

AllPure Total DNA/RNA 96 Kit

96孔DNA/RNA共提试剂盒

产品简介

本产品适合于从 $\leq 3 \times 10^6$ 个培养细胞、 $\leq 10\text{mg}$ 动物软组织(肝脏、脾脏、肾脏、脑等)、 $\leq 100\text{mg}$ 常规的植物/真菌组织样品中同时提取总RNA和DNA。试剂盒基于硅胶柱纯化技术,提取过程中无需使用有毒的酚氯仿抽提,整个提取过程只需15~25分钟。试剂盒结合DNA过滤技术,可高效地过滤去除DNA。得到的RNA可直接用于RT-PCR、Northern Blot、Poly A纯化,核酸保护和体外翻译等实验。

产品组份

产品编号	R5113-01	R5113-02	R5113-03
纯化次数	1 x 96	4 x 96	20 x 96
HiPure RNA Plate	1	4	20
HiPure gDNA Plate	1	4	20
1.6ml Collection Plate	2	8	40
0.5ml Elute Plate	2	8	40
封口膜	4	16	80
Buffer RL	50 ml	200 ml	2 x 500 ml
Buffer GWP	70 ml	250 ml	3 x 500 ml
Buffer RW1	70 ml	400 ml	3 x 500 ml
Buffer RW2	50 ml	2 x 100 ml	4 x 200 ml
RNase Free Water	30 ml	100 ml	500 ml
Elution Buffer	30 ml	100 ml	500 ml
说明书	1	1	1

保存条件

本产品可在室温(15~25℃)保存 18 个月。因 RNase Free Water 不含抑菌剂，室温放置或操作时可能会引入细菌或真菌污染，推荐分装保存于 2~8℃，以减少污染。

准备事项

- 在 Buffer RW2 中，加入 4 倍体积无水乙醇，于室温保存。
- 70%乙醇(DEPC 处理水配制)
- 提升裂解液的变性能力：使用前分装适量的 Buffer RL，按每 1ml Buffer RL 加入 20μl β-巯基乙醇、1M DTT 或 1M TCEP，混合液室温可保存 1 周。TCEP，中文名为三(2-羧乙基)膦盐酸盐，是一种高效、无异味、不含硫醇基还原剂，可高效灭活核酸酶和防止多酚氧化，可代替 2-巯基乙醇，提高 RNA 的完整性和得率。

方案. 细胞和动物组织总 RNA 高通量提取

该方案采用 96 孔 RNA 结合板和 96 孔 DNA 结合板，可高通量地从 96 个 $\leq 5 \times 10^6$ 个培养细胞和 <10mg 动物软组织，如肝脏、脾脏、肾脏等样，以及 ≤ 100 mg 常规的植物/真菌组织样品中提取高达 100μg 总 RNA 和总 DNA，以下离心均在室温下进行。

A. 培养细胞的收集和裂解($1 \sim 5 \times 10^6$ 个细胞)。

1. 加入适量的 Buffer RL 至细胞样品中，打散细胞。

离心收集的细胞：弹打或涡旋松散细胞沉淀，根据细胞量加入适量的 Buffer RL，涡旋或用移液枪吸打打散细胞。

- $\leq 5 \times 10^6$ 细胞：加入 500μl Buffer RL；

直接裂解：彻底吸弃培养液，向培养瓶或培养皿中加入适量的 Buffer RL。用移液枪吹打使细胞从壁上脱落，转移至 1.5ml 离心管中。

- 6 cm 直径的培养皿：加入 500μl Buffer RL；

2. 涡旋混匀或最高速度振荡混匀 1 分钟，然后按第 3 步进行操作。

B. 组织样品的裂解

正确的组织用量是获得理想 RNA 产量和纯度的保证。该试剂盒的组织用量可低至 0.1mg，

而最大的组织用量则取决于样品中 RNA 的含量、蛋白质和杂质的含量。

- 肝脏含有大量蛋白质，组织用量 $\leq 10\text{mg}$ ；
- 脾脏、胸胰组织含大量 DNA，裂解液非常粘稠，组织用量能太多 $\leq 10\text{mg}$ ；

