

Fast Tissue RNA Purification Kit 说明书

Cat.No.:EZB-RN5

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

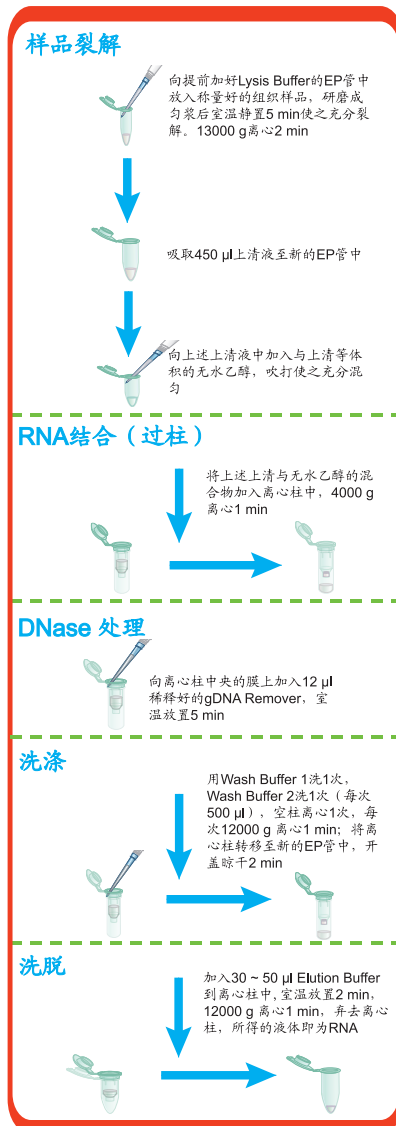
| 组分 | EZB-RN5 (100 Preps) |
|---|---------------------|
| Lysis Buffer | 65 ml |
| Wash Buffer 1 ^{*1} | 13 ml |
| Wash Buffer 2 ^{*1} | 13 ml |
| Elution Buffer | 10 ml |
| gDNA Remover | 220 μ l |
| Spin Columns for RNA (with Collection Tubes) | 100 Preps |

注：^{*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。

保存条件

gDNA Remover保存在-20°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. 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. RNA提取须在室温中进行，提取过程中不可置于冰上。
4. 本试剂盒可用于动物组织和细胞样品的RNA提取。
5. 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（下次提取时，将裂解产物解冻后恢复到室温，然后加无水乙醇混匀后继续进行后续的实验步骤即可）。
6. RNA洗脱时一定要将Elution Buffer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。
7. 关于组织用量，可参考如下表格：

| 组织种类 | 肝脏 | 脂肪 | 肿瘤、胚胎、心脏、肾脏、脾脏、胰脏、肺、脑、眼组织 |
|----------|--------|---------|---------------------------|
| 参考用量(mg) | 5 ~ 10 | 30 ~ 50 | 5 ~ 15 |

样品裂解

1. 根据样品数量取出相应数量的1.5 ml EP管，在管上做好标记，分别加入600 μ l Lysis Buffer，然后取一定重量的组织样品放入上述相应的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 ~ 15 mg（脂肪组织建议用30 ~ 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】，用研磨棒或电动研磨器对组织样品进行充分匀浆。对于肝脏或其他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，取30 ~ 300万细胞用PBS清洗后，直接在培养皿或离心管中加入600 μ l Lysis Buffer，吹打20 ~ 30次以充分裂解细胞。细胞充分裂解后直接进行第4步】。

2. 组织样品匀浆后室温静置5 min，以充分裂解。

3. 13000 g室温离心2 min，小心地吸取450 μ l的上清至新的1.5 ml EP管中（勿多吸，且避免吸到离心管底部的残渣）。对于高脂肪含量的组织，离心后会看到最上层是油层，将枪头直接插入中间层吸取中间层的上清（大约400 μ l）至新的1.5 ml EP管中。

