

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: 细胞总 RNA 提取方案	5
方案 2: 细胞小分子 RNA 富集提取方案	7
附加方案 3: 细胞 DNA 或总核酸提取方案	9
附加方案 4: 细胞蛋白质提取方案	10
常见问题回答	11

版本: 2013-05

简介

AllPure Cell Kit 是从培养细胞中提取 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。试剂盒适合从小于 1×10^7 培养细胞提取得总 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 Cell 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 RWC 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。收集滤液，加入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 Cell Kit

产品编号	R5214-01	R5214-02	R5214-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns I	10	50	250
HiPure DNA Mini Columns II	10	50	250
2ml Collection Tubes	20	100	500
Reagent DX	100 ul	500 ul	1.5 ml
Buffer RL	10 ml	50 ml	250 ml
Buffer MPP	1 ml	5 ml	25 ml
Buffer RWC*	5 ml	20 ml	80 ml
Buffer RW2*	5 ml	2 x 20 ml	2 x 50 ml
RNase Free Water	5 ml	15 ml	60 ml
说明书	1	1	1

版本：2018-10

保 质 期

AllPure Cell Kit 可在室温下(15-25℃)干燥保存 18 个月。长期保存时需置于 2-8℃。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 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。

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。
- 70%乙醇:用DEPC处理水配制
- 无水乙醇(96-100%)
- (蛋白质提取)丙酮和蛋白质溶解液(2~5% Buffer SDS、8M Urea、或其它缓冲液)
- (DNA 提取)Buffer TE, PH8.0
- 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 RW2,并于室温保存。
- 按瓶子标签所示,加入适量的无水乙醇稀释 Buffer RVC,并于室温保存。

方案 1. 培养细胞总 RNA/DNA/蛋白质提取

该方案适合于从 $2 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ 个细胞中提取大分子 RNA 或总 RNA(含小分子 RNA)。以下离心都在室温下进行。

细胞的收集

- **悬浮细胞：**计算细胞数量。400 x g 离心 5 分钟收集细胞。吸弃培养液，按第 1 步操作。
- **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，400 x 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而影响 RNA 完整性和产量。

细胞的裂解和匀浆

1. **加入 500~550 μ l Buffer RL 和 3 μ l Reagent DX 至细胞样品中，重悬打散细胞。**
离心收集的细胞：弹打或涡旋松散细胞，根据细胞量加入 400 μ l Buffer RL 和 3 μ l Reagent DX，涡旋或吸打重悬细胞。
贴壁细胞：彻底吸弃培养液，向培养瓶或培养皿中加入 550~600 μ l Buffer RL 和 3 μ l Reagent DX。用移液枪吹打使细胞从壁上脱落，并转移 400 μ l 匀浆液至离心管中。
2. 用移液枪吸打混匀 5~10 次进一步裂解细胞。

过柱吸附 DNA

3. 把 HiPure DNA Mini Column II 装在 2ml 收集管中。**转移第 2 步的裂解液至 DNA 柱子中。**12,000 x g 离心 1 分钟。保留 HiPure DNA Mini Column II，按附加方案 3 进行 DNA 抽提。

过柱吸附 RNA

4. **加入 350 μ l Buffer RV2 至滤液中，吸打混匀 5 次。**
5. 把 HiPure RNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。**转移混合液至 RNA 柱子中。**

12,000 × g 离心 30~60 秒。收集滤液至 2ml 离心管，保存用于蛋白质抽提。

6. 把柱子装回收集管中。**加入 500µl Buffer RWC 至柱子中。**12,000 × g 离心 30-60 秒。

Buffer RWC 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。

7. 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。**12,000 × 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。

8. (可选)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，**12,000 × g 离心 30-60 秒。

9. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。12,000 × g 离心空柱 2 分钟甩干柱子。

10. 把柱子装在新的 1.5ml 离心管中。**加入 15~50µl DEPC 水至柱子的膜中央。**室温静置 1 分钟。10,000 × g 离心 1 分钟。

HiPure RNA Mini Column 最小的洗脱体积是 15µl，小于 15µl 会导致 RNA 的洗脱效率下降。若细胞量 3×10^6 ，推荐每次用 15~50µl DEPC 水至柱子中进行洗脱。若细胞量小于 1×10^6 ，推荐用 15~30µl DEPC 水至柱子中洗脱一次。

11. 弃去 RNA 柱子，把 RNA 保存于-80°C。

方案 2. 培养细胞总 RNA(miRNA)/DNA/蛋白质提取

该方案适合于从 $2 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ 个细胞中提取总 RNA(含小分子 RNA)以及 DNA 和蛋白质。以下离心都在室温下进行。

细胞的收集

- **悬浮细胞：**计算细胞数量。400 × g 离心 5 分钟收集细胞。吸弃培养液，按第 1 步操作。
- **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，400 × 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而影响 RNA 完整性和产量。

