

Universal RNA Purification Kit II

说明书

Cat. No.: EZB-RN6

一、产品简介

本产品基于苯酚/胍的样品裂解和二氧化硅膜纯化，可从动物组织和细胞中纯化高质量的总 RNA。与 EZB-RN001-plus 相比，本产品提供了氯仿替代物，因此无需自备氯仿。纯化的总 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。

二、产品组分

组分	货号 (规格)	EZB-RN6 (100 Preps)
Lysis Buffer-II		55 ml
Buffer A		22 ml
Wash Buffer 1 ^{*1}		13 ml
Wash Buffer 2 ^{*1}		13 ml
Elution Buffer		10 ml
Spin Columns for RNA (with Collection Tubes)		100 Preps

注：*1. Wash Buffer 1 和 Wash Buffer 2 首次使用前须加入 52 ml 的无水乙醇并充分混匀，并在加入无水乙醇后在瓶身做好标记。

三、保存条件

Lysis Buffer-II 和 Buffer A 需 4°C 避光保存，其余的组分室温保存（注：Buffer A 在 4°C 保存时会出现结晶或冻结现象，仅需在使用前置于室温融化后使用即可，不影响使用）。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

- 首次使用 Wash Buffer 1 和 Wash Buffer 2 前，每瓶须加入瓶身标签所示体积的无水乙醇（Wash Buffer 1 和 Wash Buffer 2 与无水乙醇的体积比为 1:4），充分混匀后才可使用，并在加入无水乙醇后在瓶身做好标记。
- 本试剂盒中离心的过程都是在 4°C 的离心机中进行，其余的操作步骤都是在室温中进行，实验前需提前预冷离心机。
- 样品充分裂解后，如果不打算继续进行 RNA 提取，可将裂解产物转移到 EP 管中冻存在 -80°C，下次解冻后恢复到室温使用，加 Buffer A 混匀，继续向后进行即可。
- RNA 洗脱时一定要将洗脱液加到柱中央的膜上（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。
- Elution Buffer 使用前建议分装为 3 ~ 4 份保存（留一管在室温备用，其余的可冻存于 -20°C），以防污染。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。
- 本试剂盒可用于组织和细胞样品的总 RNA 及 lncRNA 的提取。

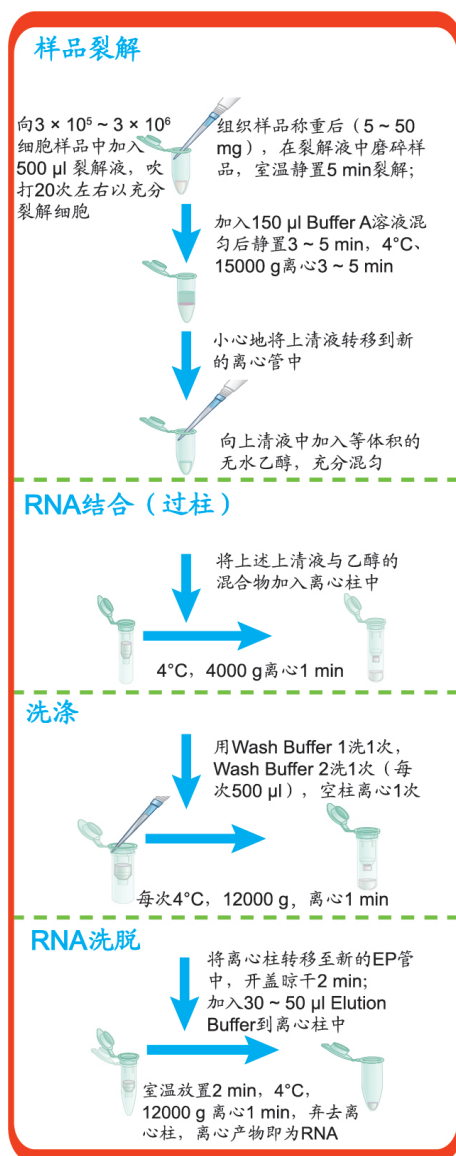
- 建议用 6 孔板或 35 mm 培养皿培养细胞，培养至细胞密度达到 80% 以上时进行 RNA 提取，不建议用 100 mm 培养皿培养的细胞直接裂解提取 RNA，否则可能导致细胞裂解不充分或离心柱堵塞或导致基因组残留。
- 如果提取高脂肪含量组织（例如肝脏、脂肪组织）的 RNA，则建议使用货号为“EZB-RN001A”的 RNA 提取试剂盒，以获得更好的纯度。
- 关于组织用量，可参考如下表格：

组织种类	肿瘤、胚胎、心、肾、脾、胰脏、肺、眼	肌肉、皮肤、血管
参考用量 (mg)	5 ~ 50	20 ~ 50

五、自备材料

无水乙醇、1.5 ml 的 Nuclease-free 离心管、移液器及枪头等。

六、实验流程



七、操作步骤

样本裂解

1A. 对于组织样本

- a1. 取一定重量的组织样品放入 1.5 ml EP 管中【初次使用本试剂盒时，建议使用精密天平称量 1~2 个样品，称取 5~50 mg，其余样品根据称量过的样品体积，切取相近体积的组织样品即可】，加入 500 μ l 的 Lysis Buffer-II（裂解液），用电动研磨器或研磨棒对组织样品进行充分匀浆。
- a2. 组织研磨均匀后室温静置 5 min，以充分裂解组织。

