

## EZ-Press 96 RNA Purification Kit PLUS

### 说明书

Cat. No.: EZ4002

#### 一、产品简介

EZ-Press 96 RNA Purification Kit PLUS 是从  $2 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5$  个人类或动物细胞中同时分离 96 个或 192 个 RNA 样品的一款理想的试剂盒。EZ-Press 96 RNA Purification Kit PLUS 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。在不到 1 h 的时间内，当并行处理 2 个 96 孔 RNA 板时，可以获得多达 192 个高纯度 RNA 样品（每个 RNA 样品约需 20 sec）。

EZ-Press 96 RNA Purification Kit PLUS 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、氯仿等有毒物质。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 RNA Purification Kit PLUS 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)	EZ4002-S (2 × 96 Preps)	EZ4002-L (12 × 96 Preps)
gDNA Removing 96 Plates <sup>*1</sup>		2	12
96-Well RNA Plates <sup>*1</sup>		2	12
Micro-pore Tape Sheets <sup>*1</sup>		6	36
Caps for Elution Plates <sup>*1</sup>		2	12
96-Well Collection Plates (Square Hole) <sup>*1</sup>		4	12 × 2
96-Well Elution Plates (Round Hole) <sup>*1</sup>		2	12
Buffer RLB		40 ml	240 ml
Buffer RW1 <sup>*2</sup>		70 ml	210 ml × 2
Buffer RW2 <sup>*2</sup>		30 ml	90 ml × 2
Elution Buffer <sup>*3</sup>		30 ml	100 ml × 2

注：\*1. 为简化叙述，这 6 种装置在本文中的简称依次为：DNA 清除孔板、RNA 提取孔板、透气封板膜/封板膜、孔板盖、收集孔板和洗脱孔板；\*2. 首次使用 Buffer RW1 和 Buffer RW2 前，每瓶须加入瓶身标签所示体积的无水乙醇（Buffer RW1 与无水乙醇的体积比为 1:1，Buffer RW2 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 ddH<sub>2</sub>O。

#### 三、保存条件

本产品中的 gDNA Removing 96 Plates 需保存在 2 ~ 8°C，其余所有组分保存在室温（15 ~ 25°C），可稳定保存 12 个月。

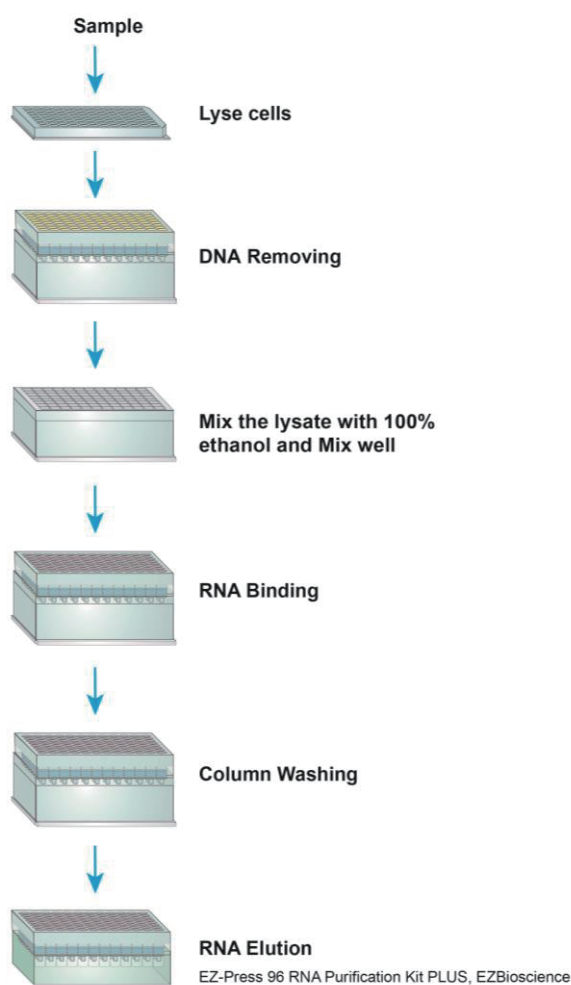
## 四、注意事项

1. 首次使用 Buffer RW1 和 Buffer RW2 前，每瓶须加入瓶身标签所示体积的无水乙醇（Buffer RW1 与无水乙醇的体积比为 1:1，Buffer RW2 与无水乙醇的体积比为 1:4），充分混匀后才可使用。
2. 关于离心操作：**在进行 DNA 去除步骤时**，需要将 gDNA Removing 96 Plates（以下简称为：DNA 清除孔板）置于 96-Well Collection Plates（以下简称为：收集孔板）上，加完液体后离心前在 DNA 清除孔板上盖上 Micro-pore Tape Sheet（以下简称为：透气封板膜/封板膜）；**在进行 RNA 提取纯化步骤时**，需要将 96-Well RNA Plates（以下简称为：RNA 提取孔板）置于收集孔板上，加完液体后离心前在 RNA 提取孔板上盖上透气封板膜；**在进行 RNA 洗脱步骤时**，需要将 RNA 提取孔板置于 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 提取孔板上盖上透气封板膜。收集孔板在清洗阶段需重复使用，洗脱阶段换用洗脱孔板。
3. 每个样品的细胞数建议范围为  $2 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5$ 。
4. 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，无水乙醇和水平摇床等。

