

EZ-press Tissues/Cells RNA Purification Mini Kit PLUS

说明书

Cat. No.: EZB-RN9

一、产品简介

EZ-press Tissues/Cells RNA Purification Mini Kit PLUS 是从部分非坚韧的动物组织和 $5 \times 10^4 \sim 3 \times 10^6$ 个细胞中快速提取得到高质量总 RNA 的试剂盒，可取代传统 TRIzol 法提取 RNA，且无需异丙醇/乙醇沉淀或使用苯酚、氯仿等有毒物质，极大的简化了提取步骤和缩短实验时间。本产品提供了基因组 DNA 清除柱，能够快速去除样品中残留的基因组 DNA，有效避免了残留基因组 DNA 对后续实验的影响。提取的总 RNA 纯度高，完整性好，可用于 RT-PCR、qPCR 和二代测序等下游实验。

二、产品组分

组分	货号（规格）	EZB-RN9-T (6 Preps)	EZB-RN9 (50 Preps)
Lysis Buffer		4 ml	28 ml
Wash Buffer 1		5 ml	40 ml
Wash Buffer 2 ^{*1}		1.6 ml	13 ml
Elution Buffer		1 ml	10 ml
DNA Removing Spin Columns (with Collection Tubes)		6 Preps	50 Preps
RNA Columns (with Collection Tubes)		6 Preps	50 Preps

注：*1. 首次使用 Wash Buffer 2 前，须加入瓶身标签体积的无水乙醇并充分混匀（Wash Buffer 2 与无水乙醇的体积比为 1:4）。

三、保存条件

DNA Removing Spin Columns (with Collection Tubes)需置于 4℃ 保存，其余组分置于室温（15 ~ 25℃）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。

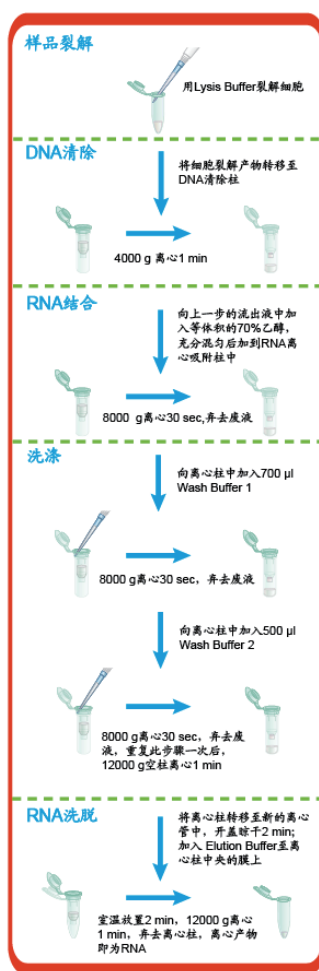
四、注意事项

- 1. 首次使用 Wash Buffer 2 前，须加入瓶身标签体积的无水乙醇并充分混匀（Wash Buffer 2 与无水乙醇的体积比为 1:4）。
- 2. 本产品适用于部分非坚韧的动物组织和细胞 RNA 提取，每个细胞样品的细胞数建议范围为 $5 \times 10^4 \sim 3 \times 10^6$ 。组织样品的种类和用量请见下表：

组织类型	心脏	肝脏	肾脏	脾脏	肺	大脑	脂肪
建议用量	5 ~ 30 mg	2 ~ 15 mg	2 ~15 mg	1 ~ 5 mg	2 ~ 10 mg	10 ~ 40 mg	10 ~ 40 mg
最适用量	20 mg	5~10 mg	5~10 mg	2~3 mg	5 mg	30 mg	30 mg

注意：不在表格中的组织，需要先进行预实验，检测是否能够提取，经 Nanodrop 和琼脂糖凝胶电泳检测合格的，方可用本试剂盒进行 RNA 提取。

五、实验流程



六、操作步骤

A. 实验前的准备工作:

1. 桌面先用 75%乙醇进行喷洒擦拭, 再用核酸酶清除剂 (如 EZB-RC1) 喷洒, 停留 3 min 后擦拭干净; 移液器用 75%乙醇沾湿的干净的纸擦拭一遍, 再用核酸酶清除剂沾湿的干净的纸擦拭一遍。
2. 使用无酶水配制 70%的乙醇。

B. 操作步骤:

对于细胞样品:

