

目 录

| | |
|-------------------------|----|
| 简 介 | 2 |
| 原 理 | 2 |
| 试剂盒组成 | 3 |
| 保质期 | 3 |
| 准备工作 | 4 |
| 方案 1: 细胞总 RNA 微量提取方案 | 5 |
| 方案 2: 细胞小分子 RNA 富集提取方案 | 7 |
| 附加方案 3: 细胞 DNA 或总核酸提取方案 | 9 |
| 附加方案 4: 细胞蛋白质提取方案 | 10 |
| 常见问题回答 | 11 |

版本: 2013-08

简介

AllPure Cell Micro Kit 是从少量细胞($1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$)中提取 RNA、小分子 RNA、DNA 和蛋白质最为快速和简单的方法。试剂盒采用硅胶柱纯化技术，抽提过程中无需用到危险的酚氯仿抽提，也无需用到耗时的醇类沉淀。试剂盒适合从 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ 培养细胞提取得总 RNA，小分子 RNA、DNA 和蛋白质。得到的 RNA 可直接用于 RT-PCR、Northern Blot、核酸保护和体外翻译等实验。得到的 DNA 可直接用于 PCR、Southern 杂交等。得到的 Protein 可直接用于 SDS-PAGE 电泳、Western 杂交等。

原理

HiPure 硅胶柱以高结合力的玻璃纤维滤膜为基质。滤膜在高浓度离子化剂(如盐酸胍或异硫氰酸胍)条件下，可通过氢键和静电等物理化学作用吸附核酸，而蛋白质和其它杂质则不被吸附而去除。吸附了核酸的滤膜经洗涤去除残留的蛋白质和盐，最后可以用低盐缓冲液(如 Buffer TE)或水，洗脱出滤膜上吸附的核酸。得到的核酸纯度高，可直接用于各种下游实验。

AllPure Cell Micro Kit 基于硅胶柱纯化方式。细胞在含高浓度异硫氰酸胍裂解液中匀浆裂解，RNA 和 DNA 释放到裂解液中。由于裂解液中含有高浓度异硫氰酸胍，内源性或外源性的核酸酶变性而失活，RNA 和 DNA 被保护起来。转移至 DNA 结合柱吸附 DNA，滤液加入乙醇调节结合条件，转移至 RNA 柱子吸附 RNA。DNA 和 RNA 柱子经 Buffer Buffer RWT 洗涤蛋白质和其它杂质，经 Buffer RW2 洗涤去除盐分，RNA 被 RNase-Free Water (DEPC 处理水)洗脱。DNA 被灭菌水洗脱。收集滤液，加入丙醇沉淀回收蛋白质，最后加入合适的缓冲液溶解蛋白质。

组 成

AllPure Cell Micro Kit

| 产品编号 | R5215-01 | R5215-02 | R5215-03 |
|---------------------------|----------|-----------|-----------|
| 纯化次数 | 10 次 | 50 次 | 250 次 |
| HiPure RNA Mini Columns I | 10 | 50 | 250 |
| HiPure DNA Mini Columns I | 10 | 50 | 250 |
| 2ml Collection Tubes | 20 | 100 | 500 |
| Buffer RL | 10 ml | 30 ml | 100 ml |
| Buffer RWC* | 5 ml | 20 ml | 80 ml |
| Buffer RW2* | 5 ml | 2 x 20 ml | 2 x 50 ml |
| RNase Free Water | 1.8 ml | 15 ml | 60 ml |
| 说明书 | 1 | 1 | 1 |

保 质 期

AllPure Cell Micro Kit 可在室温下(15-25℃)干燥保存 18 个月。长期保存时需置于 2-8℃。低温下, Buffer RL 可能会有沉淀形成, 需 55℃ 水浴让沉淀完全溶解后使用。因 DEPC 处理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。我们推荐分装 DEPC 处理水并保存于-20℃, 以减少污染。若 DEPC 处理水受到污染, 请重新配制。

RNase Free Water 的配制:

在试剂瓶中装入适量去离子水, 加入 0.1% DEPC, 磁力搅拌器搅拌过夜, 于 120℃ 灭菌 20-30 分钟。处理后, 分装保存于 2-8℃ 或-20℃。灭菌后 RNase Free Water 处理水有乙醇气味, 属于正常现象。

