

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:动物软组织核酸和蛋白质总提取方案	6
方案 2:难裂解动物组织核酸和蛋白质总提取方案	9
方案 3:小分子 RNA 富集提取方案	12
常见问题回答	14

版本: 2014-09

简介

AllPure Tissue Kit 是从动物组织样品中提取 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 5~50mg 动物组织样品中提取得总 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 Tissue 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，滤液经酚氯仿抽提，分别得到上清液（含 RNA）和下层有机相（含酚氯仿）。上清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 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 被灭菌水洗脱。收集有机相溶液，加入异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 Tissue Kit

产品编号	R5216-01	R5216-02	R5216-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns	10	50	250
HiPure DNA Mini Columns II	10	50	250
2ml Collection Tubes	20	100	500
Buffer RL	10 ml	40 ml	180 ml
Reagent DX	100ul	500ul	1.5 ml
Buffer PCI	10 ml	40 ml	180 ml
Buffer PWB	10 ml	30 ml	250 ml
Buffer DW1	6 ml	30 ml	150 ml
Buffer RW2*	10 ml	50 ml	2 x 50 ml
RNase Free Water	2 ml	20 ml	50 ml
Buffer AE	2 ml	10 ml	50 ml
说明书	1	1	1

保 质 期

AllPure Tissue Kit 除 Buffer PCI 外,其余组分可在室温下(15-25℃)干燥保存 18 个月。Buffer PHC 需置于 2-8℃ 保存。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 RNase Free Water 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 RNase Free Water 并保存于-20℃,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℃ 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(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。
- 氯仿
- 无水乙醇(96-100%)
- 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 RVW2,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 RL 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，上下推磨至组织块被充分打散。由于玻璃匀浆磨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。

D: 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. 软组织或细胞核酸和蛋白质共提取

该方案适合于从小于 10^7 细胞，5~30mg 动物软组织，如肝脏、脾脏、肾脏，脑等样品中提取基因组 DNA、总 RNA（含小分子 RNA）和总蛋白质。动物组织如肌肉，结缔组织、皮肤富含高分子量的肌纤维，需按方案 2 进行操作。以下离心均在室温下进行。

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，组织用量能太多 $\leq 15\text{mg}$ ；

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 15mg，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 30mg。

1. 组织的裂解和匀浆：

- 5~30mg 动物软组织：使用 600 μl RL Buffer/3 μl Reagent DX；
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. 室温下，14,000 \times g 离心 5 分钟。按第 3 步进行操作。
 3. 把 HiPure DNA Mini Column II 装在 2ml 收集管中。**把第二步获得的上清液转移至 DNA 过滤柱中。**14,000 \times g 离心 2 分钟。保留 DNA 柱，按第 12~17 步，用于 DNA 抽提。

提取总 RNA(含小分子 RNA)

4. 转移滤液至新的 1.5ml 离心管中，**加入等倍体积的 Buffer PCI，涡旋混匀 15 秒。**
5. 室温下，12,000 \times g 离心 3 分钟。
6. 转移上清至新的 2ml 离心管中。保留下层溶液，按第 18~29 步进行蛋白质抽提。
7. **加入 1.5 倍体积的无水乙醇至上清液，颠倒或涡旋混匀。**
若需分离大分子 RNA 和小分子 RNA，按方案 3 进行操作。
8. 把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。**转移 $\leq 700\mu\text{l}$ 混合液至 RNA 柱子中。**10,000 \times g 离心 30~60 秒。

9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。转移剩余的混合液至柱子。10,000 × g 离心 30-60 秒。
10. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。**加入 600µl Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱中**，10,000 × g 离心 30-60 秒。
Buffer RW2 在使用之前，须按瓶子标签指示加入无水乙醇进行稀释。
11. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。**10,000 × g 离心空柱 2 分钟**，以甩干柱子的基质；
12. 将柱子转移至 1.5ml 离心管中。**加入 30-100µl RNase Free Water 至柱子膜中央**。室温静置 2 分钟。10,000 × g 离心 1 分钟。弃去柱子，把 RNA 保存于-80°C。
HiPure RNA Column 最小的洗脱体积是 30µl，小于 30µl 会导致 RNA 的洗脱效率下降。若 RNA 产量超过 30µg，推荐进行第二次洗脱。

