

# EZ-press RNA & Protein Purification Kit PLUS

## 说明书

### Cat. No.: EZB-RP2

#### 一、产品简介

EZ-press RNA & Protein Purification Kit PLUS 可从同一动物组织或细胞培养样品中同时纯化总 RNA 和总蛋白质。与其他需要将生物样品分成两份再分别处理的流程不同，本试剂盒能够在 40 min 内从一份完整的样品中同时纯化得到高纯度的 RNA 和蛋白质，显著节省了样品的用量和样品准备所需的物料和时间。

本试剂盒取代了目前耗时、复杂的方法，无需乙醇沉淀、大量洗涤步骤或使用苯酚、氯仿等有毒物质。且本试剂盒包含 DNA Depletion Columns，能够快速、充分地去掉基因组 DNA，纯化得到的 RNA 纯度高，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。纯化的蛋白质适用于多种蛋白质应用，包括：SDS-PAGE、Western Blot 以及 LiquiChip® 分析等。

#### 二、产品组分

组分	货号 (规格)	EZB-RP2-T (6 Preps)	EZB-RP2 (50 Preps)
RP Lysis Buffer		3 ml	28 ml
Wash Buffer 1		5 ml	40 ml
Wash Buffer 2 <sup>*1</sup>		1 ml	6 ml
Elution Buffer <sup>*2</sup>		1 ml	10 ml
DNA Depletion Columns (with Collection Tubes)		6 Preps	50 Preps
RNA Columns (with Collection Tubes)		6 Preps	50 Preps
PP Buffer		6 ml	45 ml
PD Buffer <sup>*3</sup>		1 ml	10 ml

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（Wash Buffer 2 与无水乙醇的体积比为 1:4），充分混匀后才可使用；\*2. 本试剂盒中的 Elution Buffer 为 Nuclease-free ddH<sub>2</sub>O；\*3. 每次使用 PD Buffer 前，须加入终浓度为 50 mM 的 DTT 或 1% 终浓度的巯基乙醇，含 DTT 的 PD Buffer 须在 -15 ~ -25°C 冷冻保存，含巯基乙醇的 PD Buffer 可于室温稳定保存不超过 30 天，如需长期保存须冻存。

#### 三、保存条件

本产品所有组分建议于室温（15 ~ 25°C）运输，DNA Depletion Columns 收到后需置于 4°C 保存，其余组分均置于室温保存，有效期 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. Wash Buffer 2 首次使用前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）。
2. Elution Buffer 使用前建议分装为 3 ~ 4 份保存，以减少污染的概率。
3. RNA 提取及蛋白沉淀须在室温中进行，提取及沉淀过程中不可置于冰上，RNA 洗脱及蛋白重悬后可置于冰上。

4. 关于组织及细胞用量，可参考下表：

RP Lysis Buffer	细胞	心脏、肝脏、肾脏、脾脏、肺等
450 $\mu$ l	$2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$	2 ~ 10 mg

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。

## 五、自备材料

台式离心机、1 $\times$  PBS、无水乙醇、70%乙醇、DTT、Nuclease-free 离心管、Nuclease-free 枪头和涡旋振荡器（可选）等。

## 六、操作步骤

### 样品裂解

1a. 对于  $2 \times 10^5 \leq$  细胞数  $\leq 2 \times 10^6$  的贴壁细胞：

弃去培养基，用 1 $\times$  PBS 缓冲液清洗细胞。加入 450  $\mu$ l RP Lysis Buffer，置于水平摇床上，150 rpm 裂解 5 min，吹打 5 下，将裂解产物收集至离心管中。

1b. 对于悬浮细胞

将适当数量的细胞（ $2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$  细胞，对于 T、B 细胞等体积较小的免疫细胞，细胞数可增加到  $8 \times 10^6$ ）300 g 室温离心 5 min，小心去除上清。用 1 $\times$  PBS 重悬后 300 g 室温离心 5 min，小心地去除上清。加入 450  $\mu$ l RP Lysis Buffer，置于水平摇床上，150 rpm 裂解 5 min，吹打 5 下，置于室温备用。

1c. 对于动物组织

取 2 ~ 10 mg 动物组织放入 2 ml 的组织研磨管中（推荐使用 2 ml 的厚壁离心管，如 QSP 离心管等），加入 450  $\mu$ l RP Lysis Buffer，置于组织研磨仪中，50 ~ 70 Hz 的频率研磨 3 ~ 10 次（每次 30 sec），直至无肉眼可见的固体颗粒为止。室温摇床上 150 rpm 摇 5 min，12000 g 离心 2 min，将上清液转移到一个新的离心管中备用。