需要准备材料和工具

- **(可选)14.3M β -巯基乙醇(β -ME)或1M DTT:** 使用前,分装适量的Buffer RL,每1ml Buffer RL加入20 μ l β -巯基乙醇。Buffer RL/ β -ME混合液可室温稳定放置1个星期。 β -ME有较强的气味,可用1 M DTT (Dithiothreitol)代替。用DEPC处理水或灭菌水配制1M DTT,分装保存于-20 $^{\circ}$ C。按1ml Buffer RL加入20 μ l 1M DTT,该混合液可于室温放置2天。
- 70%乙醇:用DEPC处理水配制
- 无水乙醇(96-100%)
- (蛋白质提取)丙酮和蛋白质溶解液(2~5% Buffer SDS、8M Urea、或其它缓冲液)
- (DNA 提取)Buffer TE, PH8.0
- 无 RNase 酶的 1.5ml 离心管
- 无 RNase 酶的枪头
- 手套
- 按瓶子标签所示,加入适量的无水乙醇稀释 Buffer RW2,并于室温保存。
- 按瓶子标签所示,加入 2 倍体积的无水乙醇稀释 Buffer RWC,并于室温保存。

方案 1. 培养细胞总 RNA(含小分子 RNA)提取

该方案适合从 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ 个细胞中提取 RNA 或总 RNA(含小分子 RNA)，以下离心都在室温下进行。

细胞的收集

- **悬浮细胞：**计算细胞数量。400 x g 离心 5 分钟收集细胞。彻底吸弃培养液，按第 1 步操作。
- **贴壁细胞：**贴壁细胞可在培养瓶/皿中直接裂解；也可经胰酶消化后离心收集。
直接裂解：计算细胞数量。彻底吸弃培养液，按第 1 步进行操作。
胰酶消化：计算细胞数量。吸弃培养液，用 PBS 清洗细胞，再加入含 0.1-0.25% 胰酶的 PBS。当细胞从壁上脱落后，加入含血清的培养液(血清可抑制胰酶)，并转移至离心管中，400 x g 离心 5 分钟。彻底吸弃溶液，并按第 1 步进行操作。
培养液须彻底去除，残留的培养液会稀释裂解液而影响 RNA 完整性和产量。

细胞的裂解和匀浆

1. 加入适量的 Buffer RL 至细胞样品中，重悬打散细胞。

离心收集的细胞：弹打或涡旋松散细胞，加入 300 μ l Buffer RL 至样品中，涡旋或吸打打散细胞。

贴壁细胞：彻底吸弃培养液，向培养板的孔中加入 300 μ l Buffer RL。用移液枪吹打使细胞从壁上脱落，并转移至离心管中。

2. (可选)用移液枪吸打裂解液 3~5 次以进一步裂解样品。

过柱吸附 DNA

3. 把 HiPure DNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。把全部裂解液转移至 DNA 柱子中。8,000 x g 离心 1 分钟。保留 HiPure DNA Mini Column I，按附加方案 3 进行 DNA 抽提。

4. 加入(等倍体积的 70%乙醇)或(1.5 倍体积的无水乙醇)至滤液中，用移液枪吸打 3~5 次。

若只需提取大分子 RNA(去除小于 200nt 的 RNA，如 tRNA，5SrRNA 和 miRNA)时，加入等倍体积的 70%乙醇。若需提取总 RNA(含小分子 RNA)时，加入 1.5 倍体积的无水乙醇。

5. 把 HiPure RNA Mini Columns I 装在 2ml 收集管中。转移混合液至 RNA 柱子中。8,000 x g 离心 30~60 秒。收集滤液并转移至 2ml 离心管中或倒弃滤液。

若需提取蛋白质，把收集滤液保存起来，按附加方案 4 进行总蛋白质的提取。

6. 把柱子装回收集管中。**加入 500 μ l Buffer RWC 至柱子中。**8,000 \times g 离心 30~60 秒。
Buffer RWC 在使用之前，必须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签或说明书进行稀释。
7. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。**加入 500 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释) 至柱子中。**8,000 \times g 离心 30-60 秒。
Buffer RW2 在使用之前，必须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签或说明书进行稀释。
8. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。**加入 500 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中，**10,000 \times g 离心 30-60 秒。
9. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。10,000 \times g 离心空柱 2 分钟甩干柱子。
10. 把柱子装在新的 1.5ml 离心管中。**加入 10~30 μ l DEPC 水至柱子的膜中央。**室温静置 1 分钟。10,000 \times g 离心 1 分钟。
11. 弃去 RNA 柱子，把 RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。

方案 2. 培养细胞小分子 RNA 富集提取

该方案适合于从 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ 个细胞中富集小分子 RNA，以下离心都在室温下进行。