1. 取 $5 \times 10^4 \sim 3 \times 10^6$ 的细胞样品 (优先建议使用 6 孔板或 35 mm 培养皿培养的细胞), 弃去培养基后, 加入 450 μ l Lysis Buffer (裂解液) (如细胞为加药处理的, 建议先用 PBS 清洗细胞一次, 再加入裂解液裂解), 室温水平摇床上 150 rpm 摇 5 min。
2. 将上述裂解产物用移液器吹打 5 下, 转移至 DNA Removing Spin Columns (with Collection Tubes) (DNA 清除柱) 中, 4000 g 离心 30 sec; 弃去离心柱, 保留收集管中的流出液。直接进行第 6 步。

对于组织样品:

1. 根据上表的建议用量及情况称取动物组织, 放进 2 ml 研磨用的离心管中 (可用 QSP 或 Eppendorf 的 2 ml 离心管)。

2. 按照 450 μ l 裂解液/每样品的用量，将裂解液加入上述离心管中，然后每管加入体积比 1% 的巯基乙醇。
3. 每管放入 4 ~ 6 个氧化锆研磨珠，将组织放入组织研磨仪中，设置 70 Hz, 30 sec, 匀浆 3 ~ 4 次，直至匀浆充分、无明显固体物为止。然后将上述样品离心管置于室温水平摇床上，150 rpm 摇 5 min，充分裂解组织，释放 RNA。
4. 12000 g 室温离心 2 min，小心地将离心管取出。
5. 小心地吸取约 400 μ l 上清，转移至 DNA 清除柱中，4000 g 离心 1 min；弃去离心柱，保留收集管中的流出液。
6. 向上述收集管里的流出液中加入等体积的 70% 乙醇，充分吹打 10 下混匀（如出现絮状物，需将絮状物吹打至不可见为止）。然后将混合液转移至 RNA Columns (with Collection Tubes) (RNA 离心吸附柱) 中，8000 g 离心 30 sec（若离心后柱中有液体残留，可将转速提高到 12000 g，再次离心 30 sec），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扣几下），然后将离心柱放回收集管中。
7. 加入 700 μ l 的 Wash Buffer 1，8000 g 离心 30 sec，弃去废液，将离心柱放回收集管中。
8. 加入 500 μ l 的 Wash Buffer 2，8000 g 离心 30 sec，弃去废液，将离心柱放回收集管中。
9. 重复上述步骤一次。
10. 12000 g 空柱离心 1 min。
11. 弃去收集管，将离心柱转移至提前准备好的无酶的 1.5 ml EP 管中，开盖晾干 2 min。
12. 向离心柱中央的膜上加入 30 ~ 50 μ l Elution Buffer（洗脱液），室温放置 2 min。12000 g 离心 1 min。
13. 可选步骤：重复上述洗脱步骤一次，可提高大约 15% ~ 30% 的产量，同时 RNA 浓度会有一定程度的降低。
14. 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，然后储存于 -80°C 备用。

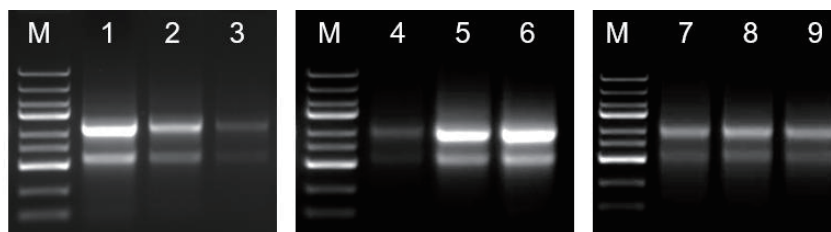
七、代表性实验结果

1. 使用本试剂盒分别提取不同细胞数的 A549 细胞以及各种组织的 RNA，提取的 RNA 的浓度、纯度如下表：

样品量		核酸浓度 (ng/ μ l)	260/280	260/230
A549 细胞数	2×10^6	613.3	2.07	2.15
		643.2	2.06	2.16
	2×10^5	80.7	2.07	2.04
		86.3	2.06	1.98
	5×10^4	24.2	2.05	1.72
		23.0	2.04	1.59
组织量	心 10 mg	43.1	2.09	2.03
		47.0	2.10	2.02
	肝 10 mg	539.6	2.03	2.13
		556.8	2.02	2.11
	肾 10 mg	313.4	2.04	2.09
		345.1	2.02	2.09
	脾 5 mg	469.6	1.99	2.10
		480.0	1.99	2.07
	肺 5 mg	188.8	2.04	2.14
		191.6	2.04	2.14
	脂肪 25 mg	146.2	2.05	2.08
		143.7	2.04	2.13

