

目 录

简 介	2
原 理	2
试剂盒组成	3
保质期	4
准备工作	5
样品的匀浆及打散	6
方案 1:细胞和动物组织 RNA 和 DNA 小量共提取	7
方案 2:细胞和动物组织 RNA 和 DNA 微量共提取	11
方案 3:细胞和动物组织 RNA 和 DNA 痕量共提取	15
方案 4:细胞和动物组织 RNA 和 DNA 高通量共提取	18
常见问题回答	20

版本: 2011-01

简介

AllPure DNA/RNA Isolation Kits 是从培养细胞、动物组织或植物真菌样品同时抽提 RNA 和 DNA 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 35 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。得到的 DNA 可直接用于 PCR, Southern 杂交等。该产品系列提供四种产品供用户选择。

参数	Mini Kit	Micro Kit	96 Kit	Fibrous Kit
产品编号	R5111	R5112	R5113	R5114
细胞用量	1 × 10 ⁷	1 × 10 ⁶	5 × 10 ⁶	1 × 10 ⁷
组织用量	30mg	≤5mg	10mg	20mg
组织类型	软组织(肝脏,肾脏,脾脏,性腺,肠,脑组织等), 植物, 细菌, 酵母等			难裂解组织(肌肉, 皮肤,心脏等)
柱子结合力	150µg	100µg	100µg	150µg
RNA 洗脱体积	30-100µl	10-30µl	50-75µl	30-100µl
DNA 洗脱体积	50-100µl	30-50µl	50-100µl	50-100µl

原理

HiPure 硅胶柱是采用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，可通过氢键和静电吸附核酸，而蛋白质或其它杂质不被吸附而去除。吸附了核酸的滤膜经洗涤去除蛋白质和盐，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 DNA and RNA Isolation Kits 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 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。裂解液经离心去除不溶解的杂质，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 DW1 和 Buffer RW1 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 Elution Buffer 洗脱。

组 成

AllPure DNA and RNA Mini Kit

产品编号	R5111-01	R5111-02	R5111-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns	10	50	250
HiPure DNA Mini Columns	10	50	250
2ml Collection Tubes	20	100	500
Buffer RL	10 ml	50 ml	200 ml
Buffer DW1	10 ml	30 ml	150 ml
Buffer RW1	10 ml	50 ml	250 ml
Buffer RW2*	5 ml	2 x 20 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

AllPure Total DNA/RNA Micro Kit

产品编号	R5112-01	R5112-02	R5112-03
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	5 ml	30 ml	120 ml
Buffer DW1	10 ml	30 ml	150 ml
Buffer RW1	10 ml	50 ml	250 ml
Buffer RW2*	5 ml	2 x 20 ml	3 x 50 ml
Carrier RNA	-	310 µg	3x310 µg
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

组 成

AllPure Total DNA/RNA Nano Kit

产品编号	R5112-01B	R5112-02B	R5112-03B
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Nano Columns	10	50	250
HiPure DNA Nano Columns	10	50	250
2ml Centrifuge Tubes	20	100	500
Proteinase K	12 mg	12 mg	60 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	1.8 ml	5 ml
Buffer RTL	5 ml	15 ml	60 ml
RNA Digestion Buffer	1.5 ml	10 ml	30 ml
Buffer VHB	6.6 ml	22 ml	110 ml
Buffer RW2*	6 ml	50 ml	2 x 50 ml
Carrier RNA	-	310 µg	3 x 310 µg
RNase Free Water	1.8 ml	1.8 ml	30 ml
说明书	1	1	1

组 成

AllPure DNA/RNA 96 Kit

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
2ml Collection Plate	2	8	40
Buffer RL	50 ml	200 ml	2 x 500 ml
Buffer DW1	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 质 期

