

## 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 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  $\beta$ -巯基乙醇( $\beta$ -ME)或1M DTT:** 使用前,分装适量的Buffer RL,每1 ml Buffer RL加入20 $\mu$ l  $\beta$ -巯基乙醇。Buffer RL/ $\beta$ -ME混合液可室温稳定放置1个星期。 $\beta$ -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1 ml Buffer RL加入20 $\mu$ 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 RI Buffer/ $\beta$ -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 $\mu\text{l}$  RL Buffer/3 $\mu\text{l}$  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℃。  
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℃ 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℃ 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℃ 或-20℃。

### 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(100~200μl)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 650 $\mu$ l Buffer RL /3ul 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 650 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ l，小于 30 $\mu$ l 会导致 RNA 的洗脱效率下降。若 RNA

产量超过 30 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ l Buffer RW2(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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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   |
|---------------------|---|
| <b>柱子堵塞</b>         |   |
| 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；<br>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。          |
| <b>RNA 产量低</b>      |   |
| 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；<br>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   |
| <b>RNA 降解</b>       |   |
| 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: