

# EZ-press Whole Blood RNA Purification Kit 说明书

Cat.No.:B0006

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

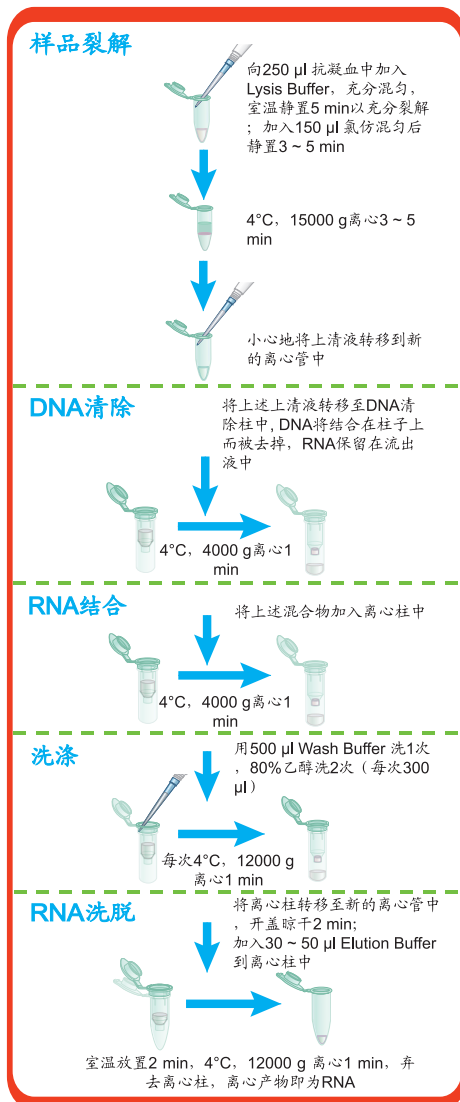
组分	B0006 (100 Preps)
RCL Buffer	60 ml
Lysis Buffer	55 ml
Wash Buffer <sup>1</sup>	13 ml
Elution Buffer	10 ml
DNA Removing Spin Columns (with Collection Tubes)	100 Preps
Spin Columns for RNA (with Collection Tubes)	100 Preps

注：<sup>1</sup> 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RCL Buffer、Lysis Buffer和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18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. 收集血液样品时，建议用柠檬酸（钠）或EDTA作抗凝剂，不建议用肝素钠作抗凝剂，否则会对实验结果造成明显的影响。
2. 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）。
3. 实验开始前需用灭菌水配制90 ml的80%乙醇，用于洗涤步骤。

## 样品裂解

1. 取250  $\mu$ l的抗凝血（不足250  $\mu$ l的加RCL Buffer补足至250  $\mu$ l，充分混匀），加入500  $\mu$ l裂解液（Lysis Buffer），用涡旋振荡器高速震荡10 sec，使其充分混匀。
2. 充分混匀后室温静置5 min，以充分裂解。
3. 加入150  $\mu$ l 氯仿，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。
4. 15000 g（约13000 rpm），4°C离心3~5 min，将上清液转移至新的1.5 ml离心管中（注意：吸取上层液体时不要吸到中间层和下层液体，以免造成杂质残留）。

## DNA清除（过DNA柱）

5. 将上述上清液转移至DNA清除柱（DNA Removing Spin Column）中，4000 g，4°C离心1 min（注：DNA结合在吸附柱上而被去除，RNA则在流出液中）；弃去吸附柱，保留收集管中的流出液。

## RNA结合（过RNA柱）

6. 向上述DNA收集管里的流出液中加入等体积的无水乙醇，充分混匀。然后将混合液转移至RNA离心吸附柱（Spin Column for RNA）中，4000 g，4°C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

7. 加入500  $\mu$ l Wash Buffer到离心吸附柱中，12000 g，4°C离心1 min，弃去收集管中的液体（将收集管在吸水纸上倒扣几下以吸去管口残留的液体），将离心柱套回收集管中。
8. 加入300  $\mu$ l的80%乙醇至离心吸附柱中，12000 g，4°C离心1 min，弃去液体。用300  $\mu$ l的80%乙醇重复洗涤一次（注意：将样品从离心机中取出，以及将离心柱从收集管中取出时，应防止离心柱底部接触到液体从而导致RNA污染）。
9. 将离心柱套回收集管中，12000 g，4°C离心1 min以充分去除残留的废液。

10. 弃去收集管，将离心柱转移至无酶的1.5 ml离心管中，开盖晾干2 min。

## RNA洗脱

11. 向离心柱中央的膜上加入30~50  $\mu$ l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）。
12. 12000 g，4°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，再室温放置5 min，使RNA充分溶解后再离心，能增加RNA产量）。弃去离心柱，所得的RNA即可进行后续实验，或储存于-80°C备用。

## EZ-press Whole Blood RNA Purification Kit Trouble Shooting

1. RNA产量过低，或用已经验证过的引物检测基因表达，检测到的内参基因Ct值偏大，或无法做出正常的扩增结果。

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2份（可用15、50 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：

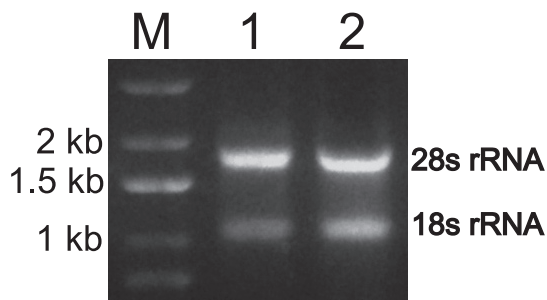
1. Wash Buffer使用前需加入标签所示体积的无水乙醇混匀才可使用。

2. 裂解产物加氯仿混匀静置离心后，取上清液先过DNA柱，DNA结合在柱子的膜上而被去掉，RNA则保留在流出液中，其在上RNA离心吸附柱前需要加入等体积的无水乙醇，充分混匀后加入离心柱中离心。

3. 洗涤时需用12000 g高速离心充分去除Wash Buffer和80%乙醇，然后开盖晾干2 min（此步骤可防止Wash Buffer和80%乙醇残留在柱上）。

4. 洗脱液的体积可以根据需要在一定范围内调整（一般30 ~ 50  $\mu$ l，不可少于20  $\mu$ l，否则无法充分溶解RNA），以浓度满足后续实验需求为宜。重复洗脱一次及延长放置时间至5 min均可提高RNA产量。

### 代表性实验结果



上图：使用本产品分别从100  $\mu$ l 和200  $\mu$ l 猪的血液样品（分别为泳道1、2）中提取的RNA溶解于50  $\mu$ l Elution Buffer中，取5  $\mu$ l上样，跑琼脂糖凝胶电泳后的结果。

由图可见，本产品提取的RNA具有很好的完整性。