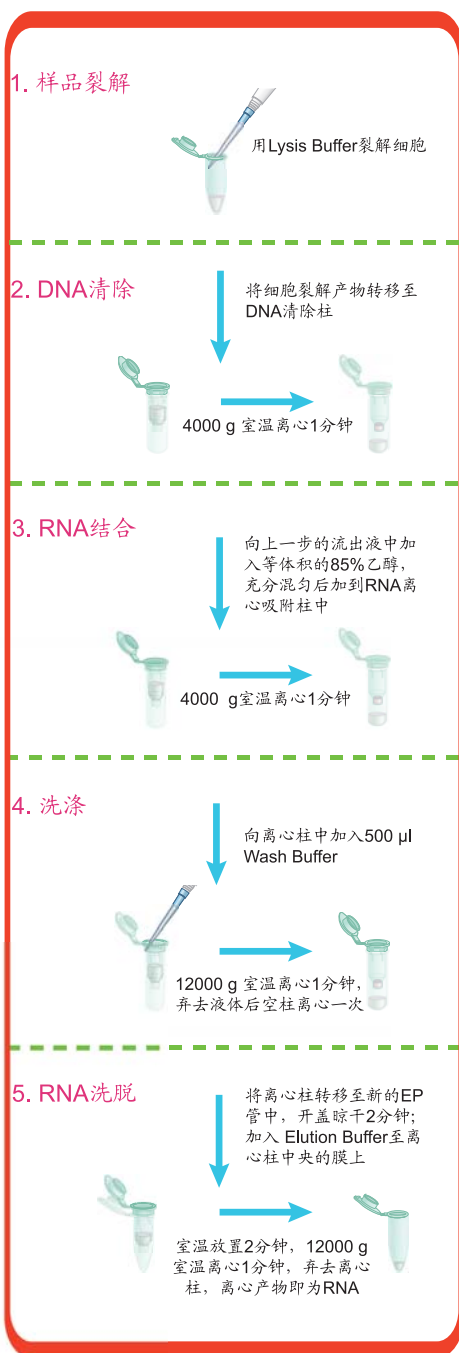


使用本试剂盒前，请务必仔细阅读本使用指南，以保证操作正确

### 实验流程



#### 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. 85%乙醇的配制方法: 按照无水乙醇:灭过菌的ddH<sub>2</sub>O = 85:15的体积比例进行配制;
3. 建议使用前把Elution Buffer分装为3~4份, 以减小污染的概率;
4. RNA提取须在室温进行, 提取过程中不可置于冰上;
5. 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;
6. 细胞充分裂解以后, 如果不想立即进行RNA提取, 可将裂解产物转移至EP管中, 冻存于-80°C冰箱中; 提取RNA时, 需要解冻并恢复到室温才可进行后续的实验步骤;
7. 洗脱RNA时, 应将洗脱液加到离心柱中央的膜上(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 µl 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 µl; 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 µl裂解液, 将移液器量程调至450 µl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。

#### DNA清除(过DNA清除柱)

2. 将上述细胞裂解产物转移至DNA清除柱(DNA Removing Column)中, 4000 g离心1分钟(注: DNA将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离心吸附柱)

3. 向上述DNA收集管里的流出液中加入等体积的85%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

4. 加入500 µl 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。可选操作: 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, 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 µl 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 PLUS Trouble Shooting

### 1、RNA产量过低

#### 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。

**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.**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;

**2.**Wash Buffer使用前需加入52毫升无水乙醇混匀后才可使用;

**3.**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。

**4.**细胞裂解产物或组织裂解产物离心后的上清先过DNA清除柱,

DNA结合在柱子的膜上而被去掉, RNA则保留在流出液中; 在结合RNA离心吸附柱前需要向流出液中加入等体积的85%乙醇, 充分混匀后加入离心柱中离心;

**5.**洗涤时需用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);

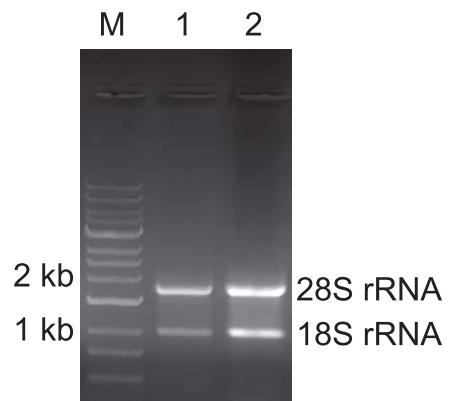
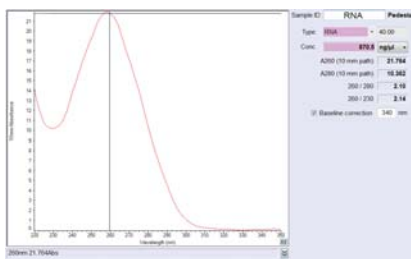
**6.**洗脱液的体积可以根据需要在一定范围内调整(一般20~30  $\mu$ l, 最少不可少于20  $\mu$ l, 否则无法充分溶解RNA), 以浓度满足后续实验需求为宜。洗脱时将洗脱液提前预热到95°C或者重复洗脱一次及延长放置时间至3分钟均可提高RNA的产量。

**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-RT2/A0010C)与qPCR试剂(货号为A0001/A0012), 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  $\mu$ g左右的总RNA。

## 产品实测

本试剂盒用于提取 A549细胞中总RNA 的测试结果请见下图:



左图: 用EZ-press RNA Purification Kit PLUS从A549细胞中提取的RNA用Nanodrop检测的结果(30  $\mu$ l Elution Buffer洗脱)。由左图可见, 用EZ-press RNA Purification Kit PLUS提取的RNA具有很好的纯度和较高的浓度。

右图: 从A549细胞中提取RNA用琼脂糖凝胶电泳检测的结果(30  $\mu$ l Elution Buffer洗脱/溶解RNA, 取5  $\mu$ l上样)。M: 250bp DNA Ladder, Lanes 1为TRIzol (Invitrogen)方法提取的RNA; Lanes 2为EZ-press RNA Purification Kit PLUS提取的RNA。由右图可见: EZ-press RNA Purification Kit PLUS提取RNA的得率明显高于TRIzol方法。