

EZ-press RNA Purification Kit使用指南(Cat.No.:B0004D)

使用本试剂盒前，请务必仔细阅读本使用指南，以保证操作正确

实验流程

1. Sample Homogenization

样品裂解



2. RNA Binding

RNA与离心柱结合



3. Column Washing

洗涤



4. RNA Elution

洗脱



注意：

1. Wash Buffer使用前须加入瓶身标签所示体积的无水乙醇混匀后才可使用。
2. 建议使用前把Elution Buffer分装为3~4份，以减小污染的概率。
3. RNA提取须在室温进行，提取过程中不可置于冰上。
4. 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。
5. 裂解充分以后，如果不打算继续进行RNA提取，可将裂解产物转移到EP管中直接冻存在-80°C。下次使用时解冻恢复到室温，加无水乙醇混匀后进行后续的操作即可。
6. 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。

样品裂解

1A. 对于细胞数 $\leq 3 \times 10^6$ 的贴壁细胞样品：

- a) 弃去培养基，用PBS清洗细胞（沿侧壁加入PBS轻轻晃动后，再沿侧壁吸去PBS；如果样品数较多，应分批操作，防止因细胞被晾干导致RNA严重降解）；
 - b) 加入500 μ l Lysis Buffer（裂解液），置于摇床上室温快速摇1~2分钟（转速120 rpm~150 rpm），或用移液器吹打30下左右（将移液器量程调至450 μ l；吹时，液体不要完全吹出，枪头内可以留一点；吸时，液体也不要完全吸完，防止吸入气泡），使细胞充分裂解。
- 注：如果不继续进行RNA提取，可将裂解产物转移至1.5 ml EP管中直接冻存在-80°C。

1B. 对于悬浮细胞或者细胞数 $\geq 3 \times 10^6$ 的贴壁细胞样品：

- a) (悬浮细胞直接从步骤b开始)用胰酶消化细胞，然后加培养基终止消化；
- b) 取出约 $1 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ 细胞转移至1.5 ml EP管中（对于体积很小的免疫细胞如T、B细胞等，建议取 $2 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ ），500 g离心3~5分钟，用移液器吸弃上清；
- c) 用PBS清洗细胞，然后500 g离心3~5分钟，用移液器吸弃PBS；
- d) 加入500 μ l裂解液，将移液器量程调至450 μ l后吹打10~15次（或者使用涡旋振荡器高速震荡10秒钟亦可），以使细胞充分裂解。

RNA结合（过柱）

2. 向上述细胞裂解产物中加入等体积的无水乙醇，充分混匀（若提取circRNA，需要加入1.6倍体积的无水乙醇）。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，然后将混合液加入离心柱（Spin Column）中，4000 g（大约相当于实验室常用的Eppendorf、Thermo或Beckman离心机的7000 rpm）离心1分钟（若离心后柱中有液体残留，可用12000 g再次离心1分钟），弃去液体；

3. DNase处理：按照每个样品2 μ l DNase（gDNA Remover），加10 μ l 灭菌的ddH₂O（或用Elution Buffer）的比例，根据样品数，取相应体积的DNase和ddH₂O，用移液器吹打混匀；然后取12 μ l 加到每个柱中央的膜上，室温放置5分钟，以去除可能残留的少量基因组（DNA酶处理后不要离心，直接加入洗涤液进行下一步洗涤操作）。

备注：若想加快RNA提取速度，可以不用DNase处理，在过柱后直接洗涤。但是为了充分去除基因组DNA，建议最好使用EZBioscience品牌的带DNase的逆转录试剂盒进行逆转录实验。

洗涤

4. 加入500 μ l Wash Buffer（已加入无水乙醇的洗涤液）到离心柱中，12000 g离心1分钟。**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（**建议操作：**倒掉液体后，可将收集管倒扣在吸水纸上轻轻叩击两下，然后将离心柱放回收集管，12000 g空柱离心1分钟）；

5. 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分钟。

RNA洗脱

6. 向离心柱中央的膜上加入20~30 μ l Elution Buffer（洗脱液），室温放置2分钟（注：若想提高RNA产量，可取适量的Elution Buffer提前预热到95°C再进行洗脱）；

7. 12000 g离心1分钟（**可选操作：**在初次洗脱离心后，可将液体加回离心柱，再放置3分钟，使RNA充分溶解后再次离心，能增加RNA产量；若使用了预热的Elution Buffer，则无需进行此可选操作）。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，然后进行后续实验，或储存于-80°C备用（因RNA不稳定，建议尽快进行逆转录或其他后续实验）。