## 六、实验流程



## 七、操作步骤

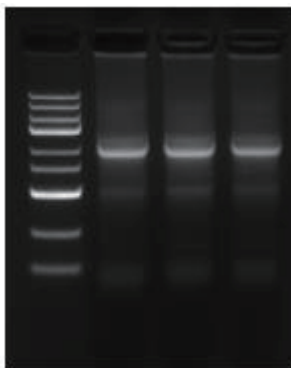
1. 提前准备好与样品相同数量的以下材料：DNA 清除孔板和收集孔板的组装元件、RNA 提取孔板和收集孔板（需重复使用）的组装元件，分别做好标记。
2. 清洗细胞
  - a. **贴壁细胞**：弃去培养基后，PBS 清洗细胞一次，然后吸弃 PBS。
  - b. **悬浮细胞**：将细胞培养孔板 250 g 离心 5 min，小心地弃净上清。
3. 裂解细胞
  - a. **96 孔板培养的细胞**：每个孔加入 120  $\mu$ l 的 Buffer RLB（裂解液），水平摇床上 150 rpm（120 ~ 180 rpm）摇 5 min。
  - b. **48 孔板或 24 孔板培养的细胞**：每个孔加入 150  $\mu$ l 的 Buffer RLB（裂解液），水平摇床上 150 rpm（120 ~ 180 rpm）摇 5 min。
4. 将上述细胞裂解产物依次转移至 DNA 清除孔板中（注意与培养孔板中的样品保持一致的顺序），盖上透气封板膜，置于水平离心机上 2100 g ~ 5000 g 离心 4 min。
5. 离心结束后，弃去 DNA 清除孔板，依次往收集孔板中加入等体积的无水乙醇，吹打 10 次混匀后，转移至上述提前放置好的 RNA 提取孔板中（注意与培养孔板中的样品保持一致的顺序），盖上封板膜。
6. 置于水平离心机上 2100 g ~ 5000 g 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。
7. 加入 600  $\mu$ l Buffer RW1，盖上封板膜，置于水平离心机上 2100 g ~ 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）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。
8. 加入 600  $\mu$ l Buffer RW2，盖上封板膜，水平离心机上 2100 g ~ 5000 g（设置为离心机的最高转速最佳）离心 12 min，以充分去除 Buffer RW2。
9. 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 30  $\mu$ l 的 Elution Buffer（或 Nuclease-free ddH<sub>2</sub>O），盖上一个新的透气封板膜，室温放置 1 min，然后置于水平离心机上，2100 g ~ 5000 g 室温离心 4 min，洗脱 RNA。
10. 离心结束后，将上述 RNA 提取孔板和洗脱孔板拿出，撕开封板膜，再次向 RNA 提取孔板每个孔中间的膜上加入 30  $\mu$ l 的 Elution Buffer（或 Nuclease-free ddH<sub>2</sub>O），盖上封板膜（无需更换封板膜），室温放置 1 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  $\mu$ l）。
11. 将洗脱得到的 RNA 孔板盖上配套的孔板盖，取 1 ~ 2  $\mu$ 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，如需进行凝胶电泳，建议 Loading Buffer 的用量加倍使用），每个样品根据需要取 100 ng ~ 1  $\mu$ g 做逆转录（通常可取 10  $\mu$ 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

使用本试剂盒提取 40 万细胞量的 293T 细胞样品，所得的总 RNA 使用 Nanodrop 检测的结果如下：

样品	浓度 (ng/μl)	260/280	260/230
1	184.4	2.03	2.00
2	189.7	2.01	2.03
3	177.2	2.02	2.04

琼脂糖凝胶电泳结果如下图所示：



由凝胶电泳结果可见，提取得到的 RNA 具有较高的完整性，且无明显基因组 DNA 残留。表明用本试剂盒提取得到的总 RNA 具有较高的浓度、纯度和完整性，且无基因组残留。

## 九、常见问题与解决方法

常见问题	可能的原因	解决方法
RNA 产量低	裂解不充分或细胞量过多堵塞了 RNA 吸附膜。	控制每个样品的细胞量在建议范围内： $2 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5$ 。 增加 Buffer RLB 的用量，保证细胞裂解充分。
	样品处理不当	确保操作过程中没有中断。将细胞充分裂解后，建议尽快完成后续步骤。
RNA 降解	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。
	当细胞数少于 $5 \times 10^4$ 时，RNA 的 A260/280 和 A260/230 比值偏低，是否会影响后续实验	建议提高细胞量，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。
做凝胶电泳检测，RNA 加样时溢出孔中	Loading Buffer 浓度偏低	Loading Buffer 浓度加倍即可解决。