

目 录

简 介	2
原 理	2
试剂盒组成	3
准备工作	4
保质期	4
样品的匀浆及打散	5
方案 1:细胞和动物组织 RNA 和蛋白质小量共提取	6
方案 2:细胞 RNA 和天然蛋白质共提取	10
常见问题回答	12

版本: 2010-01

简介

AllPure RNA and Protein Isolation Kits 是从培养细胞和动物组织样品同时抽提 RNA 和蛋白质最为快速简单的方法。本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，也无需进行耗时的醇类沉淀，整个过程只需 50 分钟。该方法得到的 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。该方法得到的蛋白质可直接用于 SDS-Page 电泳，Western 杂交等。

参数	RNA/Protein Kit	RNA/Nature Protein Kit
产品编号	R5212	R5213
细胞用量	1×10^7	5×10^6
组织用量	30 mg	—
结合力	50 μ g	50 μ g
RNA 洗脱体积	30-100 μ l	15-50 μ l
DNA 洗脱体积	50-100 μ l	30-50 μ l
蛋白质性质	变性蛋白质	天然蛋白质， 有功能和活性

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 RNA and Protein Isolation Kit 基于硅胶柱纯化方式。样品在含高浓度异硫氰酸胍裂解液中匀浆裂解，RNA 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 被保护起来。裂解液经离心去除不溶解的杂质，加入乙醇调节结合条件，转移至 RNA 柱子吸附 RNA，滤液被收集用于蛋白质抽提。RNA 柱子经 Buffer RM1 洗涤蛋白质和其它杂质，经 Buffer RW2 洗涤去除盐分，RNA 被 RNASE-Free Water (RNase Free Water)洗脱。滤液经蛋白质沉淀剂回收后，最后用合适的溶解液溶解。

组 成

AllPure RNA and Protein Kit

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 RL	10 ml	50 ml	150 ml
Buffer RW1	10 ml	50 ml	250 ml
Buffer RW2 *	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
RNase Free Water	1.8 ml	10 ml	30 ml
Buffer PR1	10 ml	60 ml	200 ml
Buffer PR2	7 ml	30 ml	150 ml
说明书	1	1	1

AllPure RNA and Nature Protein Kit

产品编号	R5213-01	R5213-02	R5213-03
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 RNP	10 ml	40 ml	180 ml
Buffer RL	10 ml	30 ml	150 ml
Buffer RW1	5 ml	50 ml	250 ml
Buffer RW2 *	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
RNase Free Water	1 ml	10 ml	30 ml
说明书	1	1	1

保质期

AllPure RNA and Protein Kits 可在室温下(15-25°C)干燥保存 18 个月。长期保存时需置于 2-8°C。低温下, Buffer RL 可能会有沉淀形成, 需 55°C 水浴让沉淀完全溶解后使用。因 RNase Free Water 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 RNase Free Water 并保存于-20°C, 以减少污染。若 RNase Free Water 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°C 灭菌 20-30 分钟。处理后, 分装保存于 2-8°C 或-20°C。灭菌后 RNase Free Water 有乙醇气味, 属于正常现象。

需要准备材料和工具

- 14.3M β -巯基乙醇(β -ME)或2M DTT: 使用前, 分装适量的Buffer RL, 每1 ml 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气味难闻, 毒性较强, 可用2 M DTT (Dithiothreitol)代替。用RNase Free Water或灭菌水配制2M DTT, 分装保存于-20°C。按1 ml Buffer RL加入10 μ l 2M DTT的比例配置混合液, 该混合液可于室温放置2天。(市售的 β -巯基乙醇就是14.3M)
- 70%乙醇: 用 RNase Free Water 配制。
- 无水乙醇(96-100%)
- 无 RNase 酶的 1.5ml 离心管、无 RNase 酶的枪头
- 手套
- (<15,000xg)小型离心机
- (可选: 膜上 DNASE 处理) DNase I Set (50preps, 货号 RS08)
- 准备合适的匀浆工具(参考下表)
- 用无水乙醇稀释 Buffer RW2, 并于室温保存。

样品的打散和匀浆

样品的打散及匀浆是所有 RNA 提取所必需的步骤。样品的打散是让组织或细胞块快速分散、细胞壁和细胞质膜破裂，从而使核酸释放到裂解液中。匀浆是指用适当的方法打断高分子量的基因组 DNA 和细胞内高分子量的物质，以降低溶液的粘稠度。打散和匀浆不充分都可能会导致 RNA 产量和纯度下降，还有可能引起柱子的堵塞。