EZ-press 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：

- 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。建议试剂盒开封后，每种buffer分装为3~4份（可用15毫升离心管分装），每次使用时应严格按照规范操作，防止交叉污染。
- 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。
- 检查操作流程是否正确。例如：
 - 整个RNA提取的操作过程必须在室温进行，不可置于冰上（直至洗脱离心后得到RNA方可置于冰上），以避免其间产生不溶物堵塞离心柱。
 - Wash Buffer使用前需加入52毫升无水乙醇混匀后才可使用；
 - 如果提取组织样品，此组织样品须为容易研磨的组织比如肿瘤组织，且组织样品裂解前须称重，使组织量不超过10 mg；研磨成匀浆后室温静置5分钟使之进一步裂解，然后12000 g离心1分钟取上清。
 - 细胞裂解产物或组织裂解产物离心后的上清，上柱前需要加入

无水乙醇，充分混匀后，才可加入离心柱中离心。

5. 洗脱时需12000 g高速离心充分去除Wash Buffer，然后开盖晾干2分钟（此步骤应防止Wash Buffer残留在柱上）。

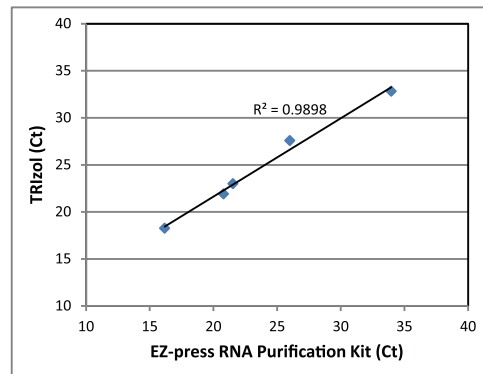
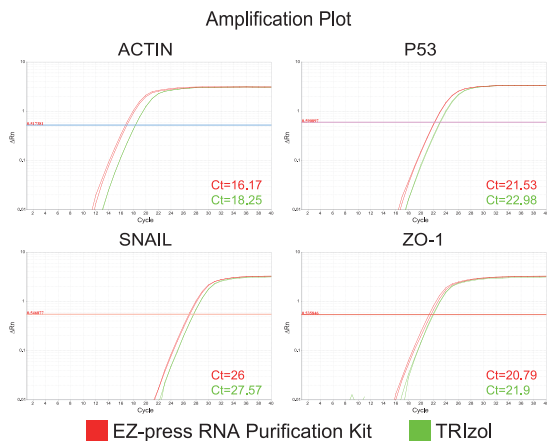
6. 洗脱液的体积可以根据需要在一定范围内调整（一般20~30 μ l，最少不可少于20 μ l，否则无法充分溶解RNA），以浓度满足后续实验需求为宜。洗脱时将洗脱液提前预热到95°C或者重复洗脱一次及延长放置时间至3分钟均可提高RNA产量。

7. 关于RNA浓度与纯度：本试剂盒提取的RNA，使用NanoDrop等微量分光光度计测定OD260/280和OD260/230在1.9~2.3之间均属正常（因不同仪器之间存在误差，若OD比值略有超出，但上下不超过0.1，且吸光度曲线正常，也可接受）。经检测，对于少量细胞或组织样品，使用本试剂盒提取的RNA，如果OD260/280和OD260/230这两个比值在正常范围，即使RNA浓度低，也能做出优异的qPCR结果。使用EZBioscience品牌的逆转录试剂盒（货号为EZB-RT2GQ）与qPCR试剂（货号为A0001），仅需逆转录100 ng总RNA，即可获得优异的检测结果。

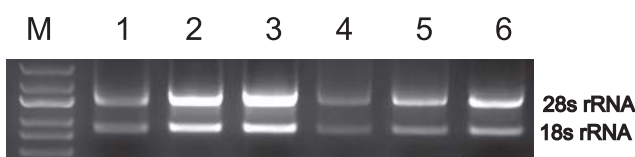
8. 关于RNA产量：经测试，本试剂盒最多大约可提取30 μ g左右的总RNA。

9. 对于细胞数较少的样品（如少于 5×10^4 ），建议使用EZBioscience品牌的EZ-press Cell to cDNA Kit PLUS(货号为B0003)；对于细胞数极少的样品（1~1000），建议使用EZBioscience品牌的EZ-press Single Cell to cDNA Kit(货号为B0011)，以便能做出最佳的实验结果。

产品实测



上图：EZ-press RNA Purification Kit与TRIzol (Invitrogen)方法的对比测试。实验内容：检测A549细胞中4个不同基因的mRNA表达水平。实验结果表明：使用EZ-press RNA Purification Kit得到了优异的结果，比TRIzol法得到的结果更好，两组结果的相关系数可达 $R^2=0.9898$ 。结论：EZ-press RNA Purification Kit能够很好地替代TRIzol方法进行细胞RNA的提取及逆转录，得到的结果优于TRIzol方法。



左图：M: 250bp DNA Ladder.

A549细胞，Lanes 1~3为EZ-press RNA Purification Kit提取的RNA；Lanes 4~6为TRIzol (Invitrogen)方法提取的RNA。

Lanes 1、4: 20万细胞；

Lanes 2、5: 40万细胞；

Lanes 3、6: 60万细胞。

由图可见：EZ-press RNA Purification Kit提取RNA的得率明显高于TRIzol方法。