

# EZ-Press 96 RNA Purification Kit

## 说明书

**Cat. No.: EZ4001**

### 一、产品简介

EZ-Press 96 RNA Purification Kit 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 样品的理想试剂盒。EZ-Press 96 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。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 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 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）	EZ4001-S (2 × 96 Preps)	EZ4001-L (12 × 96 Preps)
96-Well RNA Plates* <sup>1</sup>		2	12
Caps for Elution Plates* <sup>1</sup>		2	12
Micro-pore Tape Sheets* <sup>1</sup>		4	24
96-Well Collection Plates (Square Hole)* <sup>1</sup>		2	12
96-Well Elution Plates (Round Hole)* <sup>1</sup>		2	12
Buffer RLB		80 ml	240 ml × 2
Buffer RW1* <sup>2</sup>		70 ml	210 ml × 3
Buffer RW2* <sup>2</sup>		30 ml	90 ml × 3
Elution Buffer* <sup>3</sup>		30 ml	30 ml × 8

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 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

本产品所有组分置于室温保存，可稳定保存 18 个月。过期日期详见产品标签中有效期信息。

### 四、注意事项

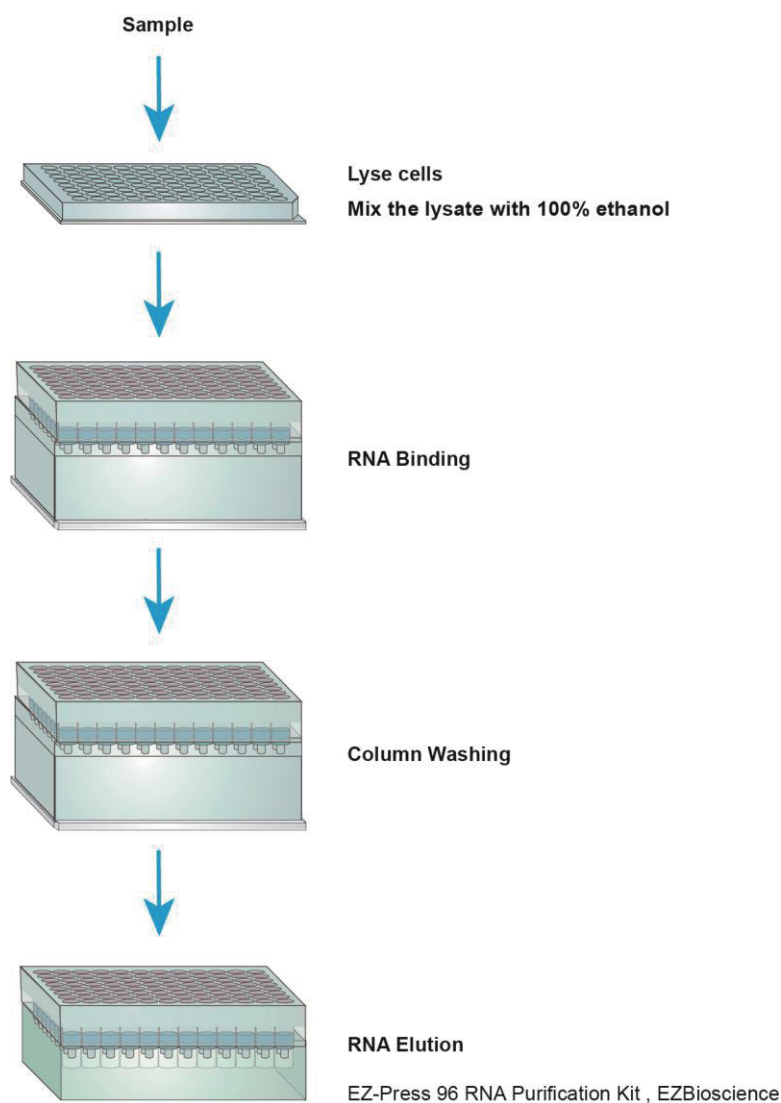
- 首次使用 Buffer RW1 和 Buffer RW2 前，每瓶须加入瓶身标签所示体积的无水乙醇（Buffer RW1 与无水乙醇的体积比为 1:1，Buffer RW2 与无水乙醇的体积比为 1:4），充分混匀后才可使用。

- 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。
- 每个样品的细胞数建议范围为  $2 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5$ 。
- 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。
- 本试剂盒提取得到的总 RNA，可能会残留极少量的基因组 DNA，对于后续的逆转录和 qPCR 不会造成显著的影响（尤其当逆转录步骤中含有去除基因组 DNA 的流程，或 qPCR 引物为跨内含子设计时）；对于部分对基因组 DNA 残留极为敏感的实验，推荐使用 **EZ4002** 试剂盒（含有专用的基因组 DNA 清除孔板，能够有效的去除基因组 DNA）。

## 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. 先根据细胞的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. 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。

注：细胞收样时，如无法立即进行提取，可在去除培养基后，将细胞孔板立即冻存在  $-80^{\circ}\text{C}$ ，要做提取实验前，将裂解液提前倒入加样槽中，然后取出细胞孔板后立即加入裂解液（不可解冻细胞），置于摇床上 150 rpm（120 ~ 180 rpm）摇 10 min，然后加入等体积的无水乙醇。也可在去除培养基后加裂解液冻存（解冻后需在摇床上 150 rpm（120 ~ 180 rpm）摇约 20 ~ 30 min，直至裂解产物完全融化且当中无不溶物，然后加等体积的无水乙醇。

3. 裂解细胞

对于 **24、48 或 96 孔板培养的细胞**：每个孔加入 100 ~ 150  $\mu\text{l}$  的 Buffer RLB（裂解液），水平摇床上 150 rpm（120 ~ 180 rpm）摇 5 min。

4. 每个孔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），盖上透气封板膜（从而防止离心时杂质进入孔中）。

5. 置于水平离心机上 2100 ~ 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。

6. 加入 600  $\mu\text{l}$  Buffer RW1，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）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。

7. 加入 600  $\mu\text{l}$  Buffer RW2，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）离心 12 min，以充分去除 Buffer RW2。

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 ~ 100  $\mu\text{l}$  的 Elution Buffer（或 Nuclease-free ddH<sub>2</sub>O），将提取孔板连同洗脱孔板在桌面上用力敲击 10 下，确保洗脱液完全进入膜中，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 ~ 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  $\mu\text{l}$ ）。

9. 将洗脱得到的 RNA 孔板盖上配套的孔板盖，取 1 ~ 2  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{g}$  做逆转录（通常可取 10  $\mu\text{l}$  该 RNA 作模板用于逆转录反应）。然后将 RNA 置于  $-80^{\circ}\text{C}$  保存。

## 八、代表性实验结果

1. 使用本试剂盒提取  $5 \times 10^4 \sim 2 \times 10^5$  的 293T 细胞样品，所得的总 RNA 使用 Nanodrop 检测的结果如下表：

细胞数	浓度 (ng/ $\mu$ l)	OD260	OD280	260/280	260/230
$2 \times 10^5$	113.1	2.828	1.385	2.04	2.16
$1 \times 10^5$	46.2	1.154	0.559	2.07	2.06
$5 \times 10^4$	18.8	0.469	0.230	2.04	1.81

由上述表格可见，本试剂盒能够提取得到相对高浓度和高纯度的总 RNA，在细胞数不低于  $5 \times 10^4$  个细胞时，均能得到较好的 OD 比值。 $5 \times 10^4$  个 293T 细胞得到的总 RNA 大约为 600 ng  $\sim$  1  $\mu$ g。

## 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。
RNA 降解	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 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 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。