细胞的收集

- **悬浮细胞：**计算细胞数量。400 x g 离心 5 分钟收集细胞。吸弃培养液，按第 1 步操作。
- **贴壁细胞：**贴壁细胞可在培养瓶/皿中直接裂解；也可经胰酶消化后离心收集。
 直接裂解：计算细胞数量。彻底吸弃培养液，按第 1 步进行操作。
 胰酶消化：计算细胞数量。吸弃培养液，用 PBS 清洗细胞，再加入含 0.1-0.25% 胰酶的 PBS。当细胞从壁上脱落后，加入含血清的培养液(血清可抑制胰酶)，并转移至离心管中，400 x g 离心 5 分钟。彻底吸弃溶液，并按第 1 步进行操作。
 注：培养液须彻底去除，残留的培养液会稀释裂解液而影响 RNA 完整性和产量。

细胞的裂解和匀浆

1. **加入适量的 Buffer RL 至细胞样品中，重悬打散细胞。**
 离心收集的细胞：弹打或涡旋松散细胞，加入 300 μ l Buffer RL 至样品中，涡旋或吸打打散细胞。
 贴壁细胞：彻底吸弃培养液，向培养板的孔中加入 300 μ l Buffer RL。用移液枪吹打使细胞从壁上脱落，并转移至离心管中。
2. (可选) 用移液枪吸打裂解液 3~5 次以进一步裂解样品。
3. **加入 100 μ l 无水乙醇至裂解液中，用移液枪吸打 3~5 次。**
4. 把 HiPure DNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。**转移第 3 步的混合液至 DNA 柱子中。**8,000 x g 离心 1 分钟。保留或收集滤液至新的离心管中。
 若需要提取总核酸，保留 DNA 柱，按附加方案 3 进行总核酸(DNA/RNA)抽提。
5. **加入 350 μ l 无水乙醇至滤液中，用移液枪吸打混匀 3~5 次。**
6. 把 HiPure RNA Mini Columns I 装在 2ml 收集管中。**转移混合液至 RNA 柱子中。**8,000 x g 离心 30~60 秒。收集滤液并转移至合适的离心管中或倒弃滤液。
 若需提取蛋白质，把收集滤液保存起来，按附加方案 4 进行总蛋白质的提取。若不需要提取蛋白质，倒弃滤液。

7. 把 RNA 柱子装回收集管中。**加入 500 μ l Buffer RWC 至柱子中。**10,000 \times g 离心 30-60 秒。
Buffer RWC 在使用之前，必须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签或说明书进行稀释。
8. 倒弃流出液，把 RNA 柱子装回收集管中。**加入 500 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释) 至柱子中。**10,000 \times g 离心 30-60 秒。
Buffer RW2 在使用之前，必须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签或说明书进行稀释。
9. 倒弃流出液，把 RNA 柱子装回收集管中。**加入 500 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释) 至柱子中，**10,000 \times g 离心 30-60 秒。
10. 倒弃流出液，把 RNA 柱子装回收集管中。10,000 \times g 离心空柱 3 分钟。
11. 把柱子装在新的 1.5ml 离心管中。**加入 10~30 μ l DEPC 水至柱子的膜中央。**室温静置 2 分钟。10,000 \times g 离心 1 分钟。
12. 弃去 RNA 柱子，把 miRNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。

附加方案 3. 细胞 DNA 或总核酸提取

该方案适合于从 DNA 柱子中进一步纯化得到基因组 DNA(方案 1)或总核酸(DNA/RNA, 方案 2), 以下离心都在室温下进行。

1. 取方案 1 或方案 2 中的 HiPure DNA Mini Kit I。

经方案 1 处理后, HiPure DNA Mini Kit I 只结合了基因组 DNA, 经该方案纯化后, 可得到基因组 DNA。经方案 2 处理后, HiPure DNA Mini Kit I 结合了基因组 DNA 和大分子 RNA, 经该方案纯化后, 可得到基因组 DNA 和 RNA。

2. 把 HiPure DNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。**加入 500 μ l Buffer RWC 至柱子中。**10,000 \times g 离心 30-60 秒。

Buffer RWC 在使用之前, 必须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签或说明书进行稀释。

3. 倒弃流出液, 把柱子装回收集管中。**加入 500 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释) 至柱子中。**10,000 \times g 离心 30-60 秒。

Buffer RW2 在使用之前, 必须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签或说明书进行稀释。

4. 倒弃流出液, 把柱子装回收集管中。**加入 500 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中,** 10,000 \times g 离心 30-60 秒。

5. 倒弃流出液, 把柱子装回收集管中。10,000 \times g 离心空柱 2 分钟甩干柱子。

6. 把柱子装在新的 1.5ml 离心管中。**加入 20 μ l Buffer TE 或 DEPC 水至柱子的膜中央。**室温静置 3 分钟。10,000 \times g 离心 1 分钟。

