

EZFast Tissues/Cells RNA Purification Kit PLUS

说明书

Cat. No.: EZB-RN10

一、产品简介

EZFast Tissues/Cells RNA Purification 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 等多种下游实验。

二、产品组分

组分 \ 货号 (规格)	EZB-RN10-T (6 Preps)	EZB-RN10 (50 Preps)
Lysis Buffer	4 ml	28 ml
Wash Buffer 1	5 ml	40 ml
Wash Buffer 2 ^{*1}	1 ml	6 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，须加入瓶身标签所示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°C 保存，其余组分置于室温（15 ~ 25°C）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 Wash Buffer 2 前，须加入瓶身标签所示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）。
- 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	~ 10 mg	~ 10 mg	~ 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。否则可使用本公司的 EZB-RN4、EZB-RN6 或 EZB-RN001-plus 进行提取。

五、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. 12000 g 空柱离心 1 min。
10. 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。
11. 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。
12. 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。
13. 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。

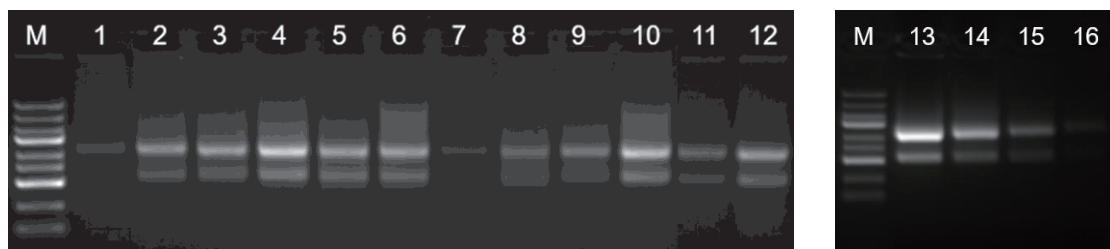
六、代表性实验结果

1. 使用本试剂盒分别提取不同种类的组织 and 不同细胞数的 293T 细胞的 RNA，提取的 RNA 的浓度、纯度如下表所示：

样品	核酸浓度 (ng/ μ l)	260/280	260/230	样品	核酸浓度 (ng/ μ l)	260/280	260/230
心 (5 mg)	24.9	2.15	1.83	肾 (2 mg)	65.6	2.12	1.91
心 (30 mg)	92.3	2.10	2.12	肾 (10 mg)	441.7	2.05	2.10
肝 (2 mg)	94.0	2.11	2.00	脑 (5 mg)	44.1	2.10	2.06
肝 (10 mg)	423.2	2.06	2.10	脑 (40 mg)	303.6	2.08	2.16
脾 (1 mg)	99.0	2.10	2.05	293T (3×10^6)	886.0	2.07	2.12
脾 (3 mg)	330.9	2.06	2.14	293T (5×10^5)	148.6	2.07	2.08
肺 (1 mg)	20.6	2.16	1.62	293T (2×10^5)	64.2	2.07	2.09
肺 (3 mg)	66.5	2.11	2.15	293T (5×10^4)	21.5	2.03	1.52

2. 琼脂糖凝胶电泳：

3×10^6 细胞的 RNA 取 2 μ l，心、肝、脾、肺、肾、脑组织的浓度高的组的 RNA 各取 3 μ l，其余样品的 RNA 各取 10 μ l，加 6 μ l DNA 上样缓冲液 6 $\times$ loading buffer 混匀；电泳电压 180 V，电泳时间 15 min。M: DL5000 DNA marker; Lane 1 ~ 12 分别为：5 mg 心、30 mg 心，2 mg 肝、10 mg 肝，1 mg 脾、3 mg 脾，1 mg 肺、3 mg 肺，2 mg 肾、10 mg 肾，5 mg 脑、40 mg 脑；Lane 13 ~ 16 分别为： 3×10^6 细胞、 5×10^5 细胞、 2×10^5 细胞、 5×10^4 细胞。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的总 RNA，提取的总 RNA 纯度高，同时具有较好的完整性。