AllPure DNA/RNA Isolation Kits 除 Proteinase K 和 Carrier RNA 外，其它组分可在室温下 (15-25℃)干燥保存 18 个月。长期保存时需置于 2-8℃。Carrier RNA 干粉和 Proteinase K 干粉采用室温运输，收到产品后，把 Proteinase K/Carrier RNA 保存于-20℃。低温下，Buffer RL 可能会有沉淀形成，55℃水浴让沉淀完全溶解。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 DEPC 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(DTT)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/DTT混合液可室温稳定放置1个星期。DTT 气味难闻, 毒性较强, 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。(市售的 β -巯基乙醇就是14.3M)
- ⌒ 70%乙醇或 50%乙醇: 用 DEPC 处理水配制。
- ⌒ 无水乙醇(96-100%)
- ⌒ 无 RNase 酶的 1.5ml 离心管
- ⌒ 无 RNase 酶的枪头
- ⌒ 手套
- ⌒ (可选: 膜上 DNASE 处理) DNase On Column Kit (50preps, 货号 R4911-01)
- ⌒ 准备合适的匀浆工具(参考下表)
- ⌒ 用无水乙醇稀释 Buffer RVW2, 并于室温保存。
- ⌒ 溶解 Proteinase K: 加入适量的 Dissolve Buffer 至 Proteinase K 管中, 使其终浓度为 20mg/ml。轻轻颠倒 10-15 次混匀。分装保存于-20 $^{\circ}$ C。
- ⌒ 溶解 Carrier RNA:加入适量的 RNase Free Water 至 Carrier RNA 干粉中, 使其终浓度为 1 μ g/ μ l。涡旋使 Carrier RNA 充分溶解。分装保存于-80 $^{\circ}$ C。Carrier RNA 反复解冻的次数不要超过 5 次。

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

在处理液氮的时候，请戴上手套并小心处理。切出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 Buffer RL/DTT，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 and 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 Buffer RL，高速涡旋 5-10 分钟。最好采用珠磨机，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机功率，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分散。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

处理培养细胞或少量动物柔软组织，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. 细胞和组织总 RNA 和 DNA 小量提取(R5111)

该方案适合于从 $\leq 1 \times 10^7$ 个真核培养细胞和 $\leq 30\text{mg}$ 动物软组织，如肝脏、脾脏、肾脏，脑等，以及 $\leq 100\text{mg}$ 植物或真菌样品中提取高达 $150\mu\text{g}$ 总 RNA 和 $30\mu\text{g}$ 总 DNA。动物组织如肌肉，皮肤，心脏富含高分子量的肌纤维，需按方案 3（第 15 页）进行操作。以下离心均在室温下进行。

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 细胞含有丰富的 RNA (1×10^6 细胞约有 $35\mu\text{g}$)。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 $10\mu\text{g}$)。细胞用量 $\leq 1 \times 10^7$ 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 $\leq 15\text{mg}$ 。
- 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， $300 \times g$ 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/DTT，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/DTT。涡旋或吸打打散细胞。

- $\leq 5 \times 10^6$ 细胞：加入 350 μ l Buffer RL/DTT。
- $\geq 5 \times 10^6$ 细胞：加入 700 μ l Buffer RL/DTT。

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/DTT
- 6-10 cm 直径的培养皿：加入 700 μ l Buffer RL/DTT

2. 进一步匀浆(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/DTT。
- 15-30mg 动物组织：使用 700 μ l Buffer RL/DTT。
- 50-100mg 植物/真菌组织：使用 700 μ l Buffer RL/DTT。

选择合适的匀浆工具进行匀浆，详细参照第 7 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。

处理某些样品，如脑组织，离心后溶液表面会漂浮一层脂类。转移上清时，尽量不要吸到这一层物质(脂类物质)。脂类会造成 RNA 产量下降，还可能引起柱子堵塞。

过柱吸附 DNA

3. 把 HiPure DNA 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. 保留 HiPure DNA Mini Column，按第 15-21 步进行 DNA 抽提。

