

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: 202401

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 μ l	500 μ l	1.5 ml
Buffer RL	15 ml	60 ml	270 ml
Buffer MPP	1 ml	5 ml	25 ml
Buffer RWC*	5 ml	20 ml	80 ml
Buffer RW2*	5 ml	50 ml	3 x 50 ml
RNase Free Water	5 ml	15 ml	60 ml
说明书	1	1	1

版本：202401

保 质 期

AllPure Cell Kit 可在室温下(15-25°C)干燥保存 18 个月。长期保存时需置于 2-8°C。低温下，Buffer RL 可能会有沉淀形成，需 55°C 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°C，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

- 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 μ l β -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。
- 减少裂解时气泡产生：Buffer RLC 含表面活性剂，匀浆时会产生泡沫而给操作带来麻烦。按 1ml Buffer RL 加入 5 μ l Reagent DX 可以起到良好消泡效果。
- 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 RWC，并于室温保存。

方案 1. 从培养细胞中提取蛋白质、DNA 和 RNA (不含 miRNA)

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 和 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 x g 离心 5 分钟，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 400~500 μ l Buffer RL 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，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 500 μ l Buffer RL，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. 用一次性 1ml 注射器（货号 ZS100）或移液枪吸打混匀 5~10 次进一步匀浆细胞。

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。

4. 把 HiPure DNA Mini Column II 装在新的收集管中，按附加方案 3 进行 DNA 抽提。

过柱吸附 RNA

5. 加入等倍体积的 70%乙醇至滤液中，用移液器吸打混匀 3~5 次。

6. 把 HiPure RNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。转移全部混合液至 RNA 柱子中。12,000 x g 离心 30~60 秒。

7. 转移收集管中的滤液至 2ml 离心管中，按附加方案 4 用于蛋白质抽提。

8. **把柱子装回收集管中。加入 500 μ l Buffer RWVC 至柱子中。**12,000 \times g 离心 30-60 秒。
Buffer RWVC 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. **倒弃滤液，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。**
12,000 \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。
10. **倒弃滤液，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，**
12,000 \times g 离心 30-60 秒。
11. **倒弃流出液，把柱子装回收集管中。**12,000 \times g 离心空柱 2 分钟甩干柱子。
12. **把柱子装在新的 1.5ml 离心管中，加入 15~100 μ l RNase Free Water 至柱子的膜中央。**
室温静置 2 分钟。10,000 \times g 离心 1 分钟。
HiPure RNA Mini Column 最小的洗脱体积是 15 μ l，小于 15 μ l 会导致 RNA 的洗脱效率下降。
若细胞量 3×10^6 ，推荐每次用 15~50 μ l RNase Free Water 至柱子中进行洗脱。若细胞量
小于 1×10^6 ，推荐用 15~30 μ l RNase Free Water 至柱子中洗脱一次。
当 RNA 总量高于 10 μ g 时，OD260/230 一般都在 1.3-2.2；当 RNA 总量在 5~10 μ g 时，
A260/230 会在 0.7~2.0；当 RNA 总量低于 3 μ g，A260/230 会低于 0.6。这是因为 Buffer
RTL、RW1 含异硫氰酸胍，以及玻璃滤膜有吸水性或本底吸附。异硫氰酸胍在 230nm 有强
烈吸光值，因此 A260/230 主要受该胍盐影响，而不是来源于样品。研发表明，低浓度异
硫氰酸胍不影响反转录，定量 RT-PCR，二代测序等相关应用。出现 260/230 在 0.2-1.0 时，
可以忽略并直接用于反转录等下游应用。在不堵塞柱子的情况下，适量提高样品用量和裂
解液用量，提高核酸浓度（核酸总量>10 μ g）时，OD260/230 可以明显改善。
13. 弃去 RNA 柱子，把 RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。

方案 2. 从培养细胞中提取蛋白质、DNA 和 RNA (miRNA)

该方案适合于从 $2 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ 个细胞中提取蛋白质、DNA、RNA 和 mi 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 400~500 μ l Buffer RL 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，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 500 μ l Buffer RL。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. 用一次性 1ml 注射器(ZS100)或移液枪吸打混匀 5~10 次进一步匀浆细胞。

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。
4. 把 HiPure DNA Mini Column II 装在新的收集管中，按附加方案 3 进行 DNA 抽提。
5. 转移收集管中的滤液至 1.5ml 离心管中，加入 85 μ l Buffer MPP，涡旋混匀 15 秒。
6. 室温下，12,000 x g 离心 10 分钟，取蛋白质沉淀，按方案 4 的第 3 步进行蛋白质提取。
7. 转移上清液至新的离心管中，加入等倍体积的异丙醇至上清液，颠倒混匀 6-8 次。