提取总 DNA

13. 把 HiPure DNA Mini Column II(第 3 步)装回 2ml 收集管中。**加入 500µl Buffer DW1 至柱子中**。静置 2 分钟，10,000 × g 离心 30~60 秒。
14. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。**加入 500µl Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中**。10,000 × g 离心 30~60 秒。
15. 倒弃流出液，把柱子套回空的收集管。10,000 × g 离心空柱 1 分钟，以甩干柱子的基质。
16. 将 DNA 柱子装在 1.5ml 离心管中。**加入 50~100µl 预热至 70°C Buffer AE 至柱子的膜中央**。室温静置 5 分钟，10,000 × g 离心 1 分钟。
17. **再加入 50~100µl 预热至 70°C Buffer AE 至柱子的膜中央**。室温静置 5 分钟，10,000 × g 离心 1 分钟。
18. 弃去 DNA 柱，把 DNA 保存于 2~8°C 或-20°C。

提取总蛋白质

19. 取第 6 步获得的下层有机相和中间层溶液，并转移至合适的离心管中。
20. 加入 3 倍体积的异丙醇至有机相溶液中，涡旋混匀。室温静置 10 分钟。

21. 4°C, 12,000 × g 离心 10 分钟沉淀蛋白质。倒弃上清液。
22. 加入 1.0ml Buffer PWB(已加乙醇)至蛋白沉淀中, 涡旋混匀。室温静置 20 分钟。
23. 4°C, 7,500 × g 离心 10 分钟沉淀蛋白质。倒弃上清液。
24. 加入 1.0ml 70%乙醇至蛋白沉淀中, 涡旋混匀。室温静置 20 分钟。
25. 4°C, 7,500 × g 离心 10 分钟沉淀蛋白质。倒弃上清液。
26. 空气干燥 10 分钟。
27. 加入适量体积的 1~5% SDS Buffer 或 SDS-PAGE Loading Buffer(100~200 μ l)至沉淀物, 用移液枪反复吸打让沉淀充分分散。(可选)55°C 振荡温育 30~120 分钟让蛋白质充分溶解。
28. 4°C, 10,000 × g 离心 5 分钟去除不溶解的物质。
29. 转移上清至新的离心管中, 用于蛋白质分析实验。

方案 2. 难裂解动物组织核酸和蛋白质共提取

该方案适合于从 30~50mg 肌肉，皮肤，结缔组织等富含高分子量的肌纤维样品中提取核酸和蛋白质。

1. **称取 30~75mg 组织，加入 500 μ l Buffer RL / 3 μ l Reagent DX。**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’。室温静置 10 分钟让细胞充分裂解。
2. **加入 750 μ l Buffer PCI 至样品中，**用手剧烈振荡混匀 15 秒。室温静置 3 分钟。
3. 室温下，12,000 \times g 离心 5 分钟。
4. 把 HiPure DNA Mini Column II 装在 2ml 收集管中。**把第三步获得的上清液转移至 DNA 柱中。**10,000 \times g 离心 1 分钟。保留 DNA 柱，按第 12~17 步，用于 DNA 抽提。保留上层有机相和中间层，按第 17-29 步进行蛋白质抽提。

提取 RNA(含小分子 RNA)

5. 转移滤液至新的 2ml 离心管中，加入 1.5 倍体积的无水乙醇至上清液，涡旋混匀。若需分离大分子 RNA 和小分子 RNA，按方案 3 进行操作。
6. 把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。**转移 \leq 700 μ l 混合液至柱子中。**10,000 \times g 离心 30~60 秒。
7. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。转移剩余的混合液至柱子。10,000 \times g 离心 30-60 秒。
8. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。**加入 600 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱中，**10,000 \times g 离心 30-60 秒。
Buffer RW2 在使用之前，须按瓶子标签指示加入无水乙醇进行稀释。
9. 倒弃流出液，把柱子装回收集管。**10,000 \times g 离心空柱 2 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。
10. 将柱子转移至 1.5ml 离心管。**加入 30-100 μ l RNase Free Water 至柱子膜中央。**室温静置 2 分钟。10,000 \times g 离心 1 分钟。弃去柱子，把 RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。
HiPure RNA 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。若 RNA

