

## Tissue RNA Purification Kit PLUS 说明书

Cat.No.:EZB-RN001-plus

使用本试剂盒前，请务必仔细阅读本说明书，以保证操作正确

### 产品组分

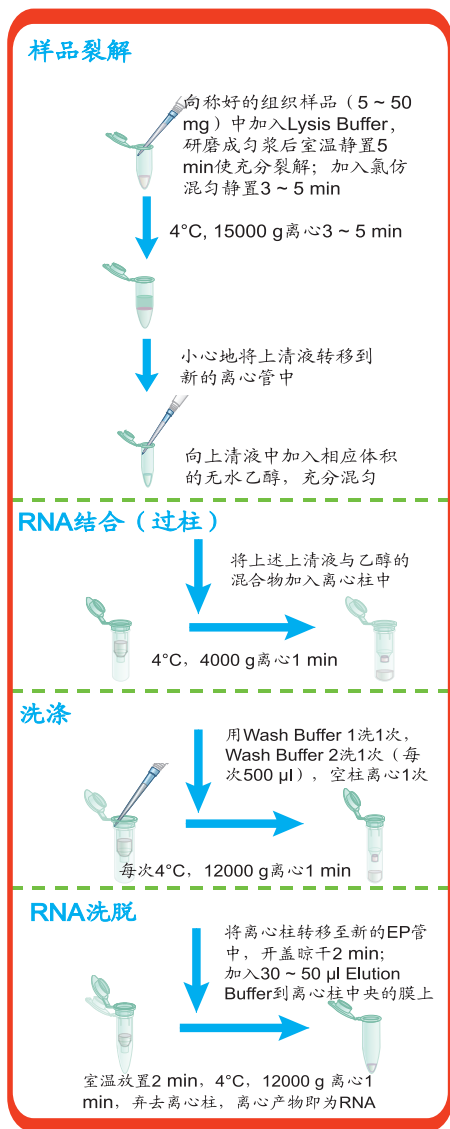
组分	EZB-RN001-plus (100 Preps)
Lysis Buffer	55 ml
Wash Buffer 1 <sup>1</sup>	13 ml
Wash Buffer 2 <sup>1</sup>	13 ml
Elution Buffer	10 ml
Spin Columns for RNA (with Collection Tubes)	100 Preps

注：<sup>1</sup> Wash Buffer 1和Wash Buffer 2首次使用前，请加入52 ml的无水乙醇并充分混匀。

### 保存条件

Lysis Buffer置于4°C避光保存，其余组分室温保存，有效期18个月。

### 实验流程



### 注意

1. Wash Buffer 1和Wash Buffer 2首次使用前，请加入52 ml的无水乙醇并充分混匀（Wash Buffer 1和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，以减小污染的概率。
3. 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，所以实验前需提前预冷离心机。
4. 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，加氯仿混匀，继续进行后续的步骤即可。
5. 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。
6. 如果提取高脂肪含量组织（例如肝脏、脂肪组织、脑组织）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。
7. 本产品适用于从动物组织或细胞中提取纯化高质量的总RNA。
8. 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

### 样品裂解

1. 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 μl Lysis Buffer（裂解液），用研磨棒或电动研磨器对组织样品进行充分匀浆。对于RNA丰度高的组织，应该减少组织用量到10 mg，以防止产物中混入大量的5S rRNA。

【如果用于提取细胞样品，可以取30~500万细胞，直接在培养皿或离心管中加入500 μl裂解液，吹打20下左右以充分裂解细胞，然后进行第3步操作】。

2. 研磨均匀后室温静置5 min，以充分裂解组织。
3. 加入100 μl~150 μl（建议150 μl）氯仿，用手快速剧烈振荡混匀15 sec（不建议涡旋混匀），室温放置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 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200~220 μl**，否则可能会造成杂质残留、RNA纯度下降）。

### RNA结合（过柱）

5. 对于提取mRNA和lncRNA，向吸出的上清液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°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

6. 加入500 μl Wash Buffer 1到离心柱中，12000 g，4°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）。
7. 加入500 μl Wash Buffer 2到离心柱中，12000 g，4°C离心1 min（洗柱）。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。
8. 将离心柱放回收集管，12000 g，4°C离心1 min以充分去除残留的废液。
9. 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