A: 液氮处理

在用液氮处理样品的时候，请戴上手套并小心处理。切取适量的组织置于预冷的研钵中，迅速加入液氮，将组织研磨成粉末，然后将粉末倒入预冷的离心管中。（注意预先冷却离心管，否则样品倒入时，液氮沸腾而损失样品。）称重并加入适当的 ATL Buffer/ β -ME，涡旋混匀。由于液氮研磨只能起到打散样品的作用，所以最好再用注射器或机械匀浆器进行匀浆，以减低裂解液的粘稠度。

B: 机械匀浆器匀浆

机械匀浆器能高效匀浆大部分的组织和细胞。把样品置于合适的玻璃管或离心管中，加入裂解液，把探头插入裂解液中，高速间断匀浆，每次为 15-20 秒直至样品完全匀浆。使用机械匀浆器时，一般组织都可以在一分钟内达到理想的匀浆效果。大部分的机械匀浆器都带有不同大小的探头，小体积的裂解液适合使用较小的探头。

C: 玻璃珠

玻璃珠高速涡旋也能有效地裂解样品。细胞可用 0.4-0.6mm 酸洗玻璃珠，细菌可用 0.1-0.2mm 酸洗玻璃珠。把样品转移至离心管中，加入适量的玻璃珠，再加入 ATL Buffer，高速涡旋 5-10 分钟。最好采用珠磨器，如 Fastprep-24(MP)等。珠磨效果取决于样品的大小、细胞壁厚度以及珠磨器功率，详细的操作应根据仪器进行调整。

D: 玻璃匀浆器

玻璃匀浆器是常用的匀浆工具。能有效处理软组织如肝脏、脾脏、肾、脑等。把样品和适量的裂解液转移至玻璃匀浆器中，上下推磨直至组织块被充分打散。由于玻璃匀浆器只能起到打散样品的作用，所以最好再用注射器匀浆几次，以减低裂解液的粘稠度。

E: 注射器

处理培养细胞或小量动物柔软组织，如脑、胚胎等可用小型注射器(带 20#针头)进行抽打。此外，小型注射器还可以同时打断基因组 DNA 和其它高分子物质，起到降低裂解液的粘稠度的作用。注射器匀浆方式是处理细胞最常用的方法。

方案 1. 细胞和动物软组织总 RNA 和蛋白质小量提取(R5212)

该方案适合于从 $\leq 1 \times 10^6$ 个真核培养细胞， $\leq 30\text{mg}$ 动物软组织，如肝脏、脾脏、肾脏，脑等，以及 100mg 植物或真菌样品中提取高达 $150\mu\text{g}$ 总 RNA 总蛋白质。酵母和细菌也可以使用，但必须先使用破壁酶或溶菌酶去除细胞壁再进行抽提。

细胞用量

为得到理想的产量和纯度，细胞的用量必须合理。试剂盒的细胞用量可低至 100 个细胞，但最大的用量取决于样品中 RNA 的含量、柱子的结合能力和裂解液的用量。不同的细胞，其 RNA 的含量变化很大。例如：

- COS 细胞含有丰富 RNA (1×10^6 细胞有 $\sim 35\mu\text{g}$)。细胞用量 $\leq 3 \times 10^6$ 个。
- HeLa 细胞含有中丰度 RNA (1×10^6 细胞约有 $15\mu\text{g}$)。细胞用量 $\leq 7 \times 10^6$ 个。
- NIH/3T3 细胞含低丰度 RNA (1×10^6 细胞约有 $10\mu\text{g}$)。用量 $\leq 1 \times 10^7$ 个。

若不知道细胞 RNA 含量，推荐起始用量应为 5×10^6 个细胞。再根据得到的产量和纯度，来调整下一次提取时细胞的用量。但不论何种情况，细胞用量都不要超过 1×10^7 。

组织用量

正确的组织用量是获得理想 RNA 产量和纯度的关键。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 $\leq 20\text{mg}$ 。
- 脾脏、胸腺组织含大量 DNA，裂解液非常粘稠，组织用量不能太多 $\leq 10\text{mg}$ 。
- 植物或真菌样品，含量比较复杂，组织用量 $\leq 100\text{mg}$ 。

细胞的收集

- **悬浮细胞：**计算细胞数量。取适量的培养液至离心管中， $300 \times g$ 离心 5 分钟收集细胞。吸弃培养液，按第 1 步进行操作。
- **贴壁细胞：**贴壁细胞可在培养瓶/皿中直接裂解；也可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 $0.1\text{-}0.25\%$ 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， $300 \times g$ 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和抑制裂解，而影响 RNA 完整性和产量。

培养细胞

1. 加入适量的 Buffer RL/ β -ME，打散细胞。

离心收集的细胞：弹打或涡旋松散细胞沉淀团，根据细胞数量加入适量的 Buffer RL/ β -ME。涡旋或吸打打散细胞。

- $\leq 5 \times 10^6$ 细胞：加入 350 μ l Buffer RL/ β -ME。
- $\geq 5 \times 10^6$ 细胞：加入 600 μ l Buffer RL/ β -ME。