处理某些组织时，裂解液可能会非常粘稠而引起柱子堵塞，此时可提高离心速度或延长离心时间至所有裂解液都完全流出。

总 RNA 抽提

5. **加入等体积的 70%乙醇至滤液中**，用移液枪吸打 3~5 次。
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，70%乙醇或 50%必须用 DEPC 水配制。
6. 把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。**转移 \leq 700 μ l 混合液至 RNA 柱子中**。10,000 \times g 离心 30~60 秒。
7. (可选:混合液超过 700 μ l) 倒弃流出液，把柱子装在收集管中。**把剩余混合液转移至 RNA 柱子中**。10,000 \times g 离心 30~60 秒。
8. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。**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。
10. 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。
11. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。13,000 \times g 离心空柱 2 分钟甩干柱子。
12. 把柱子装在新的 1.5ml 离心管中。**加入 30~50 μ l RNase Free Water 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。
注：HiPure RNA Mini Column 最小的洗脱体积是 30 μ l，小于 30 μ l 会导致 RNA 的洗脱效率下降。如果 RNA 产量超过 20 μ g，推荐再加入 30-50 μ l DEPC 水至柱子中，进行第二次洗脱。

DNA 抽提

14. 取 HiPure DNA Mini Column(第 4 步)装在 2ml 收集管中。**加入 500 μ l Buffer DW1 至柱子中，静置 2 分钟**。10,000 \times g 离心 30~60 秒。
15. 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。

16. 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。
17. 倒弃流出液，把柱子套回空的收集管。13,000 \times g 离心空柱 2 分钟，以甩干柱子的基质。
18. 将 DNA 柱子装在 1.5ml 离心管中。加入 30~50 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Elution Buffer 至柱子的膜中央。室温静置 3 分钟。13,000 \times g 离心 1 分钟。
19. 再加入 30~50 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Elution Buffer 至柱子的膜中央。室温静置 3 分钟。13,000 \times g 离心 1 分钟。
20. 弃去 DNA 柱，把 DNA 保存于 2~8 $^{\circ}$ C 或-20 $^{\circ}$ C。

方案 2. 细胞和动物软组织总 RNA 和 DNA 微量共提取(R5112)

该方案适合于从 $\leq 1 \times 10^6$ 个真核培养细胞和 $\leq 5\text{mg}$ 动物组织中提取总 RNA。以下离心均在室温下进行。

细胞的收集

- **悬浮培养细胞。**计算细胞数量。300xg 离心 5 分钟收集细胞。小心吸弃培养液，按第 1 步进行操作。

注：培养液须彻底去除，培养液会稀释裂解液和抑制裂解，而影响 RNA 完整性和产量。

- **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。

注：培养液须彻底去除，培养液会稀释裂解液和抑制裂解，而影响 RNA 完整性和产量。

胰酶消化处理：计算细胞数量。吸弃培养液，PBS 清洗细胞，吸弃 PBS，再加入含 0.1-0.25%胰酶 (Trypsin) 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 x g 离心 5 分钟。彻底吸弃溶液，并按第 1 步进行操作。

Carrier RNA 的用途：

若处理 $\leq 100\mu\text{g}$ 的动物组织或 ≤ 5000 个培养细胞时，Carrier RNA 须加到 Buffer RL/DTT 至终浓度为 $4\text{ng}/\mu\text{l}$ 。Carrier RNA 起着两个作用。首先，Carrier RNA 能提高微量的 RNA 的回收效率；其次是起保护 RNA 的作用。该混合液可在 2-8℃ 稳定放置 2 天。举例：加入 $4\mu\text{l}$ Carrier RNA 至 1ml Buffer RL/DTT 中。由于 Carrier RNA 为 Poly A，可能会对 Oligo(dT)的反转录体系有一定的抑制作用，可酌情调整 Carrier RNA 的用量。

培养细胞

1. **加入适量的 Buffer RL/DTT，打散细胞。**

离心收集的细胞：先弹打或涡旋使细胞松散，然后加入适量的 Buffer RL/DTT。涡旋或吸打打散细胞。

- $\leq 1 \times 10^6$ 细胞：加入 $350\mu\text{l}$ Buffer RL/DTT
- $\leq 1 \times 10^5$ 细胞：加入 $100\mu\text{l}$ Buffer RL/DTT

