

Universal RNA Purification Kit 使用指南

(Cat.No.:EZB-RN4)

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

向30~300万细胞样品中加入500 μl 裂解液，吹打20次左右以充分裂解细胞

组织样品称重后(5~50 mg)，在Lysis Buffer中磨碎样品，室温静置5分钟裂解；

加入100 μl Buffer A溶液混匀后静置3~5分钟，4°C、15000 g离心3~5分钟

小心地将上清液转移到新的离心管中

向上清液中加入等体积的无水乙醇，充分混匀

2. RNA Binding

RNA与离心柱结合

将上述上清液与乙醇的混合物加入离心柱中

4°C，4000 g离心1分钟

3. Column Washing

洗涤

用Wash Buffer 1洗1次，Wash Buffer 2洗1次(每次500 μl)，空柱离心1次

每次4°C，12000 g离心1分钟

4. RNA Elution

洗脱

将离心柱转移至新的EP管中，开盖晾干2分钟；加入20~30 μl Elution Buffer到离心柱中

室温放置2分钟，4°C，12000 g离心1分钟，弃去离心柱，离心产物即为RNA

注意:

1. 每瓶Wash Buffer使用前均须加入瓶身标签所示体积的无水乙醇混匀才可使用；
2. Elution Buffer使用前建议分装为3~4份保存(留一管在室温备用，其余的可冻存于-20°C)，以防污染；
3. 本试剂盒可用于组织和细胞样品的总RNA及lncRNA的提取；
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. 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；
6. 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Buffer A混匀，继续向后进行即可；
7. 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；
8. 如果提取高脂肪含量组织(例如肝脏、脂肪组织)的RNA，则建议使用货号“EZB-RN001A”的RNA提取试剂盒，以获得更好的纯度；
9. 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

1A. 对于组织样品:

a1. 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)，用电动研磨器或研磨棒对组织样品进行充分匀浆。

a2. 组织研磨均匀后室温静置5分钟，以充分裂解组织。

1B. 对于细胞样品:

b1. 对于悬浮细胞样品: 取出30~300万细胞转移至1.5 ml EP管中，500 g离心3~5分钟，弃净上清，然后加入500 μl裂解液，吹打15次左右以充分裂解细胞。

b2. 对于细胞数 $\leq 3 \times 10^6$ 的贴壁细胞样品: 弃去培养基，贴壁轻轻加入PBS清洗细胞，然后把PBS吸弃干净，直接向培养皿中加入500 μl裂解液，吹打20次左右以充分裂解细胞，然后把裂解产物转移至1.5 ml EP管。

2. 加入100 μl Buffer A，用手剧烈振荡混匀15秒(不建议涡旋混匀)，室温放置3~5分钟。

3. 15000 g(约13000 rpm)，4°C离心3~5分钟，将上清液小心地转移至新的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)

4. 对于提取mRNA和lncRNA，向吸出的上清中加入等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分钟，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

5. 加入500 μl Wash Buffer 1(已加无水乙醇且充分混匀的)到离心柱中，12000 g，4°C离心1分钟；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)。

6. 加入500 μl Wash Buffer 2(已加无水乙醇且充分混匀的)，12000 g，4°C离心1分钟(洗柱)。倒掉废液，用吸水纸将收集管口残留的液体吸干净。

7. 将离心柱放回收集管，12000 g，4°C离心1分钟以充分去除残留的废液。

8. 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

9. 向离心柱中央的膜上加入20~30 μl Elution Buffer(注: 若想提高RNA产量，可取适量的Elution Buffer提前预热到95°C再洗脱)，室温放置2分钟。

10. 12000 g，4°C离心1分钟(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分钟，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进行其他后续实验)。

Universal 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. Wash Buffer使用前需加入瓶身标签所示体积的无水乙醇混匀

才可使用；

2. 组织样品裂解前须称重，研磨均匀后需室温静置5分钟以充分裂解组织。裂解的组织加入Buffer A溶液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；

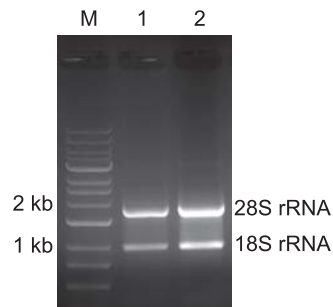
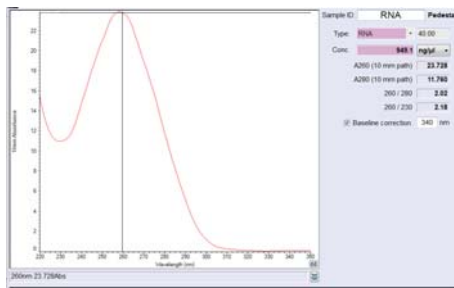
3. 组织裂解产物加Buffer A溶液混匀静置离心后，上清上柱前务必加入等体积的无水乙醇，充分混匀后加入离心柱中离心（重复过柱一次可以提高RNA纯化效率）；

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分钟（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20~30 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分钟均可提高RNA产量。

产品实测

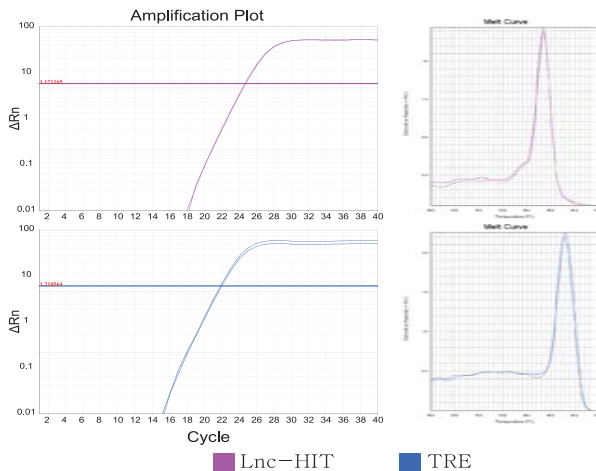
本试剂盒用于提取小鼠肌肉组织总RNA的测试结果请见下图：



左图：用Universal RNA Purification Kit从30 mg小鼠肌肉组织中提取的RNA用Nanodrop检测的结果（30 μ l Elution Buffer洗脱）。由左图可见，用Universal RNA Purification Kit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 μ l Elution Buffer洗脱/溶解RNA，取5 μ l上样）。M：250bp DNA Ladder，Lanes 1为TRIZOL (Invitrogen)方法提取的RNA；Lanes 2为Universal RNA Purification Kit提取的RNA。由右图可见：Universal RNA Purification Kit提取RNA的得率明显高于TRIZOL方法。

本试剂盒用于提取 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lncRNA的提取。