直接裂解：彻底吸弃培养液后，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，并转移至离心管中。

- 6 cm 直径的培养皿：加入 350 μ l Buffer RL/ β -ME
- 6-10 cm 直径的培养皿：加入 600 μ l Buffer RL/ β -ME

2. 匀浆(任选一种方案)，然后按第 3 步进行操作。

- 用带转头的机械匀浆器匀浆 30 秒。
- 用一次性#20 号针头的注射器抽打裂解液至少 5 次。

动物组织

1. 组织的裂解和匀浆：

- ≤ 15 mg 动物组织：使用 350 μ l Buffer RL/ β -ME。
- 15-30mg 动物组织：使用 600 μ l Buffer RL/ β -ME。
- 50-100mg 植物/真菌组织：使用 600 μ l Buffer RL/ β -ME。

选择合适的匀浆工具进行匀浆，详细参照第 5 页的‘样品的打散及匀浆’。

2. 14,000 x g 离心 5 分钟。按第 3 步进行操作。

总 RNA 抽提

3. 把 gDNA Filter Mini Column 装在 2ml 收集管中。转移第 2 步的裂解液或上清液至 DNA 柱子中。14,000 x g 离心 2 分钟。

4. 加入等倍体积的 70%乙醇至滤液中。用移液枪吸打 3-5 次。

注：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 Mini Column 装在 2ml 收集管中。转移 $\leq 700\mu$ l 混合液至 RNA

- 柱子中。**10,000 × g 离心 30-60 秒。收集滤液并转移至 2ml 离心管中。
- (可选:混合液超过 700µl) 把柱子装回收集管中。**把剩余混合液转移至 RNA 柱子中。**10,000 × g 离心 30-60 秒。收集滤液并转移至同一个 2ml 离心管中。按第 16-28 步进行蛋白质抽提。
 - 把柱子装回收集管中。**加入 500µl Buffer RW1 至柱子中。**10,000 × g 离心 30-60 秒。
 - 倒弃流出液, 把柱子装回收集管中。**加入 500µl Buffer RW2(己用乙醇稀释) 至柱子中。**10,000 × 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。
 - 倒弃流出液, 把柱子装回收集管中。**加入 500µl Buffer RW2(己用乙醇稀释) 至柱子中,** 10,000 × g 离心 30-60 秒。
 - 倒弃流出液, 把柱子装回收集管中。10,000 × g 离心空柱 2 分钟甩干柱子。
 - 把柱子装在新的 1.5ml 离心管中。**加入 30-50µl DEPC 水至柱子的膜中央。**室温静置 2 分钟。10,000 × g 离心 1 分钟。
 - (可选)再加入 30-50µl DEPC 水至柱子的膜中央。**室温静置 2 分钟。10,000 × g 离心 1 分钟。
HiPure RNA Mini Column 最小的洗脱体积是 30µl, 小于 30µl 会导致 RNA 的洗脱效率下降。如果 RNA 产量超过 20µg, 推荐再加入 30-50µl DEPC 水至柱子中, 进行第二次洗脱。
 - 弃去 RNA 柱子, 把 RNA 保存于-80°C。

蛋白质抽提

- 取第 5-6 步获得的滤液, 加入 4 倍体积冰冷的丙酮或等倍体积 Buffer PR1。**涡旋混匀 30 秒。
丙酮沉淀有利于蛋白质的溶解。
- 室温静置 10 分钟。
- 室温下, 12,000 × g 离心 10 分钟离心沉淀蛋白。
- 小心倒弃上清液。加入 1ml 70%乙醇, 涡旋混匀。

18. 室温下， $12,000 \times g$ 离心 3 分钟。小心倒弃上清液。
19. 短暂离心，彻底吸弃残留的乙醇。空气干燥 5-10 分钟。
20. **加入 100-500 μ l Buffer PR2(5% SDS)或其它缓冲液至沉淀中。**

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。用 5% SDS 或 8M Urea 让蛋白质的溶解，其它缓冲液也可以使用。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。
21. **用研磨棒或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。
22. **95 $^{\circ}$ C 水浴 5 分钟溶解蛋白质。**
23. 室温静置让样品恢复至室温。
24. 室温下， $12,000 \times g$ 离心 5 分钟去除不溶解的物质。
25. 转移上清液至新的 1.5ml 离心管中。
26. 放置 4 $^{\circ}$ C 或 -20 $^{\circ}$ C，或用于 SDS-PAGE 电泳，或定量等。

方案 2. 细胞总 RNA 和天然蛋白质共提取 (R5213)

