

EZ-press RNA Purification Kit PLUS 说明书

Cat.No.:B0004-plus

使用本产品前，请务必仔细阅读本说明书，以保证操作正确

产品组分

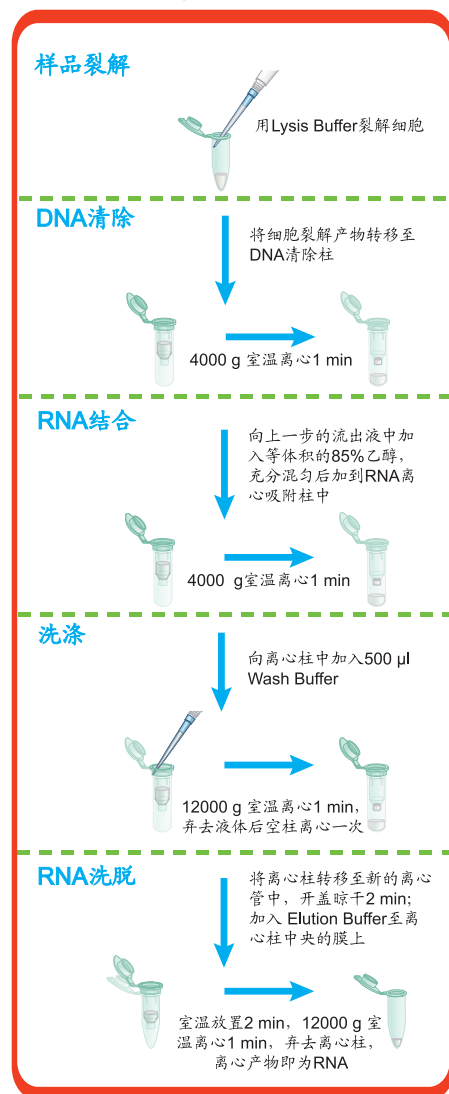
组分	B0004-plus (100 Preps)
Lysis Buffer	55 ml
Wash Buffer ¹	13 ml
Elution Buffer	10 ml
DNA Removing Spin Columns (with Collection Tubes)	100 Preps
Spin Columns for RNA (with Collection Tubes)	100 Preps

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

本产品中的DNA Removing Spin Columns需避光保存在4°C，其余所有组分保存在室温，可稳定保存12个月。过期日期详见产品标签中有效期信息。

实验流程



注意

1. Wash Buffer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. 85%乙醇的配制方法：按照无水乙醇:灭过菌的ddH₂O = 85:15的体积比例进行配制。
3. 建议使用前把Elution Buffer分装为3~4份，以减小污染的概率。
4. RNA提取须在室温进行，提取过程中不可置于冰上。
5. 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。
6. 细胞充分裂解以后，如果不想立即进行RNA提取，可将裂解产物转移至离心管中，冻存于-80°C冰箱中；提取RNA时，需要解冻并恢复到室温才可进行后续的实验步骤。
7. 洗脱RNA时，应将洗脱液加到离心柱中央的膜上（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 ≤ 3 × 10⁶ 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，防止因细胞被晾干导致RNA严重降解）。
 - b) 加入450 μl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400 μl；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离心管中直接冻存在-80°C。

1B. 对于悬浮细胞或者细胞数 ≥ 3 × 10⁶ 的贴壁细胞样品

- a)（悬浮细胞直接从步骤b开始）用胰酶消化细胞，然后加培养基终止消化。
- b) 取出约1 × 10⁶ ~ 3 × 10⁶ 细胞转移至1.5 ml离心管中（对于体积很小的免疫细胞如T、B细胞等，建议取2 × 10⁶ ~ 1 × 10⁷），500 g离心3~5 min，用移液器吸弃上清。
- c) 加入450 μl裂解液，将移液器量程调至400 μl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。

DNA清除（过DNA清除柱）

2. 将上述细胞裂解产物转移至DNA清除柱（DNA Removing Spin Column）中，4000 g离心1 min（注：DNA将结合在吸附柱上而被去除，RNA则在流出液中）；弃去吸附柱，保留收集管（Collection Tube）中的流出液。

RNA结合（过RNA离心吸附柱）

3. 向上述DNA收集管里的流出液中加入等体积的85%乙醇，充分吹打混匀。然后将混合液转移至RNA离心吸附柱（Spin Column for RNA）中，4000 g离心1 min（若离心后柱中有液体残留，可用12000 g再次离心1 min），弃去收集管中的液体（倒掉液体后，可将收集管倒扣在吸水纸上叩几下），然后把离心柱套回收集管中。

