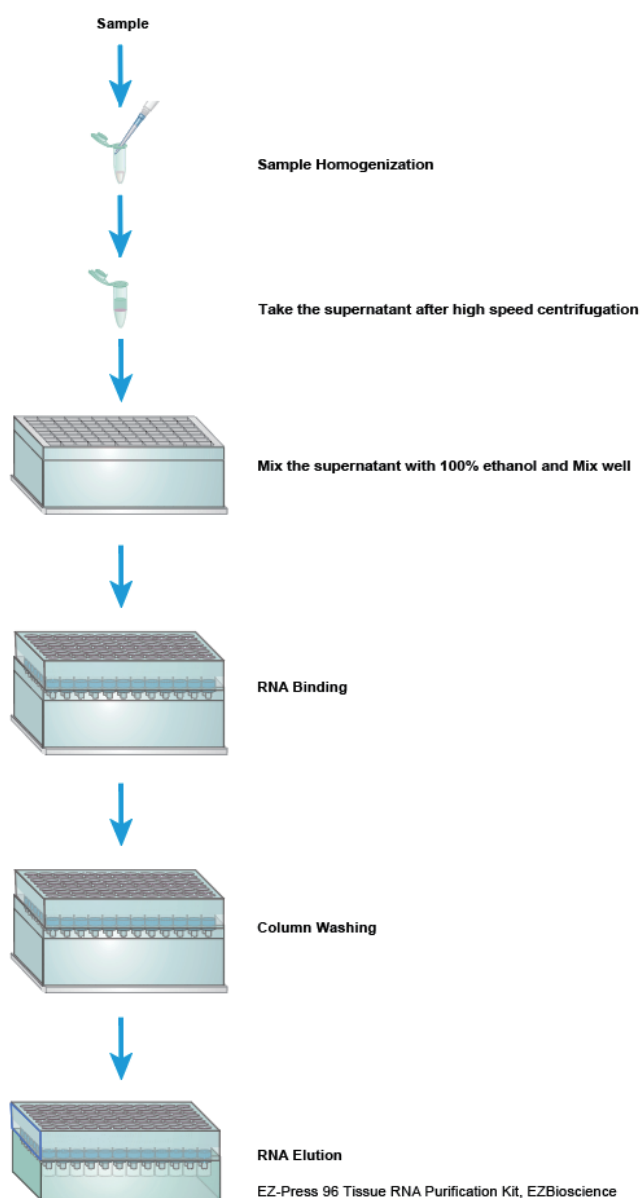
- 首次使用 Wash Buffer 1 和 Wash Buffer 2 前，每瓶须加入瓶身标签所示体积的无水乙醇（Wash Buffer 1 与无水乙醇的体积比为 1:1，Wash Buffer 2 与无水乙醇的体积比为 1:4），充分混匀后才可使用。

- 关于离心操作：所有的孔板离心操作，均需要将 96-Well RNA Plates（以下简称为：RNA 提取孔板）根据需要置于 96-Well Collection Plates（以下简称为：收集孔板）上或 96-Well Elution Plates（以下简称为：洗脱孔板）上，加完液体后、离心前需在 RNA 提取孔板上盖上 Micro-pore Tape Sheet（以下简称为：透气封板膜/封板膜）。收集孔板在清洗阶段需重复使用，洗脱阶段换用洗脱孔板。
- 本试剂盒中加入氯仿后的离心操作（对应操作步骤“2.4”）需在 4°C 进行，实验前需提前预冷离心机；其余的操作步骤在室温进行。
- 每个样品的组织用量建议为 5 ~ 30 mg。
- 为了您的安全和健康，请穿戴实验服、一次性乳胶手套和一次性口罩。

