

## AllPure DNA and RNA Micro Kit

微量组织细胞 RNA/DNA 共提试剂盒

### 产品简介

本产品适合于从 $\leq 1 \times 10^6$ 个培养细胞、 $\leq 10\text{mg}$ 动物组织、 $\leq 50\text{mg}$ 常规的植物/真菌组织样品中同时提取得到RNA和DNA。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，整个提取过程只需30分钟。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。

### 产品组份

产品编号	R5112-01	R5112-02	R5112-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Micro Columns	10	50	250
HiPure DNA Mini Columns I	10	50	250
2ml Collection Tubes	20	100	500
Proteinase K Solution	0.3 ml	1.2 ml	6.0 ml
Buffer RLC	5 ml	30 ml	120 ml
Buffer DW1	10 ml	30 ml	150 ml
Buffer RV1	10 ml	50 ml	250 ml
Buffer RV2*	5 ml	50 ml	3 x 50 ml
Carrier RNA	-	310 $\mu\text{g}$	3 x 310 $\mu\text{g}$
RNase Free Water	3 ml	20 ml	90 ml
Elution Buffer	1.8 ml	10 ml	30 ml
说明书	1	1	1

### 保存条件

本产品可在室温(15~25℃)保存 18 个月。因 RNase Free Water 不含抑菌剂，室温放置或操作时可能会引入细菌或真菌污染，推荐分装保存于 2~8℃，以减少污染。

## 准备事项

- 在 Buffer RW2 中，加入 4 倍体积无水乙醇，于室温保存。
- 提升裂解液的变性能力：使用前分装适量的 Buffer RLC，按每 1ml Buffer RLC 加入 20 $\mu$ l  $\beta$ -巯基乙醇、1M DTT 或 1M TCEP，混合液室温可保存 1 周。TCEP，中文名为三(2-羧乙基)膦盐酸盐，是一种高效、无异味、不含硫醇基还原剂，可高效灭活核酸酶和防止多酚氧化，可代替 2-巯基乙醇，提高 RNA 的完整性和得率。
- 加入适量的 RNase Free Water 至 Carrier RNA 管子中至终浓度为 1 $\mu$ g/ $\mu$ l，涡旋让 Carrier RNA 充分溶解，然后保存于-20 $^{\circ}$ C。

## Carrier RNA 作用

- 若处理小于 100 $\mu$ g 动植物组织或<1000 个细胞时，Carrier RNA 须加到 Buffer RLC 中至终浓度为 4ng/ $\mu$ 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。
- 按 Carrier RNA:Buffer RLC =1:250 比例混合。该混合液可在 2-8 $^{\circ}$ C 稳定放置 2 天。举例：加入 4 $\mu$ l Carrier RNA 至 1ml Buffer RLC 中。由于 Carrier RNA 为 Poly A 结构，可能会影响到 RT-PCR 的灵敏度，建议根据结果进行调整。添加了 Carrier RNA 进行提取时，测量 OD 时，核酸浓度不代表真实样品浓度，而且 A260/280 会超过 2.0，一般在 2.5-2.8。

## 实验步骤

- **培养细胞( $\leq 1 \times 10^6$ ):**

### 1. 加入适量的 Buffer RLC 至细胞样品中，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 RLC，涡旋或吸打打散细胞。

- $\leq 1 \times 10^6$  细胞：加入 300 $\mu$ l Buffer RLC，用一次性的注射器抽打裂解液 3~5 次；
- $\leq 1 \times 10^5$  细胞：加入 150 $\mu$ l Buffer RLC，高速涡旋 1 分钟；

**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 RLC，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。

- 6 cm 直径的培养皿：加入 300 $\mu$ l Buffer RLC，用一次性的注射器抽打裂解液 5 次；
- $\leq 1 \times 10^5$  细胞的多孔板：加入 150 $\mu$ l Buffer RLC，用移液枪吸打 3-5 次；

### 2. 加入 0.5 倍体积的 RNase Free Water 和 20 $\mu$ l Proteinase K，颠倒混匀 6-8 次。55 $^{\circ}$ C 温育 10 分钟。按第 3 步进行操作。

- 动物组织 (<10mg)

1. 把不超过 10mg 动物组织样品放置于离心管中，加入 300 $\mu$ l Buffer RLC，选择合适的匀浆工具进行匀浆。
2. 加入 150 $\mu$ l RNase Free Water 和 20 $\mu$ l Proteinase K，颠倒混匀 6-8 次，55 $^{\circ}$ C 温育 10 分钟。12,000  $\times$  g 离心 3 分钟，按第 3 步进行操作。

- 植物或真菌 (<50mg)