提取基因组 DNA 时, 最好用预热至 55 $^{\circ}$ C 的 Buffer TE 洗脱 DNA, 若无 Buffer TE, 也可以用灭菌水。

7. **(可选)再加入 20 μ l Buffer TE 或 DEPC 水至柱子的膜中央。**室温静置 3 分钟。10,000 \times g 离心 1 分钟。

8. 弃去 HiPure DNA Mini Kit I 柱子, 把 DNA 保存于-20 $^{\circ}$ C(方案 1)或把 DNA/RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。

附加方案 4. 细胞总蛋白质抽提

该方案适合于从方案 1 或方案 2 的滤液中进一步纯化得到总蛋白质，用于 SDS-PAGE 和 Western Blot 分析。处理该方案，需要以下准备以下的材料。

- 丙酮
 - 无水乙醇
 - 蛋白溶解液(如 2~5% Buffer SDS, 8M 尿素, 或上样缓冲液)
1. 取方案 1 的第 5-6 步的滤液至合适的离心管，或方案 2 的第 7-8 步的滤液至合适的离心管中。
 2. **测量滤液的体积，加入 4 倍体积冰冷的丙酮滤液中，涡旋混匀 30 秒。**冰上放置 30 分钟沉淀蛋白质。
 3. 12,000 × g 离心 10 分钟离心沉淀收集蛋白。
 4. 小心倒弃上清液，加入 1ml 无水乙醇，涡旋混匀。
 5. 12,000 × g 离心 3 分钟，小心倒弃上清液。
 6. 短暂离心，彻底吸弃残留的乙醇。空气干燥 5-10 分钟。
 7. 根据下游应用，加入 30~100 μ l 蛋白溶解液(如 5% SDS)。用移液枪吸打或涡旋打散蛋白沉淀。
 8. 95 $^{\circ}$ C 水浴 5 分钟溶解蛋白质。
 9. 室温静置让样品恢复至室温。12,000 × g 离心 3 分钟去除不溶解的物质。
 10. 转移上清液至新的 1.5ml 离心管中。放置 4 $^{\circ}$ C 或 -20 $^{\circ}$ C，或用于 SDS-PAGE 电泳，或定量等。

常见问题回答

该列表可能有利于解决提取过程所碰到的问题。Magen 技术人员可以随时为您提供服务，若您对试剂盒存在问题或建议，或您在分子生物学上碰到问题，都请您联系我们。我们将竭尽所能为您排忧解难。

| 现象 | 原因及解决方法 |
|---------------------|---|
| 柱子堵塞 | |
| 样品匀浆不充分 | 用匀浆器进一步匀浆，提高样品的裂解效果； 减少样品用量或增加裂解液 RL 的用量； |
| 样品起始用量太多 | 减少样品用量。正确的样品用量是获得理想结果的先决条件；过多的细胞用量反而会造成产量和纯度的下降。 |
| 低温离心 | 试剂盒中除特别指明，所有的离心操作都必须在室温（20-25℃）。离心条件低于 20℃时，可能会导致沉淀的形成而引起柱子堵塞。 |
| RNA 产量低 | |
| 样品匀浆不充分 | 参照上面 |
| 样品起始用量太多 | 参照上面 |
| RNA 的洗脱效率低 | DEPC 水需直接加到膜上，并静置 2 分钟后，再离心洗脱； 加入 DEPC 水太少。建议进行第二次或第三次洗脱 |
| 培养液没彻底去除 | 从细胞中提取 RNA 时，要把培养液彻底吸弃。 |
| Buffer RW2 没有加入乙醇稀释 | Buffer RW2 使用前，必须加入无水乙醇进行稀释 |
| RNA 降解 | |
| 样品用量太多 | 减少样品用量。正确样品用量是获得理想结果的先决条件 |
| RNA 酶污染 | 操作过程引入 RNA 酶的污染或溶液污染 |
| β-巯基乙醇或 DTT | 使用前，分装适量的 Buffer RL，每 1ml Buffer RL 加入 20μl β-巯基乙醇或 1M DTT，以提高裂解液的抑制能力。 |

DNA 污染

样品用量太多 减少细胞用量。

样品匀浆不充分 提高匀浆效果打断高分子量基因组 DNA,降解裂解液的粘稠度。

下游实验结果不理想

盐类污染 加入 Buffer RW2 后，静置 3 分钟再离心

乙醇污染 确保空柱离心时速度 12,000xg，离心时间为 2 分钟。

膜材料脱落 硅胶膜在离心过程中可能会发生脱落。脱落的颗粒是不溶解的，可通过 12,000 x g 离心 2 分钟去除。

A260/230 太高 由于异硫氰酸胍在 A230 中有较高的本底吸收峰。当核酸浓度低于 50ng/ul 时，较高的本底 A230 吸收峰，A260/230 有可能小于 1.0，但不会影响抑制下游应用。