五、自备材料

带深孔板专用的水平离心转头、且转速不低于 2100 g 的台式离心机，无水乙醇，氯仿（氯仿替代物）和水平摇床等。

六、实验流程



七、操作步骤

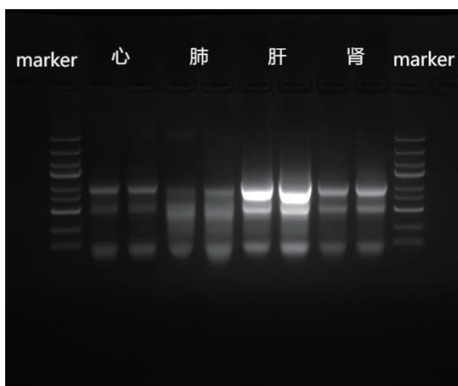
1. 先根据样品数放置数个收集孔板（需重复使用），上面放置相同数量的 RNA 提取孔板，做好标记。
2. 样品裂解
 - ① 每个样品取一定重量的组织（5~30 mg）放入专用的组织研磨管中（推荐 QSP 的 2 ml 离心管），加入 500 μ l 的 Lysis Buffer，加入 3~4 颗小钢珠或氧化锆研磨珠，将组织研磨管放入匀浆机（匀浆机的转头提前在 -80°C 预冷），配平后，拧紧转头盖，60 Hz 匀浆 30 sec，结束后观察匀浆情况，若无肉眼可见的固体颗粒，则可进入下一步；若有肉眼可见的固体颗粒，则等待 1 min 后重复匀浆一次；直至匀浆产物无明显肉眼可见的固体颗粒（如匀浆 2 次后仍然有固体颗粒的，可将匀浆机的频率提高到 70 Hz 重复匀浆一次）。
 - ② 将匀浆后的产物置于水平摇床上，150 rpm 室温摇 5 min，以充分裂解组织。
 - ③ 加入 150 μ l 氯仿，用手快速剧烈振荡混匀 15 sec（不建议涡旋混匀），室温放置 3~5 min。
 - ④ 15000 g（约 13000 rpm），4°C 离心 5 min，将上清液转移至收集孔板中（注意：吸取上层液体时不要吸到中间层和下层液体，建议只吸取 200 μ l，否则可能会导致杂质残留、RNA 纯度下降等）。
3. 每个孔加入 320 μ l 无水乙醇（1.6 倍体积），吹打 10 次充分混匀。如果出现沉淀，建议用移液器吹打至沉淀不可见为止。转移上述混合液至 RNA 提取孔板中（RNA 提取孔板提前放在收集孔板上），盖上透气封板膜（防止离心时杂质进入孔中）。
4. 置于水平离心机上 2100~5000 g 室温离心 4 min，直到液体完全被离心下去，然后停止离心，倒掉废液，将收集孔板在干净的吸水纸上倒扣 2 下吸去残留液体，然后将 RNA 提取孔板放回同一个收集孔板上，撕开封板膜。
5. 加入 600 μ l Wash Buffer 1，盖上封板膜，置于水平离心机上 2100~5000 g（此步骤及之后的离心转速越高越好，可设置为离心机的最高转速）室温离心 4 min，直到液体完全被离心下去，然后停止离心。取下 RNA 提取孔板，倒掉废液，将收集孔板在吸水纸上倒扣 2 下吸去残留液体，然后将 RNA 提取孔板放回同一个收集孔板上，撕开封板膜。
6. 重复上述步骤一次。
7. 加入 600 μ l Wash Buffer 2，盖上封板膜，水平离心机上 2100~5000 g（设置为离心机的最高转速最佳）室温离心 12 min，以充分去除 Wash Buffer 2。
8. 将上述离心后的 RNA 提取孔板置于一个新的洗脱孔板上，弃去旧的封板膜，室温放置 3 min，使乙醇充分挥发。然后向每个孔中间的膜上加入 60 μ l 的 Elution Buffer（或 Nuclease-free ddH₂O），盖上一个新的透气封板膜，室温放置 2 min，然后置于水平离心机上，2100~5000 g 室温离心 4 min，洗脱 RNA（洗脱后的体积会比加入的总体积少大约 15 μ l）。
9. 将洗脱得到的 RNA 孔板盖上配套的孔板盖，取 1~2 μ l RNA 用 Nanodrop 测浓度和纯度（测浓度时须用 Elution Buffer 作为 Blank 对照，并可根据需要跑胶观察条带），每个样品根据需要取 100 ng~1 μ g 做逆转录（通常可取 10 μ l 该 RNA 作模板用于逆转录反应）。然后将 RNA 置于 -80°C 保存。

八、代表性实验结果

1. 使用本试剂盒提取心（20 mg）、肺（20 mg）、肝（10 mg）和肾（10 mg）样品，各 2 个重复。所得的总 RNA 使用 Nanodrop 检测的结果如下表：

样品	浓度 (ng/μl)	OD260	OD280	260/280	260/230
心	276.9	6.924	3.451	2.01	1.94
	296.6	7.415	3.709	2.00	1.93
肺	481.2	12.031	6.058	1.99	1.90
	504.5	12.612	6.358	1.98	1.96
肝	1056.6	26.416	13.132	2.01	1.92
	1254.5	31.364	15.479	2.03	1.94
肾	464.4	11.610	5.835	1.99	1.89
	527.1	13.177	6.674	1.97	1.97

2. 琼脂糖凝胶电泳。电泳条件：上样量为 10 μl，琼脂糖凝胶浓度为 1%，电泳电压 180 V，电泳时间 18 min。marker: DL5000 DNA marker; Lanes 2 ~ 9 分别为心、肺、肝和肾样品获得的 RNA。



结果表明，本试剂盒能够提取得到相对高浓度和高纯度的总 RNA。

九、常见问题与解决方法

常见问题	可能的原因	解决方法
RNA 提取孔板堵塞	组织用量过多，加入无水乙醇后没有将沉淀充分吹散	减少组织的用量，以确保在说明书建议的范围内；如加入无水乙醇后产生沉淀，则须吹打 10 次或以上，直到将沉淀彻底吹散为止。
RNA 产量低	Wash Buffer 使用前未加入正确体积的无水乙醇	首次使用 Wash Buffer 1 和 Wash Buffer 2 前，每瓶须加入瓶身标签所示体积的无水乙醇，充分混匀后才可使用。
RNA 降解	样品处理不当	确保操作过程中没有中断。取组织时动作要快，时间要短，防止 RNA 降解。将组织充分裂解后，建议尽快完成后续步骤。
	RNA 酶污染	确保操作过程使用的试剂和耗材无 RNA 酶。每次实验前，须用核酸酶清除试剂将离心机的轴和水平离心机吊篮仔细擦拭以灭活核酸酶。
当组织用量过少时，RNA 的 260/280 和 260/230 比值偏低，是否会影响后续实验	RNA 浓度较低，导致微量残留杂质的本底吸光度影响到了 RNA 的紫外吸光度值	建议提高组织用量，不过残留杂质含量极其微小，对后续的逆转录和 qPCR 等反应无影响。