

FastPure Adipose Tissue/Cell RNA Extraction Kit Handbook FastPure 脂肪组织/细胞 RNA 提取试剂盒说明书

产品组成

Adipose Tissue/Cell RNA Extraction Kit		
产品编号	EK-1305-50T	EK-1305-100T
纯化次数	50 次	100 次
RNAEx ZOL	50ml	100ml
Buffer CH	10ml	20ml
Buffer RPE	12ml	24ml
RNase-Free Water	10ml	20ml
RNase-Free 吸附柱	50 个	100 个
2 ml 收集管	50 个	100 个
使用手册	1	1

产品介绍

本试剂盒可以快速地从小动物脂肪组织和细胞总 RNA，最多可用于 50µg RNA 的提取。本产品仅供科研使用，请勿用于医药、临床治疗、食品级化妆品等用途。

存储条件

RNAEx ZOL 可短期（3-6 个月）室温（15°C-25°C）或长期 4°C 储存，低温有助于延长其效期；其他试剂室温干燥保存可至少稳定 12 个月。

需要额外准备的材料

- 无 RNase 酶的 1.5ml 离心管
- 无 RNase 酶的吸头

- 干净的手套
- 低温高速离心机
- 物理研磨设备

开始前注意事项 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

- Buffer RPE 作为浓缩液提供，在第一次使用前加入 4 倍体积的乙醇（96-100%）以获得工作溶液。
- RNase-Free 水中不含任何抑菌因子，室温放置或操作时可能会引入细菌或真菌污染，使用时尽量注意，推荐开瓶后分装保存以减少污染风险保证实验稳定性。
- RNA 在 RNAEx ZOL 中时不会被 RNase 降解（室温短时间 2-4h，-80°C 长期约 3-6 个月保存）。但提取后继续处理过程中应使用不含 RNase 的无酶离心管或玻璃器皿。

操作步骤:**1. 请根据样品种类进行以下步骤 (1a 为脂肪细胞, 1b 为脂肪组织)**

1a. 收集脂肪细胞: 悬浮细胞可直接 300×g 离心 5min 并仔细吸除上清留沉淀待使用; 单层贴壁细胞可通过直接裂解法 (吸尽培养基留下贴壁细胞, 进行步骤 2 裂解) 或胰酶处理法 (吸尽培养基留下贴壁细胞, 用 PBS 清洗细胞, 吸除 PBS 后使用含 0.10%-0.25%胰酶使细胞脱落, 加入含有血清的培养基使胰酶失活后转入 1.5ml 无酶离心管中 300×g 离心 5min, 吸除上清留沉淀待使用)

注意: 收集细胞数量不要超过 1×10^7 , 收集细胞时一定要将细胞培养基去除干净, 否则会导致步骤 2 时细胞裂解不完全, 影响 RNA 与吸附柱的结合, 导致 RNA 的产量降低。

1b. 脂肪组织匀浆裂解处理: 将 100mg-150mg 脂肪组织转移入 1.5ml 无酶离心管中并加入 1ml RNAEx ZOL, 使用研磨杵或电动研磨机将动物组织彻底研磨匀浆。直接进行步骤 3。

匀浆时间根据样本裂解难易程度决定, 亦可匀浆后静置 3-5min 延长裂解时间 (期间颠倒吹匀 2-3 次)。RNAEx ZOL 有较多有机试剂具一定毒性, 匀浆时注意不要溅到皮肤或眼睛等部位, 建议使用防护镜操作。

2. 样品裂解: 对于 1a 中使用直接裂解法的细胞应在培养皿或培养瓶中直接加入 1 ml RNAEx ZOL 破碎细胞, 涡旋或吹匀混合。将裂解液移入无酶 1.5ml 离心管中。涡旋或移液器混合并确保没有细胞团块可见。

细胞沉淀不完全松动吹匀可能会导致裂解效率低下和 RNA 产量降低。一般 $\leq 3 \times 10^6$ 个细胞若细胞量较大, 可涡旋后静置 3-5min 延长裂解时间 (期间颠倒吹匀 2-3 次)。若不能及时提取, 裂解后溶液可至于 -80°C 储存 3-6 个月。

3. 将含裂解物离心管置于室温静置 2-5min.

该步骤促进核蛋白复合物的解离。若细胞量较少, 可无需静置; 若细胞量较大, 可适当延长静置裂解时间。

4. 向含裂解物离心管中加入 200µl Buffer CH, 用力摇动或涡旋 15s.

彻底混合对于随后的相分离很重要。

5. 将离心管置于室温静置 2-3min.

6. 在 4°C 下以 12,000×g 离心 15min.

离心后, 样品分为 3 相: 上层含有 RNA 的无色水相; 白色的中相和下层红色有机相。对于脂肪含量特别

组织, 红 有机相下 可能还可 层额外的透明相为脂质。 相体积约为 600 µl。

7. 将上层水相转移到新的无酶 1.5ml 离心管中, 加入约 1 倍体积无水乙醇, 移液器吹打彻底混匀。不要离心, 立即进行下一步骤。

加入乙醇后可能会形成沉淀, 为正常现象, 不会影响提取过程和结果。

8. 将上一步骤混匀后的溶液约 700µl 转移入 RNA 吸附柱中并套上 2ml 收集管, $\geq 8000 \times g (\geq 10,000 \text{ rpm})$ 室温下离心 30s, 弃废液。

吸附柱最大上柱量为 700µl, 若溶液过多可分多次上柱。后续操作若无特殊说明吸附柱均置于 2ml 收集管中。

9. 向吸附柱中加入 500µl Buffer RPE (使用前请确认 Buffer RPE 是否按要求加入 4 倍体积无水乙醇), $\geq 8000 \times g (\geq 10,000 \text{ rpm})$ 离心 30s, 弃废液。

10. 重复步骤 9 一次。

11. 倒弃滤液, 将吸附柱放入收集管中, 以最大转速 (~13,400×g) 离心 3min 干燥柱膜。

12. 将吸附柱套入新的无酶 1.5ml 离心管中, 并置于无酶的环境中开盖静置 5-10min 至乙醇晾干。

若吸附柱中残留乙醇将会对纯化后的 RNA 的下游实验造成影响。

13. 向吸附柱膜正中央加入 50-100µl RNase-Free Water, 盖上盖子室温静置 3-5 min. 后置于离心机中 $\geq 12,000 \times g (\geq 13,000 \text{ rpm})$ 离心 3min 得到 RNA 溶液。

RNA 洗脱体积不应少于 30µl, 否则影响洗脱效率。洗脱后的 RNA 溶液应置于 -80°C 储存。