产量超过 30 μ g，推荐进行第二次洗脱。

提取 DNA

11. 取 HiPure DNA Mini Column II(第 4 步)装回 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。
12. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。**加入 500 μ l Buffer RV2(已用乙醇稀释)至柱子中。**10,000 \times g 离心 30~60 秒。
13. 倒弃流出液，把柱子套回空的收集管。10,000 \times g 离心空柱 1 分钟，以甩干柱子的基质。
14. 将 DNA 柱子装在 1.5ml 离心管中。**加入 30~100 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Buffer AE 至柱子的膜中央。**室温静置 5 分钟，10,000 \times g 离心 1 分钟。
15. **再加入 50~100 μ l 预热至 70 $^{\circ}$ C Buffer AE 至柱子的膜中央。**室温静置 5 分钟，10,000 \times g 离心 1 分钟。
16. 弃去 DNA 柱，把 DNA 保存于 2~8 $^{\circ}$ C 或 -20 $^{\circ}$ C。

提取总蛋白质

17. 取第 4 步获得的下层有机相溶液，并转移至合适的离心管中。
18. 加入 3 倍体积的异丙醇至有机相溶液中，涡旋混匀。
19. 室温静置 10 分钟。
20. 4 $^{\circ}$ C，12,000 \times g 离心 10 分钟沉淀蛋白质。倒弃上清液。
21. 加入 1.0ml Buffer PWB(已加乙醇)至蛋白沉淀中，涡旋混匀。室温静置 10 分钟。
22. 4 $^{\circ}$ C，7,500 \times g 离心 10 分钟沉淀蛋白质。倒弃上清液。
23. 重复第 21~22 步一次。
24. 加入 1.0ml 70%乙醇至蛋白沉淀中，涡旋混匀。室温静置 20 分钟。
25. 4 $^{\circ}$ C，7,500 \times g 离心 10 分钟沉淀蛋白质。倒弃上清液。

26. 空气干燥 10 分钟。
27. 加入适量体积的 1~5% SDS Buffer(100~200 μ l)至沉淀物，用移液枪反复吸打让沉淀充分分散。55 $^{\circ}$ C 振荡温育 30~120 分钟让蛋白质充分溶解。
28. 4 $^{\circ}$ C，10,000 \times g 离心 5 分钟去除不溶解的物质。
29. 转移上清至新的离心管中，用于蛋白质分析实验。

方案 3.大分子和小分子 RNA 分离

该方案适合于方案 1 或方案 2 中分别提取大分子 RNA 和小分子 RNA，以下离心都在室温下进行。

1. 按方案 1 的第 1~6 步、方案 2 的第 1~4 步进行操作获得含 RNA 的滤液。
2. 加入 0.3 倍体积的无水乙醇至滤液中，用移液枪吸打 3~5 次。

大分子 RNA 的分离

3. 把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。**转移混合液至 RNA 柱子中。**10,000 × g 离心 1 分钟。保留或收集滤液至新的离心管中，用于小分子 RNA 的富集。
4. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。**加入 600µl Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱中，**8,000 × g 离心 30-60 秒。
Buffer RW2 在使用之前，须按瓶子标签指示加入无水乙醇进行稀释。
5. 倒弃流出液，把柱子装回收集管。**10,000 × g 离心空柱 2 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。
6. 将柱子转移至 1.5ml 离心管。**加入 30-50µl RNase Free Water 至柱子膜中央。**室温静置 2 分钟。10,000 × g 离心 1 分钟。弃去柱子，把 RNA 保存于-80°C。
HiPure RNA Column 最小的洗脱体积是 30µl，小于 30µl 会导致 RNA 的洗脱效率下降。若 RNA 产量超过 30µg，推荐进行第二次洗脱。

小分子 RNA 的富集

7. **测量滤液体积(第 3 步)**，加入等倍体积的无水乙醇至滤液中，用移液枪吸打混匀 3~5 次。
8. 把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。**转移≤700µl 混合液至 RNA 柱子中。**10,000 × 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。**
9. 把柱子装在收集管中。**继续把混合液转移至 RNA 柱子中。**10,000 × g 离心 30~60 秒。收集滤液并转移至离心管或倒弃滤液。重复此步直至所有混合液转移至柱子中并离心。

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。

10. 倒弃流出液，把 RNA 柱子装回收集管中。**加入 600 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。
11. 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。
12. 把柱子装在新的 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。10,000 \times g 离心 1 分钟。
13. 弃去 RNA 柱子，把 miRNA 保存于-80 $^{\circ}$ 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 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。

Note: