AipPure 组织/细胞(RNA/DNA/Protein)分离提取试剂盒(离心柱型)

AipPure Tissue/Cell (DNA/RNA/Protein) Isolation and Extraction Kit(Centrifugal Column)

使 用 说 明 书

◆目录号：RE267

◆试剂盒组成、储存、稳定性：

试剂盒组成	保存	50 次(R267-01)
裂解液 RLT	室温	50mL
去蛋白液 RW1	室温	40mL
漂洗液 RW	室温	10mL 第一次使用前按说明加指定量乙醇
RNase-free Water	室温	10mL
70%乙醇	室温	9mL RNase-free Water 第一次使用前按说明加指定量乙醇
抑制物去除液 IR	室温	25mL
漂洗液 WB	室温	13mL 第一次使用前按说明加指定量乙醇
缓冲液 APP	室温	60mL
洗脱缓冲液 EB	室温	10mL
基因组 DNA 吸附柱 DA 和收集管	室温	50 套
RNA 吸附柱 RA 和收集管	室温	50 套

◆**适用范围：**适用于快速从同一个动物细胞或者组织样品中同时提取分离基因组DNA和总RNA和Protein，不需要使用DNase消化，RNA可直接用于反转录PCR，荧光定量PCR。

◆**产品储存：**本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

◆**储存事项：**

1. 所有的溶液应该是澄清的，如果环境温度低时溶液可能形成沉淀，此时不应该直接使用，可在 37℃水浴加热几分钟，即可恢复澄清。
2. 不合适的储存于低温(4℃或者－20℃)会造成溶液沉淀，影响使用效果，因此运输和储存均在室温下(15℃－25℃)进行。

3. 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、PH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。

◆产品介绍：本试剂盒设计用于快速从同一个动物细胞或者组织样品中同时提取分离基因组 DNA 和总 RNA 和 Protein。独特的裂解液迅速裂解细胞和灭活细胞 RNA/DNA 酶，然后裂解混合物 DNA/RNA/Protein 同时通过一个基因组 DNA 吸附柱，基因组 DNA 被吸附而 RNA/Protein 穿透滤过。DNA 吸附柱上基因组 DNA 经过一系列漂洗-离心后洗脱得到纯净基因组 DNA。滤过的 RNA 用乙醇调节结合条件后，RNA 在高离序盐状态下选择性吸附于 RNA 吸附柱上，再通过一系列快速的漂洗-离心洗脱得到纯净的 RNA。滤液经选择性沉淀得到 Protein。无苯酚、氯仿 DNA/RNA 快速提取技术基础上配合独家的分离技术同时得到的 RNA/基因组 DNA 纯度高，互不干扰。得到的 RNA 不需要 DNase 消化，可直接用于反转录 PCR、荧光定量 PCR 等实验。基因组 DNA 也可以直接用于下游的 Southern、酶切、PCR 等各种试验。

◆产品特点：

1. 完全不使用有毒的苯酚、氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀等步骤。
2. 快速简捷，单个样品 RNA/基因组 DNA/Protein 分离操作一般可在 1 小时内完成。
3. 试剂盒的独家吸附柱和配方确保有效清除基因组 DNA 残留，一般情况下得到的 RNA 不需要 DNase 消化，可直接用于反转录 PCR、荧光定量 PCR 等实验。
4. 多次柱漂洗确保 RNA/基因组 DNA 高纯度，可直接用于下游各种实验。

◆注意事项：

1. 所有的离心步骤均在室温完成，使用转速可以达到 13,000rpm 的传统台式离心机，如 Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
2. 样品处理量绝对不要超过基因组吸附柱 DA 和和 RNA 吸附柱 RA 处理能力，否则造成 DNA 残留或者产量降低。不同组织细胞种类 RNA/DNA 相差极大，例如胸腺脾脏 DNA 含量丰富，超过 5mg 就会超过柱子处理能力。COS 细胞 RNA 含量丰富，超过 $3x10^6$ 细胞就会超过柱子吸附能力。所以开始摸索实验条件时，如果不清楚样品 DNA/RNA 含量时宁可使用较少的样品处理量，如细胞不超过 $3\text{-}4x10^6$，组织不超过 10mg。将来根据样品试验情况增加或者减少处理量。
3. 裂解液 RLT、抑制物去除液 IR、去蛋白液 RW1 中含有刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套，避免沾染皮肤，眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或者生理盐水冲洗。
4. 该试剂盒如需要用于植物样品尤其是多糖多酚次级代谢产物丰富的困难样品的 DNA/RNA/Protein 提取，请咨询技术人员，可能需要用到其它试剂。

5. 关于 DNA 的微量残留：一般说来任何总 RNA 提取试剂在提取过程中无法完全避免 DNA 的微量残留(DNase 消化也无法做到 100%无残留)，本公司的 AipPure 组织/细胞 RNA/DNA/Protein 分提试剂盒，由于采取了本公司独特的缓冲体系和基因组 DNA 分离清除技术，绝大多数 DNA 已经被清除，不需要 DNase 消化，可直接用于反转录 PCR 和荧光定量 PCR。个别特殊情况如 DNA 含量过于丰富造成残留或者要进行严格的 mRNA 表达量分析荧光定量 PCR，我们建议在进行模板和引物的选择时：
   1) 选用跨内含子的引物，以穿过 mRNA 中的连接区，这样 DNA 就不能作为模板参与扩增反应。
   2) 选择基因组 DNA 和 cDNA 上扩增的产物大小不一样的引物对。
   3) 将 RNA 提取物用 RNase-free 的 DNase I 处理以提高效果。本试剂盒还可以用于 DNase I 处理后的 RNA 清洁(Clean up)，请联系我们索取具体操作说明书。
   4) 在步骤去蛋白液 RW1 漂洗前，直接在吸附柱 RA 上进行 DNase I 处理。请联系我们索取具体操作说明书。

◆操作步骤(实验前请先阅读注意事项)：

提示：第一次使用前请先在漂洗液 RW 瓶、漂洗液 WB 和 70%乙醇瓶中加入指定量无水乙醇！

1. **组织培养细胞**
   1) 收集<10^7 悬浮细胞到一个 1.5mL 离心管，对于贴壁细胞，孔板培养可以直接裂解，细胞瓶培养应该先用胰蛋白酶消化后吹打下来收集。
   2) 13,000rpm 离心 10 秒(或者 300xg 离心 5 分钟)，使细胞沉淀下来。完全吸弃上清，留下细胞团，注意不完全弃上清会稀释裂解液导致产量纯度降低。
   3) 轻弹管壁将细胞沉淀完全松散重悬，加 350μL(<$5x10^6$ 细胞)或 600μL($5x10^6$-$1x10^7$ 细胞)裂解液 RLT，吹打混匀后用手剧烈振荡 20 秒充分裂解。
   4) 匀浆：(处理细胞量极少时<$1x10^5$ 一般不需要，涡旋振荡一分钟匀浆)。用带钝针头的一次性 1mL(配 0.9mm 针头)注射器抽打裂解物 5-10 次或直到得到满意匀浆结果(或者电动匀浆 30 秒)，可以剪切 DNA，降低粘稠度防堵塞柱子和提高产量。
   5) 将裂解混合物或匀浆混合物全部加到 DNA 吸附柱上(吸附柱放在收集管内)。
   6) 接操作步骤项下 3。
2. **动物组织(例如鼠肝脑)**
   1) **电动匀浆：**新鲜组织用解剖刀迅速切成小碎块，加入 350μL(<20mg 组织)或者

600μL(20-30mg 组织)的裂解液 RLT 后电动彻底匀浆 20-40 秒。

2) **液氮研磨+匀浆：**在液氮中研磨组织成细粉后，取适量组织细粉(20mg/30mg)转入装有 350μL/600μL 组织裂解液 RLT 的 1.5mL 离心管中，用手剧烈振荡 20 秒，充分裂解。用带钝针头的一次性 1mL(配 0.9mm 针头)注射器抽打裂解物 10 次或直到得到满意匀浆结果(或者电动匀浆 30 秒)，可以剪切 DNA，降低粘稠度防堵塞柱子和提高产量。

3) 将匀浆后裂解物 13,000rpm 离心 3 分钟，沉淀可能存在的裂解困难的碎片或者不溶物，将裂解物上清全部加到 DNA 吸附柱上(吸附柱放在收集管内)。

4) 接操作步骤项下 3。

3. 13,000rpm 离心 30 秒，保留滤过液(RNA/Protein 在滤过液中)。DNA 吸附柱子(膜上吸附有基因组 DNA)短时间可存放 4℃度备用。