贴壁细胞的直接裂解：彻底吸弃培养液后，往培养瓶/皿中加入适量的 Buffer RL。用枪吹打使细胞从壁上脱落，收集裂解液，并转移至离心管中。

- 6cm 直径的培养皿：加入 $350\mu\text{l}$ Buffer RL/DTT

- 处理 $\leq 1 \times 10^5$ 细胞的多孔板：加入 100 μ l Buffer RL/DTT
2. **进一步匀浆**(任选一种方案), 然后按步骤 3 进行操作。
 - 用带转头的机械匀浆器匀浆 30 秒;
 - 用一次性的#20 号针头的注射器抽打裂解液至少 5 次;
 - 处理 ≤ 5000 细胞时, 只需高速涡旋 1 分钟;

动物组织

1. **组织的裂解和匀浆**: 把样品放置于离心管中, 加入 350 μ l Buffer RL/DTT。选择合适的匀浆工具进行匀浆, 详细参照‘样品的打散及匀浆’。
2. **14,000 x g 离心 3 分钟**, 然后按步骤 3 进行操作。

处理某些样品时, 如脑组织等, 离心后溶液表面会有脂类层, 转移上清时, 尽量不要吸到。脂类会造成 RNA 产量下降, 还可能引起柱子堵塞。

过柱吸附 DNA

3. 把 HiPure DNA Mini Columns I 装在 2ml 收集管中。**转移第 2 步的裂解液或上清液至 gDNA 柱子中**。10,000 x g 离心 30~60 秒。
4. 把 HiPure DNA Mini Columns I 保存于室温或 2-8°C。按第 13-19 步进行 DNA 抽提。

总 RNA 抽提

5. **加入等体积的 70%乙醇至滤液中**, 用移液枪吸打 3~5 次。

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, 70%乙醇或 50%必须用 DEPC 水配制。
6. 把 HiPure RNA Mini Columns I 装在 2ml 收集管中。**转移混合液至 RNA 柱子中**。10,000 x g 离心 30~60 秒。
7. 倒弃流出液, 把柱子装回收集管中。**加入 500 μ l Buffer RW1 至柱子中**。10,000 x g 离心 30~60 秒。
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 x 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，把柱子装回收集管中。13,000 \times g 离心空柱 3 分钟，以甩干柱子的基质。
11. 把 RNA 柱子装在 1.5ml 离心管中。**加入 15~30 μ l RNase Free Water 至柱子的膜中央。**室温静置 1 分钟。13,000 \times g 离心 1 分钟。
12. 弃去 RNA 柱子，把 RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。
HiPure RNA Mini Columns I 最小的洗脱体积是 10 μ l，小于 10 μ l 会导致 RNA 的洗脱效率下降。如果 RNA 产量超过 10 μ g，推荐再加入 10~30 μ l DEPC 水至柱子中，进行第二次洗脱。

DNA 抽提

13. 取 HiPure DNA Mini Columns I(第 4 步)装在 2ml 收集管中。**加入 500 μ l Buffer DW1 至柱子中。**10,000 \times g 离心 30~60 秒。
14. 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。
15. 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。
16. 倒弃流出液，把柱子套回空的收集管。13,000 \times g 离心空柱 3 分钟甩干柱子。
17. 将 DNA 柱子装在 1.5ml 离心管中。**加入 15~30 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Elution Buffer 至柱子的膜中央。**室温静置 3 分钟。13,000 \times g 离心 1 分钟。
18. **再加入 15-30 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Elution Buffer 至柱子的膜中央。**室温静置 3 分钟。13,000 \times g 离心 1 分钟。
19. 弃去 DNA 柱，把 DNA 保存于 2~8 $^{\circ}$ C 或-20 $^{\circ}$ C。

方案 3? 细胞和动物软组织总 RNA 和 DNA 痕量共提取(R5112B)

该方案适合于从 $\leq 1 \times 10^3$ 个真核培养细胞和 $\leq 0.5\text{mg}$ 动物组织中提取总 RNA，以下离心均在室温下进行。

