

AllPure RNA and Protein Kit

组织细胞 RNA/蛋白共提试剂盒

产品简介

本产品适合于从 $\leq 1 \times 10^7$ 个培养细胞、 $\leq 30\text{mg}$ 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得到RNA。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30分钟。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	R5212-01	R5212-02	R5212-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns	10	50	250
gDNA Filter Mini Columns	10	50	250
2ml Collection Tubes	20	100	500
Buffer RLC	10 ml	50 ml	200 ml
Buffer GWP	10 ml	30 ml	150 ml
Buffer RW1	10 ml	50 ml	250 ml
Buffer RW2*	6 ml	50 ml	3 x 50 ml
RNase Free Water	1.8 ml	10 ml	30 ml
Elution Buffer	1.8 ml	10 ml	30 ml
说明书	1	1	1

保存条件

本产品可在室温(15~25°C)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°C, 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 RLC，按每 1ml Buffer RLC 加入 20 μ l 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。

实验步骤

A. 培养细胞的收集和裂解

本产品单次可处理 $10^2\sim 10^7$ 个细胞。初次使用时，建议使用 $2\sim 5 \times 10^6$ 个细胞。根据结果再调整细胞量，但不论何种情况，细胞量不要超过 1×10^7 。

1. 加入适量的 Buffer RLC 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 RLC，涡旋或用移液枪吸打打散细胞。

- $\leq 5 \times 10^6$ 细胞：加入 350 μ l Buffer RLC；
- $\geq 5 \times 10^6$ 细胞：加入 750 μ l Buffer RLC；

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 RLC。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 350 μ l Buffer RLC；
- 6-10 cm 直径的培养皿：加入 750 μ l Buffer RLC；

2. 用一次性 1ml 注射器或移液枪抽打裂解液 5~10 次打断 DNA，按第 3 步进行操作。

B. 组织样品的裂解

本产品可处理 <30mg 动物组织、50~100mg 植物组织。正确组织量是获得理想产量和纯度的关键。肝脏 10~20mg，脾脏/胸腺小于 10mg，植物 50~100mg。初次使用时，推荐动物组织量为 10~15mg，植物为 50~100mg。根据结果再调整用量。处理肌纤维样品(肌肉/皮肤/心脏)，需另外订购 Proteinase K(20mg/ml)。处理富含脂类组织推荐使用 HiPure Universal RNA Kit。样品可用液氮研磨、机械/玻璃匀浆器等工具进行匀浆。

1. 取组织样品，加入 Buffer RLC，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 400 μl Buffer RLC 进行匀浆；
- $> 10\text{mg}$ 动物软组织：加入 750 μl Buffer RLC 进行匀浆；
- $\leq 100\text{mg}$ 植物样品：用液氮将植物或真菌研磨成粉末，取 50~100mg 粉末至 1.5~2.0ml 预冷的离心管中，立即加入 750 μl Buffer RLC，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。
3. 把 gDNA Filter Mini Column 装在 2ml 收集管中，转移第 2 步的裂解液至 DNA 过滤柱中，14,000 \times g 离心 2 分钟。

总 RNA 抽提

4. 加入等倍体积的 70%乙醇至滤液中，用移液枪吸打混匀 3-5 次。
5. 把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中，转移 $\leq 750\mu\text{l}$ 混合液至 RNA 柱子中。12,000 \times g 离心 30-60 秒，收集滤液并转移至 2ml 离心管中。
6. (可选:混合液超过 700 μl) 把柱子装在收集管中，把剩余混合液转移至 RNA 柱子中。12,000 \times g 离心 30-60 秒。收集滤液并转移至同一个 2ml 离心管中。按第 12-18 步进行蛋白质提取。
7. 把柱子装回收集管中。加入 500 μl Buffer RW1 至柱子中。12,000 \times g 离心 30-60 秒。
8. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 500 μl Buffer RW2(已用乙醇稀释) 至柱子中。12,000 \times g 离心 30-60 秒。
9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 500 μl Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。12,000 \times g 离心 30-60 秒。
10. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。12,000 \times g 离心空柱 2 分钟甩干柱子。
11. 把柱子装在新的 1.5ml 离心管中，加入 30-100 μl RNase Free Water 至柱子的膜中央，室温静置 2 分钟。12,000 \times g 离心 1 分钟。弃去 RNA 柱子，把 RNA 保存于-80 $^{\circ}\text{C}$ 。

当 RNA 总量高于 10 μg 时，OD260/230 一般都在 1.3-2.2；当 RNA 总量在 5~10 μg 时，A260/230 会在 0.7~2.0；当 RNA 总量低于 3 μg ，A260/230 会低于 0.6。这是因为 Buffer RTL、RW1 含异硫氰酸胍，以及玻璃滤膜有吸水性或本底吸附。异硫氰酸胍在 230nm 有强烈吸光值，因此 A260/230 主要受该胍盐影响，而不是来源于样品。研究表明，低浓度异硫氰酸胍不影

响反转录，定量 RT-PCR，二代测序等相关应用。出现 260/230 在 0.2-1.0 时，可以忽略并直接用于反转录等下游应用。在不堵塞柱子的情况下，适量提高样品用量和裂解液用量，提高核酸浓度（核酸总量>10ug）时，OD260/230 可以明显改善。

蛋白质抽提

12. 取第 5-6 步获得的滤液，加入 4 倍体积冰冷的丙酮，涡旋混匀 10 秒，冰上放置 30 分钟沉淀蛋白质。室温下， $12,000 \times g$ 离心 10 分钟沉淀蛋白，小心倒弃上清液。
13. 加入 1ml 无水乙醇，涡旋混匀 5 秒。室温下， $12,000 \times g$ 离心 3 分钟。
14. 小心倒弃上清液。短暂离心，彻底吸弃残留的乙醇，空气干燥 5-10 分钟。
15. 根据下游应用，加入 100-500 μ l Buffer PR2(5% SDS)或其它缓冲液至蛋白质沉淀。

Buffer RL 含有高浓度的异硫氰酸胍，以灭活 DNase, Rnase 和 proteases。高浓度异硫氰酸胍会导致蛋白质的变性，而引起其溶解度下降。加入溶解液溶解时(如 PBS, TE 等)，需要涡旋较长的时间或用枪抽打打散沉淀的蛋白质。用 Buffer PR2 (5% SDS)或 8M Urea 可快速让蛋白质的溶解。沉淀中含有细胞碎片或其它杂质无法被完全溶解，可离心去除。蛋白质溶解于 5% SDS 后，可直接用 BCA(bicinchoninic acid)法定量分析。蛋白质溶解于 8M Urea，稀释至 3M 后，也可用 BCA 法进行定量。溶液的体积取决于样品的用量和蛋白质含量。
16. 用研磨棒和移液枪吸打匀浆打散蛋白质沉淀。若蛋白质沉淀团较少，也可以用涡旋来打散沉淀团。

处理组织样品时，这一步得到的沉淀团会比较难于打散。建议把样品转移至 1.5ml 离心管中，然后用一次性研磨棒进行匀浆打散沉淀以提取产量。
17. 95°C 水浴 5 分钟溶解蛋白质，室温静置让样品恢复至室温。室温下， $12,000 \times g$ 离心 5 分钟去除不溶解的物质。
18. 转移上清液至新的 1.5ml 离心管中，然后保存于 4°C 或 -20°C，或用于 SDS-PAGE 电泳，或定量等。