若处理的组织没有相关的信息，我们推荐第一次起始用量为 10mg ，根据获得的结果再调整组织用量。不管何种情况，组织用量都不应超过 20mg 。

1. 取组织样品，加入 Buffer RL，用合适工具进行匀浆，室温静置 3~5 分钟。

- $\leq 10\text{mg}$ 动物软组织：加入 $500\mu\text{l}$ Buffer RL 进行匀浆；
- $\leq 20\text{mg}$ 难裂解组织(肌肉/皮肤)：用 $400\mu\text{l}$ Buffer RL 匀浆肌肉类组织。取 $350\mu\text{l}$ 匀浆液，加入 $150\mu\text{l}$ RNase Free Water 和 $20\mu\text{l}$ Proteinase K(需另外订购)，颠倒混匀 6-8 次， 55°C 温育 10 分钟。
- $\leq 100\text{mg}$ 植物样品：用液氮将植物或真菌研磨成粉末，取 $10\sim 100\text{mg}$ 粉末至 $1.5\sim 2.0\text{ml}$ 预冷的离心管中，立即加入 $550\mu\text{l}$ Buffer RL，涡旋 15 秒打散样品，室温静置 3 分钟。

2. $14,000 \times g$ 离心 5 分钟，按第 3 步进行操作。

RNA 提取

3. 把 HiPure gDNA Plate 装在 1.6ml 收集板中，把 $500\mu\text{l}$ 细胞裂解液或组织上清液转移至 gDNA 过滤柱中。 $4,000\sim 5,000 \text{ rpm}$ 离心 5 分钟。取 HiPure DNA Plate 装在新的收集管中，按第 12-17 步进行 DNA 提取。

4. 加入等倍体积 70%乙醇至滤液中，贴上封口膜，颠倒混匀 6-8 次，短暂离心收集孔口的液滴。

操作过程中裂解液可能有损失，70%乙醇应按照裂解液的实际体积加入。处理肝脏样品时，用 50%乙醇代替 70%乙醇有利于提高产量。

5. 把 HiPure RNA Plate 在 1.6ml 收集板中。转移全部混合液至 RNA 结合板中。 $4,000\sim 5,000 \text{ rpm}$ 离心 5 分钟。

6. 把 RNA 结合板装在 1.6ml 收集板中。加入 $600\mu\text{l}$ Buffer RW1 至结合板中。 $4,000\sim 5,000 \text{ rpm}$ 离心 5 分钟。

7. 把 RNA 结合板装在 1.6ml 收集板中。加入 $600\mu\text{l}$ Buffer RW2(已用乙醇稀释)至结合板中， $4,000\sim 5,000 \text{ rpm}$ 离心 5 分钟。

Buffer RW2 在使用之前，必须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签指示进行稀释。

8. 把 RNA 结合板装在 2ml 收集板中。加入 600 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至结合板中。4,000~5,000 rpm 离心 5 分钟。
9. 把 RNA 结合板装在 1.6ml 收集板中，4,000~5,000 rpm 离心 10 分钟以甩干基质。
10. 把 RNA 结合板装在 0.5ml 收集板(自备)中，加入 50 μ l RNase Free Water 至柱子膜中央。室温静置 3 分钟。4,000~5,000 rpm 离心 5 分钟。
11. 再加入 50 μ l RNase Free Water 至柱子膜中央。室温静置 3 分钟。4,000~5,000 rpm 离心 5 分钟。弃去 RNA 板，贴上封口膜，把 RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。

DNA 提取

12. 加入 500 μ l Buffer GWP 至 HiPure gDNA Plate(第 3 步)的孔中，静置 3 分钟。4,000~5,000 rpm 离心 5 分钟。
13. 把 DNA 结合板装在 1.6ml 收集板中。加入 600 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至结合板中，4,000~5,000 rpm 离心 5 分钟。
Buffer RW2 在使用之前，必须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签指示进行稀释。
14. 把 DNA 结合板装在 2ml 收集板中。加入 600 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至结合板中。4,000~5,000 rpm 离心 5 分钟。
15. 把 DNA 结合板装在 2ml 收集板中，4,000~5,000 rpm 离心 10 分钟以甩干基质。
16. 把 RNA 结合板装在 0.5ml 收集板(自备)中，加入 75 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Elution Buffer 至柱子膜中央。室温静置 5 分钟。4,000~5,000 rpm 离心 5 分钟。
17. 再加入 75 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Elution Buffer 至柱子膜中央。室温静置 5 分钟。4,000~5,000 rpm 离心 5 分钟。弃去 DNA 板，贴上封口膜，把 DNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。