细胞的收集

- **悬浮培养细胞。**计算细胞数量。300 x g 离心 5 分钟收集细胞。小心吸弃培养液，按第 1 步进行操作。

注：培养液须彻底去除，培养液会稀释裂解液和抑制裂解，而影响 RNA 完整性和产量。

- **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。

注：培养液须彻底去除，培养液会稀释裂解液和抑制裂解，而影响 RNA 完整性和产量。

胰酶消化处理：计算细胞数量。吸弃培养液，PBS 清洗细胞，吸弃 PBS，再加入含 0.1-0.25%胰酶 (Trypsin) 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 x g 离心 5 分钟。彻底吸弃溶液，并按第 1 步进行操作。

Carrier RNA 的用途：

若处理 $\leq 100\mu\text{g}$ 的动物组织或 ≤ 5000 个培养细胞时，Carrier RNA 须加到 Buffer RTL/DTT 至终浓度为 $4\text{ng}/\mu\text{l}$ 。Carrier RNA 起着两个作用。首先，Carrier RNA 能提高微量的 RNA 的回收效率；其次是起保护 RNA 的作用。该混合液可在 2-8℃ 稳定放置 2 天。举例：加入 4 μl Carrier RNA 至 1ml Buffer RL/DTT 中。由于 Carrier RNA 为 Poly A，可能会对 Oligo(dT)的反转录体系有一定的抑制作用，可酌情调整 Carrier RNA 的用量。

培养细胞

1. **加入适量的 Buffer RTL/DTT，打散细胞。**

离心收集的细胞：先弹打或涡旋使细胞松散，然后加入适量的 Buffer RL/DTT。涡旋或吸打打散细胞。

- $\leq 1 \times 10^3$ 细胞：加入 200 μl Buffer RTL/DTT

贴壁细胞的直接裂解：彻底吸弃培养液后，往培养瓶/皿中加入适量的 Buffer RTL。用枪吹打使细胞从壁上脱落，收集裂解液，并转移至离心管中。

- 处理 $\leq 1 \times 10^3$ 细胞的多孔板：加入 200 μl Buffer RTL/DTT

2. 用移液枪反复吸打 3~5 次。

动物组织

1. **组织的裂解和匀浆：**把样品放置于离心管中，加入 200 μ l Buffer RTL/DTT。
2. 用移液枪反复吸打 5~10 次。

过柱吸附 DNA

3. 加入 100 μ l RNA Digestion Buffer 和 10 μ l Proteinase K 至样品，涡旋混匀，室温放置 15~20 分钟。
4. 把 HiPure DNA Nano Columns 装在 2ml 收集管中。**转移第 3 步消化液至 DNA 柱子中。**8,000 \times g 离心 30~60 秒。
5. 把 HiPure DNA Nano Columns 保存于室温或 2-8 $^{\circ}$ C。按第 13-18 步进行 DNA 抽提。

总 RNA 抽提

6. **加入 200 μ l 无水乙醇至滤液中，**用移液枪吸打 3~5 次。
7. 把 HiPure RNA Nano Columns 装在 2ml 收集管中。**转移混合液至 RNA 柱子中。**8,000 \times g 离心 30~60 秒。
8. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。**加入 300 μ l Buffer VHB 至柱子中。**8,000 \times g 离心 30~60 秒。
9. 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。
10. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。10,000 \times g 离心空柱 3 分钟，以甩干柱子的基质。
11. 把 RNA 柱子装在 1.5ml 离心管中。**加入 10~30 μ l RNase Free Water 至柱子的膜中央。**室温静置 1 分钟。10,000 \times g 离心 1 分钟。
12. 弃去 RNA 柱子，把 RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。