注：完成裂解步骤后，如果不继续进行 RNA 提取，可将裂解产物转移至 1.5 ml Nuclease-free 离心管中冻存在  $-80^\circ\text{C}$ 。下次取出来解冻后按照说明书完成剩下的步骤即可。

### RNA 提取

2. 将步骤 1 得到的液体转移至 DNA Depletion Columns 中，4000 g 离心 1 min。

3. 向上述离心穿过液中加入等体积（450  $\mu$ l）的 70%乙醇，充分吹打混匀（须吹打至看不见絮状物为止）。

4. 将上述混合液转移到 RNA Columns 中，8000 g 离心 30 sec，将流出液转移到新 2 ml 离心管中，做好标记，室温放置，用于蛋白质的纯化（如需加入蛋白酶抑制剂或磷酸酶抑制剂，可在此步的流出液中按比例加入）。

5. 将 RNA Columns 放回收集管，加入 700  $\mu$ l Wash Buffer 1，12000 g 室温离心 30 sec。倒掉收集管中的液体。

6. 将离心柱放回收集管，加入 500  $\mu$ l Wash Buffer 2 到离心柱中，12000 g 室温离心 30 sec。倒掉收集管中的液体。

7. 将离心柱放回收集管，12000 g 室温空柱离心 1 min，离心结束后弃去收集管。

8. 将离心柱放入一个新的 Nuclease-Free 离心管中，加入 30 ~ 50  $\mu$ l Elution Buffer（注意：Elution Buffer 须确保加到柱子中央的膜上），室温静置 2 min，12000 g 离心 1 min。弃去离心柱，离心管中的溶液为 RNA 样品，所得的 RNA 应迅速转移到冰上放置，充分混匀后可进行浓度测定并进行后续实验，或储存于  $-80^\circ\text{C}$  备用（因 RNA 不稳定，建议尽快进行逆转录或其它后续实验）。

## 总蛋白沉淀

9. 向步骤 4 含流出液的离心管中加入 800  $\mu$ l PP Buffer，充分混匀，室温孵育 10 min，溶液变浑浊。
10. 将样品放入离心机，13000 g 离心 4 min，小心地吸走上清。
11. 加入 500  $\mu$ l 70%乙醇，12000 g 离心 1 min，小心地吸净上清（无需孵育或重悬沉淀）。
12. 打开离心管盖子，室温下干燥蛋白 5~10 min，使残余乙醇蒸发。

注意：残留乙醇会导致蛋白上样凝胶时溢出或凝胶染色后蛋白条带不规则。

13. 根据初始样品量加入 20~120  $\mu$ l PD Buffer（PD Buffer 需提前加入终浓度为 50mM 的 DTT，或 1%的巯基乙醇。当初始的细胞数介于  $2 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$  时，需加入 20  $\mu$ l PD Buffer；当初始的细胞数  $> 5 \times 10^5$  时，可根据细胞数的多少加入 50~100  $\mu$ l 的 PD Buffer），吹打 20~30 次使沉淀重悬并充分混匀（如沉淀较多可适当增加 PD Buffer 的用量，最多不可超过 200  $\mu$ l，可涡旋振荡 3~5 min 至沉淀完全重悬），95°C 孵育 5 min 使蛋白变性，再将样品冷却至室温。

注：PD Buffer 为适用于 SDS-PAGE 检测的样本上样缓冲液，也可使用常用的蛋白上样缓冲液替代；若不进行 SDS-PAGE 检测，可使用与下游应用兼容的缓冲液溶解沉淀，如 ELISA 包被液、IP 裂解液、蛋白稀释液等；若目标蛋白不适合 95°C 加热（如膜蛋白、强疏水性蛋白等），可进行室温孵育 15 min 替代。

14. 将样品放入离心机，12000 g 离心 1 min，样品可直接上样进行 PAGE 凝胶检测（如 WB 等，单个孔的上样量一般为 10  $\mu$ l），也可使用 BCA 法或去垢剂兼容型 Bradford 法蛋白浓度测定试剂盒进行定量（如本公司的产品 EZ1301）。

注：PD Buffer 中同时含有还原剂及去垢剂，不适用 BCA 法及非去垢剂兼容型 Bradford 法蛋白浓度测定；若使用其他缓冲液重悬蛋白，需考虑缓冲液成分选择合适的蛋白浓度测定方法（BCA 法不适用于含 DTT、巯基乙醇等还原剂的缓冲液；Bradford 法不适用于含 SDS、Triton -X100、尿素等去垢剂的缓冲液）。