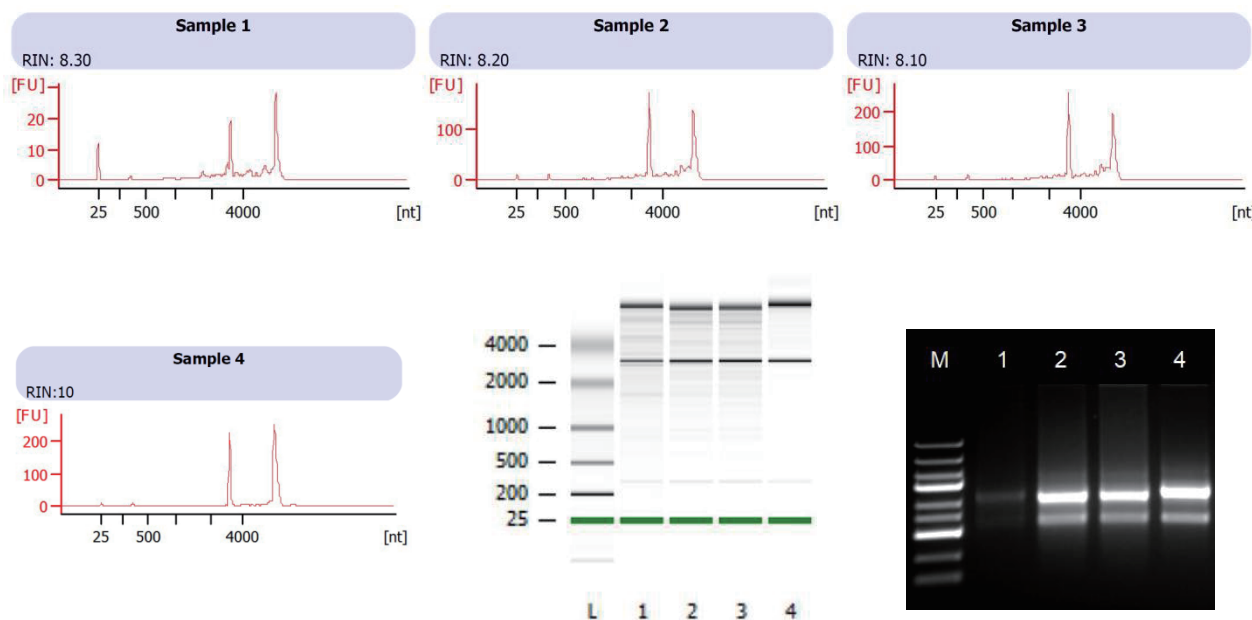
2. 琼脂糖凝胶电泳:

细胞样品的 RNA 各取 10 μ l, 肝、脾、脂肪组织的 RNA 各取 3 μ l, 心、肾、肺组织的 RNA 各取 10 μ l, 加 6 μ l DNA 上样缓冲液 6 $\times$ loading buffer 混匀; RNA 上样量为 2 ~ 10 μ l, 电泳电压 180 V, 电泳时间 15 min。M: DL5000 DNA marker; Lane 1、2、3: 本试剂盒提取的 200 万、20 万、5 万 A549 细胞 RNA; Lane 4 ~ 9: 本试剂盒提取的心、肝、肾、脾、肺、脂肪组织 RNA。最终得到琼脂糖凝胶电泳图如下图, 结果表明, 本试剂盒可从动物组织和细胞中快速提取得到高质量总 RNA, 提取的总 RNA 纯度高, 完整性好。



3. Agilent 2100 分析:

分别使用 EZB-RN9 提取 20 mg 的心脏组织, 10 mg 的肝脏、肾脏组织, 和 100 万的 A549 细胞后, 取部分 RNA 进行琼脂糖凝胶电泳, 及使用 Agilent 2100 生物分析仪进行 RNA 质量分析的结果如图所下示 (Sample/Lane 1、2、3、4 分别为: 心、肝、肾、细胞):



由上图可见, 本试剂盒提取得到的总 RNA 的 RNA 具有优异的完整性, 动物组织 RNA 的 RIN 值可达 7 ~ 8 以上, 细胞系 RNA 的 RIN 值可达 9 ~ 10, 能够较好地满足 NGS 建库测序的要求。