RNA结合（过柱）

4. 向上述吸出的上清中加入与上清等体积的无水乙醇（若提取circRNA，需要加入1.6倍体积的无水乙醇），使用移液器吹打使之充分混匀（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）。然后将上述混合物转移至RNA离心吸附柱（Spin Column）中，4000 g室温离心1 min（大约相当于实验室常用的Eppendorf、Thermo或Beckman离心机的6500 rpm）。如果离心柱中有液体残留，可用12000 g室温离心1 min。倒掉收集管中的废液，用吸水纸将收集管口残留的液体吸干净。

DNase处理

5. 根据样品数，按照每个样品2 μ l gDNA Remover加10 μ l ddH₂O（需灭菌）的比例，取相应体积的gDNA Remover和ddH₂O至离心管中，用移液器吹打混匀，然后分别取12 μ l的混合物加入离心柱中央的膜上，室温放置5 min，以去除可能残留的少量基因组（DNase处理后请勿离心，应直接加入洗涤液进行下一步洗涤操作）。

洗涤

6. 加入500 μ l Wash Buffer 1到离心柱中，12000 g室温离心1 min。小心取出离心柱，倒掉收集管中的废液，用吸水纸将收集管口残留的液体吸去（注意：将离心柱从离心机中取出时，应小心拿出，防止离心柱底部接触到液体）。

7. 加入500 μ l Wash Buffer 2，12000 g室温离心1 min。倒掉收集管中的废液，用吸水纸将收集管口残留的液体吸干净。

8. 将离心柱套回收集管，12000 g室温离心1 min以充分去除残留的洗涤液。

9. 弃去收集管，将离心柱转移至无酶的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 μ l 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）。

11. 12000 g室温离心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3 min，使RNA充分溶解后再离心，能增加RNA产量）。弃去离心柱，EP管中的溶液即为RNA，立即放在冰上进行浓度测定（进行浓度测定之前一定要充分混匀），浓度测定后直接进行后续实验或储存于-80°C冰箱中。

Fast Tissue 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，研磨成匀浆后需室温静置5 min以充分裂解组织。对于RNA含量丰富的组织（如肝脏），建议用量不多于10 mg，以免纯化的RNA中混有大量无用的5S rRNA。

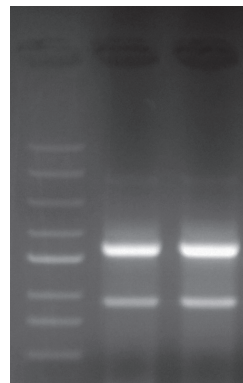
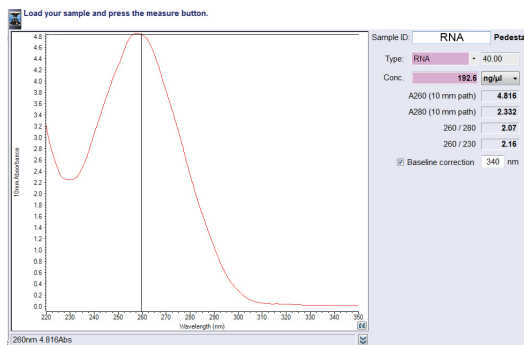
3.组织裂解产物在上柱前务必要13000 g离心2 min，只吸取450 μ l的上清至新的EP管中，勿吸到没有研磨成匀浆的残渣以免后续上柱时堵塞柱子。对于脂肪含量高的组织，裂解产物13000 g离心2 min后，此时溶液会分为3层：最上层是油层，下层沉淀是一些没有研磨成匀浆的组织残渣，使用移液器将中间层液体转移到新的EP管中，然后加入等体积的无水乙醇混匀后继续后续的实验步骤即可。

4.洗涤后需要空柱离心一次以充分去除残留在离心柱中的洗涤液；然后将离心柱转移至新的EP管中，开盖晾干2 min，此步骤的目的是使乙醇挥发。

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 μ l，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。重复洗脱一次及延长放置时间至3 min均可提高RNA产量。

代表性实验结果

本试剂盒用于提取组织RNA的测试结果请见下图：



左图：用Fast Tissue RNA Purification Kit从50 mg小鼠脂肪组织中提取的RNA用Nanodrop检测的结果（30 μ l Elution Buffer洗脱）。由左图可见，用Fast Tissue RNA Purification Kit提取的RNA具有很好的纯度和较高的浓度。