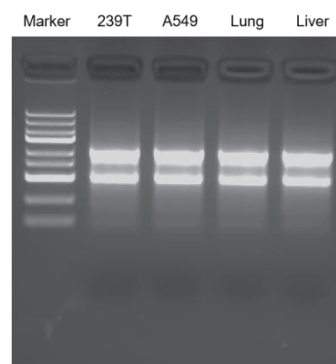
## 七、常见问题与解决方法

常见问题	解决方法
RNA 产量过低	a. 尽量使用新鲜样品。
	b. 组织样品需彻底匀浆，建议使用匀浆机。
	c. 检查 Wash Buffer 2 是否加入乙醇。
	d. 使用适量的样品，若样品过量则需按比例增加 RP Lysis Buffer 用量。
	e. RNA 洗脱时一定要将 Elution Buffer 加到柱中央的膜上（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。另外，可以提前将 Elution Buffer 预热到 60°C 或者进行二次洗脱。
RNA 降解	a. 确保操作过程中没有中断。将样品充分裂解后，建议尽快完成后续步骤。
	b. 确保操作过程使用的试剂、耗材以及仪器无核酸酶。
RNA 纯度差	a. 严格执行步骤 6，如果还无改善，可用 Wash Buffer 2 多洗一次。
蛋白产量过低	a. 尽量使用新鲜样品。
	b. 使用适量的样品，若样品过量则需按比例增加 RP Lysis Buffer 及 PP Buffer 用量。
	c. 有一些蛋白沉淀难以重新溶解，可以增加 PD Buffer 用量或使用其他含高浓度去垢剂的蛋白缓冲液。

## 八、代表性实验结果

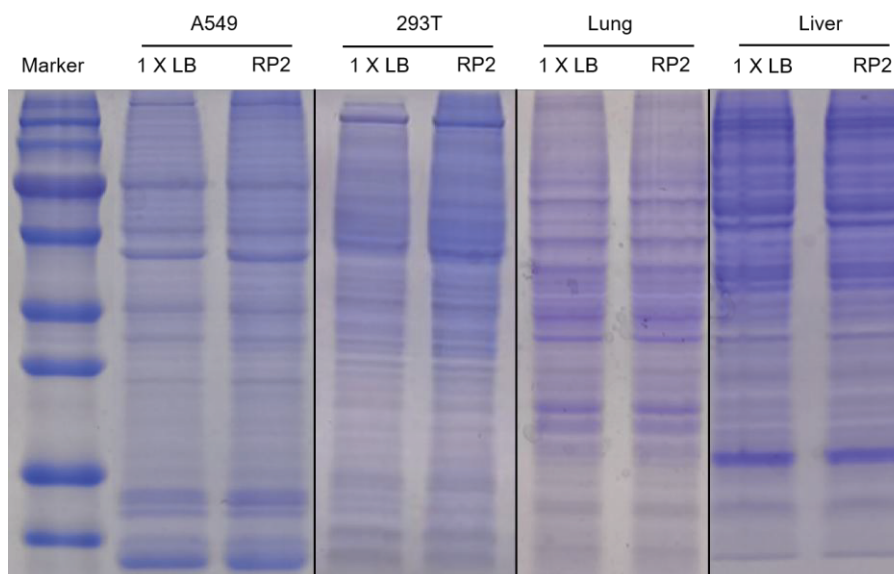
1. 使用本试剂盒提取不同细胞系及组织 RNA，结果如下：

Sample	Concentration (ng/ $\mu$ l)	260/280	260/230
293T	233.3	2.05	2.14
A549	316.5	2.04	2.12
Lung	344.6	2.02	2.10
Liver	292.6	2.01	2.10



由上述结果可见，本试剂盒能够从细胞和组织样品中提取得到高纯度的 RNA。

2. 使用本试剂盒提取不同细胞系及组织总蛋白，结果如下（注：下图中同种样品的对照组和实验组为同时提取和进行 SDS-PAGE 的实验结果，不同的样品的结果并非同一次实验的结果，为了便于展示，特此拼合在同一张图中）：



由上图 SDS-PAGE 结果可见，本试剂盒提取得到的细胞和组织蛋白质的蛋白电泳图谱与 1× Loading Buffer 直接煮样得到的蛋白电泳图谱高度一致。

上述 RNA 和蛋白电泳的结果表明，使用本试剂盒可从同一个动物组织或细胞培养样品中同时纯化得到高纯度的总 RNA 和总蛋白质，并用于后续实验。