1. 转移不超过 50mg 植物或真菌样品至 1.5ml 离心管中，用研磨杵和液氮将样品研磨成粉末状，立即加入 300 $\mu$ l Buffer RLC，涡旋混匀 5-10 秒。
2. 加入 150 $\mu$ l RNase Free Water 和 20 $\mu$ l Proteinase K，颠倒混匀 6-8 次，55 $^{\circ}$ C 温育 10 分钟。12,000  $\times$  g 离心 3 分钟，按第 3 步进行操作。
3. 把 HiPure DNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。把细胞消化液或组织消化液上清转移至 DNA 柱子中，12,000  $\times$  g 离心 2 分钟。取 HiPure DNA Mini Column 装在新的收集管中，按第 11-16 步进行 DNA 提取。

### 过柱纯化 RNA

4. 加入 0.5 倍体积无水乙醇至滤液中，用移液枪吸打混匀 3~5 次。
5. 把 HiPure RNA Micro Column 装在 2ml 收集管中。转移全部混合液至柱子中。12,000  $\times$  g 离心 30~60 秒。
6. 倒弃滤液，把柱子装回收集管，加入 500 $\mu$ l Buffer RW1。12,000  $\times$  g 离心 30~60 秒。
7. 倒弃滤液，把柱子装回收集管，加入 500 $\mu$ l Buffer RW2。12,000  $\times$  g 离心 30~60 秒。
8. 倒弃滤液，把柱子装回收集管，加入 500 $\mu$ l Buffer RW2。12,000  $\times$  g 离心 30~60 秒。
9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。12,000  $\times$  g 离心 2 分钟。
10. 将柱子转移至 1.5ml 离心管，加入 15-50 $\mu$ l RNase Free Water 至柱子膜中央。室温静置 2 分钟。12,000  $\times$  g 离心 1 分钟。弃去柱子，把 RNA 保存于 -80 $^{\circ}$ C。

### 过柱纯化 DNA

11. 加入 500 $\mu$ l Buffer DW1 至 HiPure DNA Mini Column I (第 3 步) 中，静置 2 分钟，12,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
12. 倒弃滤液，把柱子装回收集管，加入 500 $\mu$ l Buffer RW2 至柱子。12,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
13. 倒弃滤液，把柱子装回收集管，加入 500 $\mu$ l Buffer RW2 至柱子。12,000  $\times$  g 离心 1 分钟。

14. 倒弃流出液，把柱子装回收集管。12,000 × g 离心 2 分钟。
15. 将 DNA 柱子装在 1.5ml 离心管中。加入 30 $\mu$ l 预热至 65°C Elution Buffer 至柱子的膜中央，室温静置 5 分钟。13,000 × g 离心 1 分钟。
16. 再加入 30 $\mu$ l 预热至 65°C Elution Buffer 至柱子的膜中央。室温静置 5 分钟。13,000 × g 离心 1 分钟。弃去 DNA 柱，把 DNA 保存于 2~8°C 或 -20°C。

## 常见问题

### 1. 柱子堵塞

- **样品用量太多：**减少样品量，过量组织或细胞反而会降低产量和纯度。
- **裂解液离心不充分：**组织裂解液需高速离心去除杂质。细胞碎片会引起柱子的堵塞。处理某些样品时，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。
- **裂解液非常粘稠：**加大裂解液用量，并用一次性注射器抽打裂解液 5~10 次。

### 2. RNA 降解

- **RNase-free Water 被污染：**RNase Free Water 不含抑菌剂，室温放置或操作时可能会引入细菌或真菌污染。更换新的 RNase Free Water 或 DEPC 处理水。
- **样品贮藏问题：**反复解冻会引起 RNA 降解，确保样品解冻次数不要超过 2 次。
- **裂解问题：**样品在解冻前，需要在 Buffer RLC 中快速匀浆。样品只能充分裂解后，内源的核酸酶才能被灭活，RNA 才不会降解。
- **电泳原因：**常见 RNA 降解现象都是电泳过程中引起的。更换新的 Loading Buffer 和电泳缓冲液。
- **70%乙醇有问题：**用 DEPC 处理水配制 70%乙醇，或用 Buffer RW2 代替。

### 3. RNA 产量低

- **洗脱不充分：**RNase Free Water 需直接加到膜上，并静置几分钟后再离心，进行第二步洗脱以提高产量。
- **样品用量太多：**减少样品用量，超量的样品有时会引起产量下降。处理肝脏或脾脏样品，用 50%乙醇代替 70%乙醇。

### 4. DNA 产量低

- **洗脱不充分：**Elution Buffer 需直接加到膜上，并静置几分钟后再离心，进行第二步洗脱以提高产量。
- **DNA 降解：**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。