   注：确保离心后液体全部滤过去，膜上没有残留，如有必要，可以加大离心力和离心时间。

以下步骤为提取 RNA 步骤：

4. 用微量移液器较精确估计滤过液体积(通常为 350μL/600μL，滤过时候损失体积应该减去)，加入等体积的 70%乙醇(请先检查是否已加入无水乙醇!)，此时可能出现沉淀，但是不影响提取过程，立即吹打混匀，不要离心。
5. 立刻将混合物(每次小于 700μL，多可以分两次加入)加入一个 RNA 吸附柱 RA 中，(吸附柱放入收集管中)13,000rpm 离心 30 秒，保留滤过液以备提取 Protein。

   注：滤过液含有 Protein，请转入一个合适大小(至少 2 倍滤过液体积)的离心管，保留被用于步骤 17 开始的 Protein 提取。装滤过液体和乙醇混合物的 DNA 吸附柱的收集管(混合物转入 RNA 吸附柱后剩下的空收集管)需要保留，将 DNA 吸附柱放回此收集管保留在 4℃，备用于步骤 11 开始的基因组 DNA 提取。
6. 加入 700μL 去蛋白液 RW1，室温放置 1 分钟，12,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。
7. 加入 500μL 漂洗液 RW(请先检查是否已加入无水乙醇!)，12,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。加入 500μL 漂洗液 RW，重复一遍。
8. 将吸附柱 RA 放回空收集管中，13,000rpm 离心 2 分钟，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
9. 取出吸附柱 RA，放入一个 RNase-free 离心管中，根据预期 RNA 产量在吸附膜的中间部位加 30-50μL RNase-free Water(事先在 70-90℃水浴中加热可提高产量)，室温放置 1 分钟，12,000rpm 离心 1 分钟。
10. 如果预期 RNA 产量>30μg，加 30-50μL RNase-free Water 重复步骤 9，合并两次洗

脱液，或者使用第一次的洗脱液加回到吸附柱重复步骤一遍(如果需要 RNA 浓度高)。

注: 洗脱两遍的 RNA 洗脱液浓度高，分两次洗脱合并洗脱液的 RNA 产量比前者高 15–30%，但是浓度要低，用户根据需要选择。

以下步骤为提取 DNA 步骤：

11. 在步骤 3 的 DNA 吸附柱上加入 500μL 抑制物去除液 IR，12,000rpm 离心 30 秒，弃废液。
12. 加入 700μL 漂洗液 WB(请先检查是否已加入无水乙醇!)，12,000rpm 离心 30 秒，弃废液。
13. 加入 500μL 漂洗液 WB，12,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。
14. 将 DNA 吸附柱放回空收集管中，13,000rpm 离心 2 分钟，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
15. 取出 DNA 吸附柱，放入一个干净的离心管中，在吸附膜的中间部位加 100μL 洗脱缓冲液 EB(洗脱缓冲液事先在 65-70°C水浴中预热效果更好)，室温放置 3-5 分钟，12,000rpm 离心 1 分钟。将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，室温放置 2 分钟，12,000rpm 离心 1 分钟。

    注：洗脱体积越大，洗脱效率越高，如果需要 DNA 浓度较高，可以适当减少洗脱体积，但是最小体积不应少于 50μL，体积过小降低 DNA 洗脱效率，减少 DNA 产量。
16. DNA 可以存放在 2-8°C，如果要长时间存放，可以放置在－20°C。

以下步骤为提取 Protein 步骤：

17. 将步骤 5 的滤过液中加入等体积的缓冲液 APP，涡旋振荡混匀，室温放置 15 分钟沉淀 Protein。
18. 13,000rpm 离心 5-10 分钟，小心弃上清。加入 0.5mL 70%乙醇，颠倒后离心 1 分钟，小心弃上清，留下蛋白沉淀，尽量将残留液体用移液器吸干净。
19. 室温晾干沉淀 5-10 分钟，注意一定让乙醇挥发干净，以免下游试验受影响。
20. 将蛋白沉淀溶解于 30-150μL 1x 蛋白上样缓冲液(如需要蛋白定量，缓冲液中不应该加入溴酚兰)或其它下游试验要求的缓冲液中。

    注：由于裂解液 RLT 强变性作用或者不同蛋白等电点，蛋白可能溶解比较困难，用移液器吹打帮助溶解或者改变 PH 值帮助蛋白溶解，短暂离心取上清使用。或者用 5% SDS 或者 8M 尿素帮助溶解蛋白沉淀后做蛋白定量。注意如果需要 BCA 蛋白定量可能需要把 8M 尿素稀释到 3M。

21. 95℃放置 5 min 溶解和变性蛋白，恢复到室温，最高速离心 1 min，取上清进行 SDS-PAGE 电泳或 Western Blot 等试验。

==========

扫码关注我们