8. 把 HiPure RNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。转移全部混合液至 RNA 柱子中。
12,000 × g 离心 30~60 秒。
9. 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。
10. 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。
11. 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。
12. 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。
13. 把柱子装在新的 1.5ml 离心管中，加入 15~100µl RNase Free Water 至柱子的膜中央。
室温静置 2 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 RNase Free Water 至柱子中进行洗脱。若细胞量
小于 1×10^6 ，推荐用 15~30µl RNase Free Water 至柱子中洗脱一次。
当 RNA 总量高于 10µg 时，OD_{260/230} 一般都在 1.3-2.2；当 RNA 总量在 5~10µg 时，
A_{260/230} 会在 0.7~2.0；当 RNA 总量低于 3µg，A_{260/230} 会低于 0.6。这是因为 Buffer
RTL、RW1 含异硫氰酸胍，以及玻璃滤膜有吸水性或本底吸附。异硫氰酸胍在 230nm 有强
烈吸光值，因此 A_{260/230} 主要受该胍盐影响，而不是来源于样品。研究表明，低浓度异
硫氰酸胍不影响反转录，定量 RT-PCR，二代测序等相关应用。出现 260/230 在 0.2-1.0 时，
可以忽略并直接用于反转录等下游应用。在不堵塞柱子的情况下，适量提高样品用量和裂
解液用量，提高核酸浓度（核酸总量 > 10µg）时，OD_{260/230} 可以明显改善。
14. 弃去 RNA 柱子，把 RNA 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 或方案 2)，以下离心都在室温下进行。

1. 取方案 1 或方案 2 的 HiPure DNA Mini Column II。
2. 把 HiPure DNA Mini Column II 装在 2ml 收集管中，加入 300 μ l Buffer RL 至柱子中，静置 3 分钟，12,000 \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。12,000 \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，12,000 \times g 离心 30-60 秒。
5. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。12,000 \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 50 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C RNase Free Water 或 Buffer TE 至柱子的膜中央。室温静置 3 分钟。12,000 \times g 离心 1 分钟。
7. 加入 50 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C RNase Free Water 或 Buffer TE 至柱子的膜中央。室温静置 3 分钟。12,000 \times g 离心 1 分钟。
8. 弃去 DNA 柱子，把 DNA 保存于-20 $^{\circ}$ C。

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。

1. 取方案 1 的第 7 步滤液，加入 4 倍体积的丙酮，颠倒混匀 6-8 次。室温静置 10 分钟。
2. 12,000 × g 离心 10 分钟，小心倒弃上清液。
3. 加入 1ml 75%乙醇，涡旋混匀 5 秒，颠倒混匀数次。室温放置 5 分钟。12,000 × g 离心 3 分钟，小心倒弃上清液。

取方案 2 的第 6 步的蛋白质沉淀，加入 1.0ml 75%乙醇，涡旋混匀。

4. 短暂离心收集液体，彻底吸弃液体，空气干燥 5-10 分钟。
5. 根据下游应用，加入 100-500 μ l 5% SDS 或其它缓冲液至蛋白质沉淀。

Buffer RL 含有高浓度的异硫氰酸胍，以灭活 DNase, Rnase 和 proteases。高浓度异硫氰酸胍会导致蛋白质的变性，而引起其溶解度下降。加入溶解液溶解时(如 PBS, TE 等)，需要涡旋较长的时间或用枪抽打打散沉淀的蛋白质。用 5% SDS 或 8M Urea 可快速让蛋白质的溶解。沉淀中含有细胞碎片或其它杂质无法被完全溶解，可离心去除。蛋白质溶解于 5% SDS 后，可直接用 BCA(bicinchoninic acid)法定量分析。蛋白质溶解于 8M Urea，稀释至 3M 后，也可用 BCA 法进行定量。溶液的体积取决于样品的用量和蛋白质含量。

6. 用研磨棒和移液枪吸打匀浆打散蛋白质沉淀。若蛋白质沉淀团较少，也可以用涡旋来打散沉淀团。

处理组织样品时，这一步得到的沉淀团会比较难于打散。建议把样品转移至 1.5ml 离心管中，然后用一次性研磨棒进行匀浆打散沉淀以提取产量。

7. 95°C 水浴 5 分钟溶解蛋白质，室温静置让样品恢复至室温。室温下，12,000 × g 离心 5 分钟去除不溶解的物质。
8. 转移上清液至新的 1.5ml 离心管中，然后保存于 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 20 μ l 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。