

Tissue RNA Purification Kit (for Adipose Tissue) 说明书

Cat.No.:EZB-RN001A

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

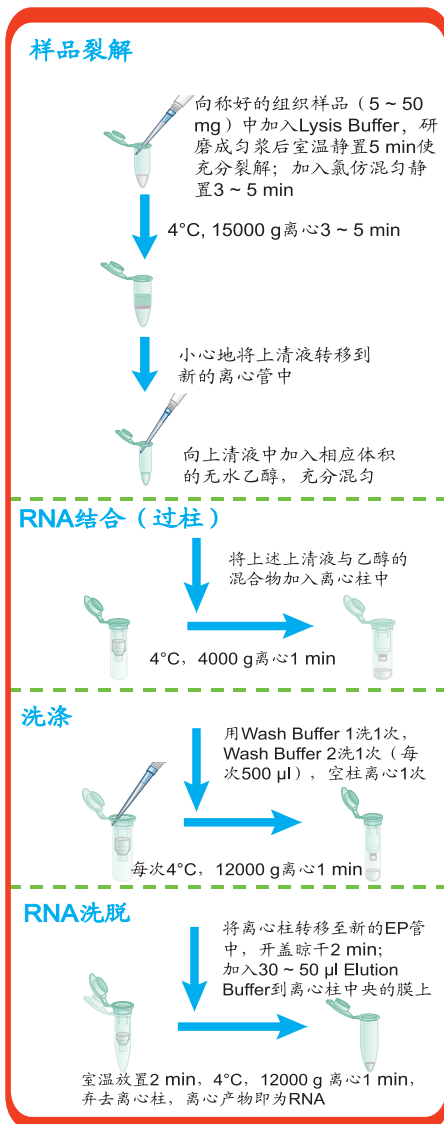
组分	EZB-RN001A (100 Preps)
Lysis Buffer	55 ml
Wash Buffer 1*	13 ml
Wash Buffer 2*	13 ml
Elution Buffer	10 ml
Spin Columns for RNA (with Collection Tubes)	100 Preps

注：*1. Wash Buffer 1和Wash Buffer 2首次使用前须加入52 ml的无水乙醇并充分混匀。

保存条件

Lysis Buffer需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首次使用前须加入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. 本试剂盒用于组织和细胞样品的总RNA提取，及miRNA、circRNA和lncRNA的提取。
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（下次解冻后恢复到室温使用，加氯仿混匀，继续向后进行即可）。
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。
7. 若裂解产物含较多油层，可将裂解产物12000 g离心2 min，然后吸取下层的水相到另一个EP管，弃去油层，接着加入150 μl氯仿，充分混匀，室温静置3~5 min，再接着第4步往后做。
8. 关于组织用量，可参考如下表格：

组织种类	脂肪	肝脏	富含脂肪的组织
参考用量(mg)	30~50	5~10	30~50

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（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】，加入500 μl Lysis Buffer，用研磨棒或电动研磨器对组织样品进行充分匀浆（匀浆可在室温操作）。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，可以取30~500万细胞，直接在培养皿或离心管中加入500 μl Lysis Buffer，吹打20下左右以充分裂解细胞，然后进行第3步操作】。

2. 组织样品匀浆后室温静置5 min，以充分裂解。

3. 加入100~150 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），室温静置3~5 min。

4. 15000 g（约13000 rpm），4°C离心3~5 min，将上清转移至新的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，往吸出的上清中加等体积的无水乙醇并充分混匀（若提取miRNA和circRNA，需要加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去。

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 μl Wash Buffer 2，12000 g，4°C离心1 min（洗柱）。倒掉废液，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以充分去除残留的洗涤液。

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）。

11. 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可以进行浓度测量并进行后续实验，或储存于-80°C备用。

Tissue RNA Purification Kit (for Adipose Tissue) 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首次使用前须加入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（如肝脏），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。

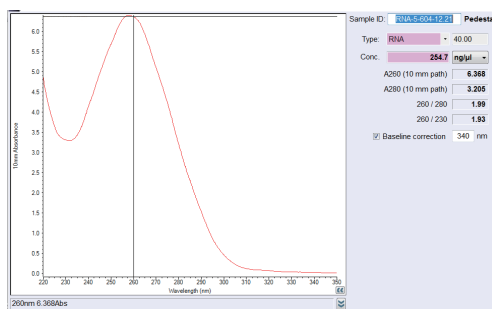
3.组织裂解产物加氯仿混匀静置离心后，上清上柱前务必加入相应体积的无水乙醇，充分混匀后加入离心柱中离心（重复过柱一次可以提高RNA纯化效率）。

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 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5 min均可提高RNA产量。

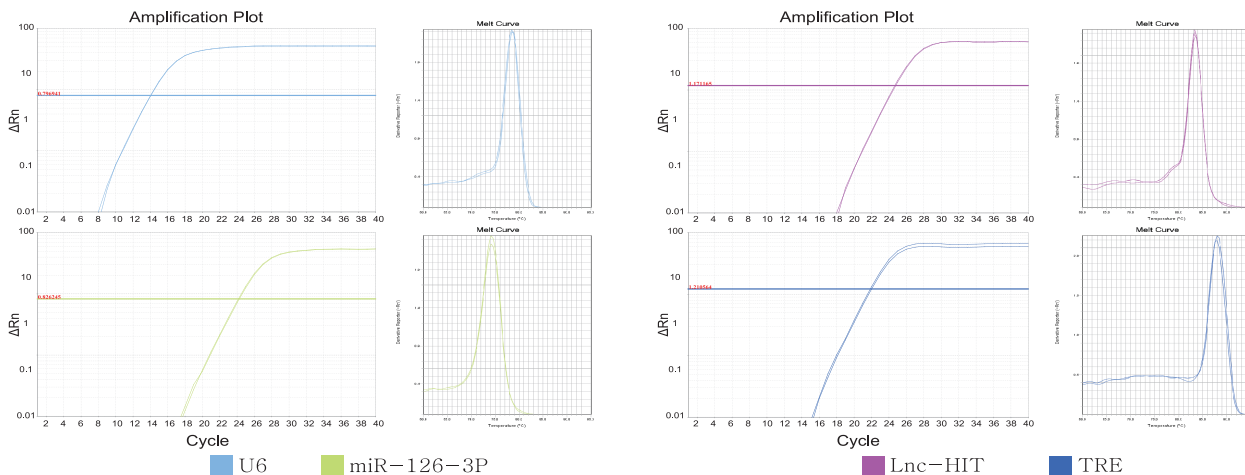
代表性实验结果

本试剂盒用于提取小鼠脂肪组织总RNA的测试结果请见下图：



左图：用Tissue RNA Purification Kit (for Adipose Tissue)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Tissue RNA Purification Kit (for Adipose Tissue)提取的RNA具有很好的纯度和较高的浓度。

本试剂盒用于提取 miRNA 和 lncRNA 的测试结果请见下图：



由上述qPCR的检测结果可见，本试剂盒能够很好的用于miRNA和lncRNA的提取。