10. 向离心柱中央的膜上加入30~50 μl Elution Buffer（洗脱液），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）。
11. 12000 g，4°C离心1 min（可选操作：在初次洗脱离心后，可将液体加回离心柱中央的膜上，放置5 min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°C备用（因RNA不稳定，建议尽快进行逆转录或其他后续实验）。

## Tissue RNA Purification Kit PLUS 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。建议试剂盒开封后，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 1和Wash Buffer 2首次使用前，请加入52 ml的无水乙醇并充分混匀（Wash Buffer 1和Wash Buffer 2与无水乙醇的体积比为1:4）。

2. 组织样品裂解前须称重，研磨均匀后需室温静置5 min以充分裂解组织。裂解的组织加入氯仿并静置后高速离心取上清。对于RNA含量丰富的组织，建议用量不多于10 mg，以免纯化的RNA中混有大量不需要的5S rRNA。

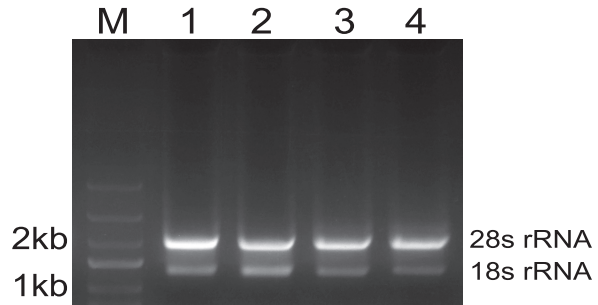
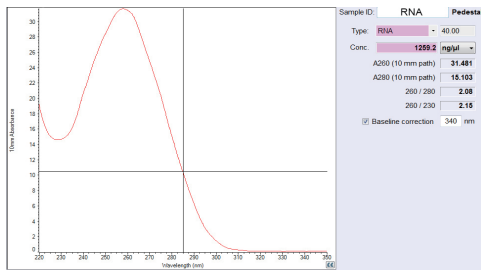
3. 组织裂解产物加氯仿混匀静置离心后，上清上柱前务必加入无水乙醇，充分混匀后加入离心柱中离心（重复过柱一次可以提高RNA纯化效率）。

4. 洗涤时需用12000 g高速离心充分去除Wash Buffer，然后空柱离心一次，然后开盖晾干2 min（此步骤可防止Wash Buffer残留在柱上）。

5. 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。若想提高RNA产量，可取适量的Elution Buffer提前预热到60°C再进行洗脱或者重复洗脱（即在初次洗脱后，将液体加回离心柱中央的膜上，放置5 min后再离心）。

### 代表性实验结果

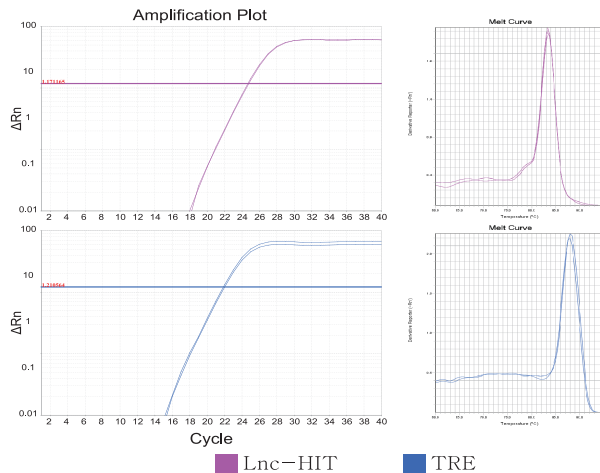
本试剂盒用于提取小鼠肌肉组织总RNA的测试结果请见下图：



左图：用Tissue RNA Purification Kit PLUS从30 mg小鼠肌肉组织中提取的RNA用Nanodrop检测的结果（30  $\mu$ l Elution Buffer洗脱）。由左图可见，用本产品提取的RNA具有很好的纯度和较高的浓度。

右图：从30 mg小鼠肌肉组织中提取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、2为本产品提取的RNA；Lanes 3、4为TRIzol (Invitrogen)方法提取的RNA。由右图可见：Tissue RNA Purification Kit PLUS提取RNA的得率明显高于TRIzol方法。

本试剂盒用于提取lncRNA的qPCR测试结果请见下图：



由上述qPCR的检测结果可见，本试剂盒能够很好的用于lncRNA的提取。