该方案适合于从 $\leq 5 \times 10^6$ 个真核培养细胞样品中提取高达 50 μ g 总 RNA 和天然的总蛋白质。以下离心均在室温下进行。

1. 细胞的收集

- **悬浮细胞:** 300 \times g 离心 5 分钟收集细胞。用 PBS 洗涤一次。
- **贴壁细胞:** 吸弃培养液。用 PBS 洗涤一次。

2. 加入适量的 Buffer RNP 至细胞沉淀团。

- $>1 \times 10^6$ 个培养细胞, 加入 500 μ l Buffer RNP
- 12 孔培养板, 每孔加入 200 μ l Buffer RNP
- 24 孔培养板, 每孔加入 150 μ l Buffer RNP
- 48 孔培养板, 每孔加入 100 μ l Buffer RNP
- 96 孔培养板, 每孔加入 50 μ l Buffer RNP

注: 根据样品和所需的蛋白质, 可以加入适量的蛋白酶抑制剂至 Buffer RNP 中。

3. 用移液枪吸打 5~10 次混匀, 室温静置 5 分钟。

4. 把 gDNA Filter Mini Column 装在 2ml 收集管中。**转移第 3 步获得的裂解液至柱子中。**10,000 \times g 离心 1 分钟。把滤液保存下来用于天然蛋白质制备。

总 RNA 抽提

5. 加入 350 μ l Buffer RL 至 gDNA Filter Mini Column 柱子。静置 5 分钟。10,000 \times g 离心 1 分钟。丢去 gDNA 柱子。

6. 加入等倍体积的 70%乙醇至滤液中。吸打混匀 3~5 次。

7. 把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。**转移混合液至柱子中。**10,000 \times g 离心 30-60 秒。

8. 倒弃流出液, 把柱子重新装回收集管中。**加入 500 μ l Buffer RW1 至柱子中。**10,000 \times g 离心 30-60 秒。

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

注: 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所示进行稀释。

10. 倒弃流出液，把柱子重新装回收集管中。**加入 500 μ l Buffer RW2 至柱子中**，10,000 \times g 离心 30-60 秒。
11. 倒弃流出液，把柱子重新装回收集管中。13,000 \times g 离心空柱 3 分钟，以甩干柱子的基质。
12. 把 RNA 柱子装在新的 1.5ml 离心管中。**加入 15~50 μ l DEPC 水至柱子的膜中央**。室温静置 2 分钟。13,000 \times g 离心 1 分钟。
13. 弃去 RNA 柱子，把 RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。

蛋白质抽提

14. 取第 4 步获得的滤液，采用脱盐柱（Sephedex G-50）或丙酮沉淀回收进行蛋白质的纯化(任选一种进行操作)。

A. 丙酮沉淀回收

15. 加入 4 倍体积的冰冷的丙酮至滤液中。颠倒混匀 30 秒。
16. 冰上放置 15~30 分钟。
17. 4 $^{\circ}$ C, 12,000 \times g 离心 10 分钟。小心倒弃上清液。室温干燥 5-10 分钟
18. 加入适量的缓冲液溶解蛋白质沉淀。缓冲液的类型取决于下游的应用，如 Buffer PBS、灭菌水、SDS 溶液等。

B. 脱盐纯化

15. 按分子克隆指南制备 Sephedex G-50。
16. 按滤液的 10-20 倍体积准备 Sephedex G-50 脱盐柱。
17. 把滤液转移至脱盐柱中。
18. 离心脱盐即可。

常见问题回答

该列表可能有利于您解决在提取过程中所碰到的问题。Magen 技术人员可随时为您提供咨询服务，若您对试剂盒存在疑问或有良好的建议，又或者您在分子生物学实验中碰到问题，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	
样品不充分打散或匀浆	参照样品的打散及匀浆，提高样品的裂解效果； 减少样品的用量或增加裂解液 RTL 的用量和延长匀浆时间； 若样品含有丰富的蛋白质，推荐使用 HiPure Tissue RNA Kit。
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必要条件；
裂解液加入乙醇之前，需要离心	处理组织，酵母和、细菌时，裂解液在加入乙醇之前需要离心去除不溶的杂质。沉淀中含有细胞碎片会引起柱子的堵塞。处理某些组织样品时，离心后裂解液表面还可能会有一层脂类层，转移上清液尽量不要吸到这些物质。
RNA 产物中 DNA 污染	
样品用量太多或样品中基因组 DNA 含量丰富	有些细胞或组织含有丰富的基因组 DNA。减少组织或细胞的用量。进行 DNase 膜上处理彻底去除 DNA。
下游实验结果不理想	
盐分污染	加入 Buffer RW2 后，静置 5 分钟后，再离心
乙醇污染	确保空柱离心速度高于或等于 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。脱落到质粒中硅胶膜是不溶解的，可能过 12,000xg 离心 2 分钟去除。

若以上的解答还是无法解决您的问题，请您联系我们。