1B. 对于细胞样本

- b1. 对于悬浮细胞样品：取出 $3 \times 10^5 \sim 3 \times 10^6$ 细胞转移至 1.5 ml EP 管中，500 g 离心 3~5 min，弃净上清，然后加入 500 μ l 裂解液，吹打 15 次左右以充分裂解细胞。
- b2. 对于细胞数 $\leq 3 \times 10^6$ 的贴壁细胞样品：弃去培养基，贴壁轻轻加入 1 \times PBS 清洗细胞，然后把 PBS 吸弃干净，直接向培养皿中加入 500 μ l 裂解液，吹打 20 次左右以充分裂解细胞，然后把裂解产物转移至 1.5 ml EP 管。

2. 加入 150 μ l Buffer A，用手快速剧烈振荡混匀 15 sec（不建议涡旋混匀），室温静置 3~5 min。

3. 15000 g（约 13000 rpm），4 $^{\circ}$ C 离心 3~5 min，将上清液小心地转移至新的 1.5 ml EP 管中（注意：吸取上层液体时不要吸到中间层和下层液体，建议吸取 200 μ l，否则可能会造成杂质残留、RNA 纯度下降）。

RNA 结合（过柱）

4. 对于提取 mRNA 和 lncRNA，向吸出的上清中加入等体积的无水乙醇充分混匀。如果加入乙醇后出现沉淀，建议用移液器吹打至沉淀不可见为止，然后将样品转移至 RNA 离心吸附柱（Spin Column）中，4000 g（约 6500 rpm），4 $^{\circ}$ C 离心 1 min，弃去液体。倒掉流出液后，可以将收集管口朝下，用吸水纸将收集管口残留的液体吸干净。

洗涤

5. 加入 500 μ l Wash Buffer 1（已加无水乙醇且充分混匀的）到离心柱中，12000 g，4 $^{\circ}$ C 离心 1 min；小心取出离心柱，倒掉流出液，用吸水纸将收集管口残留的液体吸干净。（注意：将离心柱从收集管中取出时，应小心操作，防止离心柱底部接触到液体）。

6. 加入 500 μ l Wash Buffer 2（已加无水乙醇且充分混匀的），12000 g，4 $^{\circ}$ C 离心 1 min（洗柱）。倒掉废液，用吸水纸将收集管口残留的液体吸干净。

7. 将离心柱放回收集管，12000 g，4 $^{\circ}$ C 离心 1 min 以充分去除残留的废液。

8. 弃去收集管，将离心柱转移至无 RNase 的 1.5 ml EP 管中，开盖晾干 2 min。

RNA 洗脱

9. 向离心柱中央的膜上加入 30~50 μ l Elution Buffer（注：若想提高 RNA 产量，可取适量的 Elution Buffer 提前预热到 60 $^{\circ}$ C 再洗脱），室温放置 2 min。

10. 12000 g，4 $^{\circ}$ C 离心 1 min（可选操作：在初次洗脱离心后，可以将液体加回离心柱，再放置 5 min，使 RNA 充分溶解后再次离心，能增加 RNA 产量）。弃去离心柱，所得的 RNA 应迅速转移至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 $^{\circ}$ C 备用（因 RNA 不稳定，建议尽快进行逆转录或进行其他后续实验）。

八、常见问题与解决方法

常见问题	可能原因	解决方法
提取的 RNA 浓度很低	样本收集或者保存方式不当	样本收集时动作要快且立马放进液氮或者-80°C 冰箱保存，期间不能反复冻融，采用新鲜或-80°C 未冻融的样本。
	样本投入量过多	减少投入量，按照说明书推荐量准备好相应的样本，样本量过多会导致裂解不充分，无法释放样本中的 RNA 或者堵住离心柱，从而 RNA 产量大大降低。
	样本投入量过少	增加投入量，细胞控制在 $\leq 3 \times 10^6$ 个细胞，对于体积很小的免疫细胞如 T、B 细胞等，建议取 $2 \times 10^6 \sim 8 \times 10^6$ 个细胞。
	裂解不充分	增加裂解时间，吹打次数不够或置于摇床振荡时间不够，导致样本中的 RNA 没有完全释放。
	Wash Buffer 1 和 Wash Buffer 2 忘记加无水乙醇	首次使用 Wash Buffer 1 和 Wash Buffer 2 前，应加入瓶身所示体积无水乙醇并充分混匀，做好标记。
	洗脱液加在离心柱侧壁或触碰到吸附膜	洗脱时应将洗脱液滴加在离心柱膜中央且避免触碰到吸附膜，使洗脱液完全浸润吸附膜，必要时，可以提前将洗脱液预热到 60°C 左右。
提取的 RNA 纯度异常	蛋白残留	A260/280 值偏低时，表明蛋白残留严重，考虑一开始样本量是否过多，可以降低样本量或者增加裂解液的量。
	盐离子残留	A260/230 值偏低时，表明盐离子残留严重，确保 Wash Buffer 洗涤之后做了空柱离心和开盖挥发两分钟等步骤。
	RNA 降解	A260/280 和 A260/230 两值建议区间是 1.9 ~ 2.2，两值偏高，可能存在 RNA 降解，可以考虑样本本身降解还是提取后的 RNA 保存不当导致降解。