洗涤

4. 加入500 μl洗涤液（Wash Buffer）到离心柱中，12000 g离心1 min，将离心柱从收集管中取出并倒掉液体（注意：应小心操作，防止离心柱底部接触到液体），将收集管倒扣在吸水纸上轻轻叩击两下，然后把离心柱套回收集管中，12000 g空柱离心1 min。
5. 弃去收集管，将离心柱转移至无RNase的1.5 ml离心管中，开盖晾干2 min。

RNA洗脱

6. 向离心柱中央的膜上加入30~50 μl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充分溶解后再次离心，能增加RNA产量；若使用了预热的洗脱液，则无需进行此可选操作）。弃去离心柱，所得的RNA应迅速转移到冰上放置并在充分混匀后进行浓度测定，然后进行后续实验，或储存于-80°C备用（因RNA不稳定，建议尽快进行逆转录或其他后续实验）。

EZ-press RNA Purification Kit PLUS Trouble Shooting

1. 本产品提取的RNA浓度过低，OD260/280或OD260/230小于1.8，或qPCR结果不太好，如Ct值过大或某些特异性基因不能正常扩增。

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。建议产品开封后，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无水乙醇混匀后才可使用（Wash Buffer与无水乙醇的体积比为1:4）。

3. 如果提取组织样品，此组织样品须为容易研磨的组织比如肿瘤组织，且组织样品裂解前须称重，使组织量不超过10 mg；研磨成匀浆后室温静置5 min使之进一步裂解，然后12000 g离心1 min取上清。

4. 细胞裂解产物或组织裂解产物离心后的上清先过DNA清除柱，DNA结合在柱子的膜上而被去掉，RNA则保留在流出液中；在

结合RNA离心吸附柱前需要向流出液中加入等体积的85%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）。

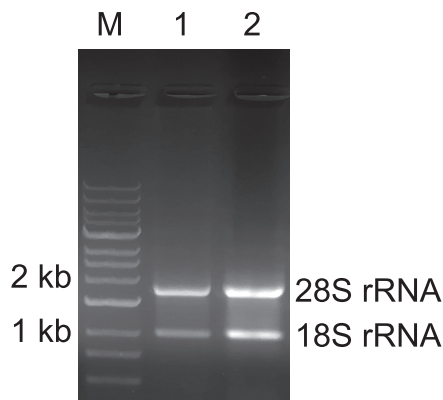
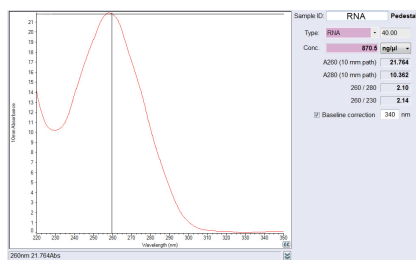
6. 洗脱液的体积可以根据需要在一定范围内调整（一般30~50 μ l，最少不可少于20 μ l，否则无法充分溶解RNA），以浓度满足后续实验需求为宜。洗脱时将洗脱液提前预热到60°C或者重复洗脱一次及延长放置时间至3 min均可提高RNA的产量。

7. 关于RNA浓度与纯度：本产品提取的RNA，使用NanoDrop等微量分光光度计测定OD260/280和OD260/230在1.9~2.3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，使用本产品提取的RNA，如果OD260/280和OD260/230这两个比值在正常范围，即使RNA浓度低，也能做出优异的qPCR结果。使用EZBioscience品牌的逆转录试剂盒（货号为EZB-RT2 / A0010C）与qPCR试剂（货号为A0001/A0012），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，本产品最多大约可提取30 μ g左右的总RNA。

代表性实验结果

本产品用于提取 A549 细胞中总RNA 的测试结果请见下图：



左图：使用本产品从A549细胞中提取的RNA用Nanodrop检测的结果（30 μ l Elution Buffer洗脱）。由左图可见，本产品提取的RNA具有很好的纯度和较高的浓度。

右图：从A549细胞中提取RNA用琼脂糖凝胶电泳检测的结果（30 μ l Elution Buffer洗脱/溶解RNA，取5 μ l上样）。M：250bp DNA Ladder，Lanes 1为TRIzol (Invitrogen)方法提取的RNA；Lanes 2为本产品提取的RNA。由右图可见：本产品提取RNA的得率明显高于TRIzol方法。