细胞的裂解和匀浆

1. **加入 500~550μl Buffer RL 和 3μl Reagent DX 至细胞样品中，重悬打散细胞。**
 离心收集的细胞：弹打或涡旋松散细胞，根据细胞量加入 500μl Buffer RL 和 3μl Reagent DX，涡旋或吸打重悬细胞。
 贴壁细胞：彻底吸弃培养液，向培养瓶或培养皿中加入 550~600μl Buffer RL 和 3μl Reagent DX。用移液枪吹打使细胞从壁上脱落，并转移 500μl 匀浆液至离心管中。
2. 用移液枪吸打混匀 5~10 次进一步裂解细胞。

过柱吸附 DNA

3. 把 HiPure DNA Mini Column II 装在 2ml 收集管中。**转移第 2 步的裂解液至 DNA 柱子中。**12,000 × g 离心 1 分钟。保留 HiPure DNA Mini Column II，按附加方案 3 进行 DNA 抽提。
4. **转移滤液至 1.5ml 离心管中，加入 85μl Buffer MPP 至滤液中，涡旋混匀 15 秒。**
5. 室温下，12,000 × g 离心 3 分钟。保留沉淀用于蛋白质抽提，按方案 4 的第 3 步进行操作。

6. 转移上清液至新的离心管中， 根据需求选择合适的方式进行操作。

6A: 总 RNA(miRNA)抽提: 加入等体积的异丙醇至上清液, 混匀。把 HiPure RNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。转移混合液至 RNA 柱子中。10,000 × g 离心 30~60 秒。按第 7 步进行操作。

6B: 大分子 RNA: 加入 0.3 倍体积的无水乙醇至上清液中, 混匀。把 HiPure RNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。转移混合液至 RNA 柱子中。10,000 × g 离心 30~60 秒, 按第 7 步进行操作提取大分子 RNA, 保留滤液, 按步骤 6C 进行 miRNA 抽提。

6C: miRNA 富集: 取步骤 6B 保留的滤液, 加入等体积的无水乙醇至滤液中, 混匀。把 HiPure RNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。转移混合液至 RNA 柱子中。10,000 × g 离心 30~60 秒, 按第 7 步进行操作。

7. 倒弃滤液, 把 RNA 柱子装回收集管中。**加入 500µl Buffer RWC 至柱子中。**10,000 × g 离心 30-60 秒。

Buffer RWC 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。

8. 倒弃流出液, 把 RNA 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。

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 RNA 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。

10. 倒弃流出液, 把 RNA 柱子装回收集管中。10,000 × g 离心空柱 3 分钟。

11. 把柱子装在新的 1.5ml 离心管中。**加入 15~50µl DEPC 水至柱子的膜中央。**室温静置 2 分钟。10,000 × g 离心 1 分钟。

12. 弃去 RNA 柱子, 把 miRNA 保存于-80°C。

附加方案 3. 细胞 DNA

该方案适合于从 DNA 柱子中进一步纯化得到基因组 DNA(方案 1)，以下离心都在室温下进行。

1. 取方案 1 或方案 2 的 HiPure DNA Mini Kit II。
2. 把 HiPure DNA Mini Column II 装在 2ml 收集管中。**加入 500 μ l Buffer RWC 至柱子中，静置 2 分钟**，10,000 \times g 离心 30-60 秒。
3. 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。
4. 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。
5. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。10,000 \times g 离心空柱 2 分钟甩干柱子。
6. 把柱子装在新的 1.5ml 离心管中。**加入 30~100 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C 的 Buffer TE 或 DEPC 水至柱子的膜中央**。室温静置 3 分钟。10,000 \times g 离心 1 分钟。
7. **加入 30~100 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C 的 Buffer TE 或 DEPC 水至柱子的膜中央**。室温静置 3 分钟。10,000 \times g 离心 1 分钟。
8. 弃去 HiPure DNA Mini Kit II 柱子，把 DNA 保存于-20 $^{\circ}$ C(方案 1)。

附加方案 4. 细胞总蛋白质抽提

该方案适合于从方案 1 的滤液或方案 2 的沉淀中进一步纯化得到总蛋白质，用于 SDS-PAGE 和 Western Blot 分析。处理该方案，需要以下准备以下的材料。

1. 取方案 1 的滤液(含蛋白质)，加入 4 倍体积的丙酮，颠倒混匀。室温静置 10 分钟。
2. 12,000 × g 离心 3 分钟，小心倒弃上清液。
3. 加入 1ml 70%乙醇，涡旋混匀，室温放置 5 分钟。
4. 12,000 × g 离心 3 分钟，小心倒弃上清液。
5. 短暂离心，彻底吸弃残留的乙醇。空气干燥 5-10 分钟。
6. 根据下游应用，加入 100-300 μ l 蛋白溶解液。用移液枪吸打充分打散沉淀。
这一步要充分打散蛋白沉淀。沉淀的充分分散是蛋白得率的关键。
7. 95°C 水浴 5~10 分钟溶解蛋白质。
8. 室温静置让样品恢复至室温。12,000 × g 离心 3 分钟去除不溶解的物质。
9. 转移上清液至新的 1.5ml 离心管中。放置 4°C 或 -20°C，或用于 SDS-PAGE 电泳，或定量等。

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。