DNA 抽提

13. 取 HiPure DNA Nano Columns I(第 4 步)装在 2ml 收集管中。**加入 300 μ l Buffer VHB 至柱子中。**8,000 \times g 离心 30~60 秒。
14. 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。
15. 倒弃流出液，把柱子套回空的收集管。13,000 \times g 离心空柱 3 分钟甩干柱子。
16. 将 DNA 柱子装在 1.5ml 离心管中。**加入 10~15 μ l 预热至 55 $^{\circ}$ C RNase Free Water 至柱子的膜中央。**室温静置 3 分钟。13,000 \times g 离心 1 分钟。
17. **再加入 10-15 μ l 预热至 55 $^{\circ}$ C RNase Free Water 至柱子的膜中央。**室温静置 3 分钟。13,000 \times g 离心 1 分钟。
18. 弃去 DNA 柱，把 DNA 保存于 2~8 $^{\circ}$ C 或-20 $^{\circ}$ C。

方案 4. 细胞和动物软组织总 RNA 和 DNA 高通量提取(R5113)

该方案采用 96 孔结合板可高通量地从 96 个 $\leq 5 \times 10^6$ 个真核培养细胞和小于 10mg 动物软组织，如肝脏、脾脏、肾脏等样品中提取高达 50 μ g 总 RNA 和 DNA。以下离心均在室温下进行。

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 细胞含有丰富的 RNA (1 $\times 10^6$ 细胞约有 35 μ g)。细胞用量 $\leq 2 \times 10^6$ 个。
- HeLa 细胞含有中丰度 RNA (1 $\times 10^6$ 细胞有 15 μ g)。细胞用量 $\leq 4 \times 10^6$ 个。
- NIH/3T3 细胞含低丰度 RNA (1 $\times 10^6$ 细胞约有 10 μ g)。细胞用量 $\leq 5 \times 10^7$ 个。

若不知道细胞 RNA 含量，推荐起始用量应为 2×10^6 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 5×10^6 。

组织用量

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 ≤ 10 mg。
- 脾脏、胸胰组织含大量 DNA，裂解液非常粘稠，组织用量不能太多 ≤ 8 mg。
- 植物、真菌组织样品，用量 ≤ 50 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，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，残留培养液会稀释裂解液，而影响 RNA 完整性和产量。

培养细胞

1. 加入适量的 Buffer RL/DTT，打散细胞。

离心收集的细胞：涡旋松散细胞团，加入 350 μ l Buffer RL/DTT。涡旋或吸打打散细胞。

直接裂解：彻底吸弃培养液，向培养瓶或培养皿中加入 350 μ l Buffer RL/DTT，用

移液枪吸打使细胞从壁上脱落。

2. 涡旋混匀或振荡混匀 1 分钟，然后按第 3 步进行操作。

动物组织

1. **组织的裂解和匀浆：加入 350 μ l Buffer RL/DTT 至 10-15mg 组织样品中。**
选择合适的匀浆工具进行匀浆，详细参照第 6 页的‘样品的打散及匀浆’。
2. 室温静置 10 分钟，然后第 3 步进行操作。

过柱吸附 DNA

3. 把 HiPure gDNA Plate 装在 2ml 收集板中。**把裂解液转移至 gDNA 柱子中。**
5,000rpm 离心 5 分钟。
4. 保留 DNA 结合板，并按第 14~20 步抽提 DNA。

总 RNA 的提取

5. **加入等倍体积 70%乙醇至滤液中，振荡混匀 1 分钟。**
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。
6. 把 HiPure RNA Plate 装在 2ml 收集板中。**转移混合液至 RNA 结合板中。**5,000rpm 离心 5 分钟，倒弃滤液。
7. 把 RNA 结合板装回在 2ml 收集板中。**加入 700 μ l Buffer RW1 至结合板上。**
5,000rpm 离心 5 分钟，倒弃滤液。
8. 把 RNA 结合板装回 2ml 收集板中。**加入 700 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至结合板中。**5,000 rpm 离心 5 分钟，倒弃滤液。
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。
9. 把 RNA 结合板装回 2ml 收集板中。**加入 700 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至结合板中。**5,000rpm 离心 5 分钟，倒弃滤液。
10. 把 RNA 结合板装在 2ml 收集板中。5,000rpm 离心 10 分钟以甩干柱子的基质。
这一步可彻底去除柱子中残留的乙醇。
11. 把 RNA 结合板装在合适的收集板(另配)中。**加入 50-75 μ l DEPC 水至柱子膜中央。**
室温静置 2 分钟。5,000rpm 离心 5 分钟。
12. **(可选) 再加入 50-75 μ l DEPC 水至柱子膜中央。**室温静置 2 分钟。5,000 rpm

离心 5 分钟。

13. 弃去 RNA 结合板，把 RNA 保存于-80°C。

HiPure RNA Plate 最小的洗脱体积是 50 μ l，小于 50 μ l 会导致 RNA 的洗脱效率下降。若 RNA 产量超过 15 μ g，推荐进行第二次洗脱。若需要获得最高浓度，建议每次用 75 μ l 洗脱。

DNA 纯化

14. 把 gDNA 结合板装在 2ml 收集板中。**加入 700 μ l Buffer DW1 至 gDNA 结合板上。**5,000rpm 离心 5 分钟，倒弃滤液。
15. 把 gDNA 结合板装在 2ml 收集板中。**加入 700 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释) 至 gDNA 结合板上。**5,000 rpm 离心 5 分钟，倒弃滤液。
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。
16. 把 gDNA 结合板装在 2ml 收集板中。**加入 700 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释) 至 gDNA 结合板上**5,000 rpm 离心 5 分钟，倒弃滤液。
17. 把 gDNA 结合板装在 2ml 收集板中。5,000rpm 离心 15 分钟，以甩干柱子的基质。这一步可彻底去除柱子中残留的乙醇。
18. 把 gDNA 结合板装在合适的收集板(另配)中。**加入 75-100 μ l 预热至 70°C Elution Buffer 至柱子膜中央。**室温静置 3 分钟。5,000rpm 离心 5 分钟。
19. **(可选)再加入 75-100 μ l DEPC 水至柱子膜中央。**室温静置 3 分钟。5,000 rpm 离心 5 分钟。
20. 弃去 DNA 结合板，把 DNA 保存于 2~8 °C 或-20°C。

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 的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，或您在分子生物学碰到问题，都请您联系我们。我们将竭尽能力为您排忧解难。

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 RL 的用量和延长匀浆时间； 处理难裂解组织如肌肉，皮肤，请使用 AllPure Fibrous 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。
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。设定离心机的温度为（20-25℃）。上柱时，把裂解液和乙醇混合液放置于 37℃ 水浴有利于减少堵塞现象。
RNA 或 DNA 产量低	
样品不充分匀浆	参照上面
样品的起始用量太多	参照上面
RNA 的洗脱效率低	DEPC 水没有加到膜上。再加入 30-50µl DEPC 水到膜上，室温静置 5 分钟，然后离心洗脱 RNA。
DNA 洗脱效率低	Elution Buffer 没有加到膜上。 再加入 30-100µl 预热至 65℃ 的 Elution Buffer 到膜上，室温静置 5 分钟，然后离心洗脱 DNA。
乙醇残留	柱子经 Buffer RW2 洗涤后，把空柱子重新装回收集管，室温，10,000 x g 离心 2 分钟甩干柱子中的乙醇。
培养液没有彻底去除	从细胞中提取 RNA 时，要把培养液彻底吸弃。
Buffer RW2 没有加入乙醇进行释稀	使用前，加入适量的无水乙醇至 Buffer RW2 中。

RNA 降解

组织或细胞用量太多 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；

RNA 酶污染 操作过程引入 RNA 酶的污染

DNA 拖尾现象严重

匀浆时太过剧烈 DNA 片段大小取决于匀浆过程。若需要大片段 DNA，最好不要用机械匀浆器。

RNA 产物中 DNA 污染

样品用量太多或样品 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
中基因组 DNA 含量 行 DNase 膜上处理彻底去除 DNA。

丰富

DNA 产物中存在 RNA 污染

裂解液含有乙醇 样品经 Buffer RL 裂解，离心去除杂质后直接过 AllPure DNA 结合柱

样品影响裂解液的 Buffer RL 的 pH 约为 7.0。确保样品中无盐或碱物质。

pH

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。

Note:

Note: