

## AllPure RNA and Nature Protein Kit

细胞 RNA 和天然蛋白共提试剂盒

### 产品简介

本产品适合于从 $\leq 5 \times 10^6$ 个培养细胞样品中同时提取得到RNA和天然蛋白质。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。

### 产品组份

产品编号	R5213-01	R5213-02	R5213-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns	10	50	250
gDNA Filter Mini Columns	10	50	250
2ml Collection Tubes	30	150	750
Buffer RNP	10 ml	40 ml	180 ml
Buffer RLC	10 ml	30 ml	150 ml
Buffer RVW1	5 ml	50 ml	250 ml
Buffer RVW2 *	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
RNase Free Water	1 ml	10 ml	30 ml
说明书	1	1	1

### 保存条件

本产品可在室温(15~25°C)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°C，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。

## 方案 1. 细胞总 RNA 和天然蛋白质共提取

该方案适合于从  $\leq 5 \times 10^6$  个真核培养细胞样品中提取高达 50 $\mu$ g 总 RNA 和天然的总蛋白质。以下离心均在室温下进行。

### 1. 细胞的收集

- **悬浮细胞：**300  $\times$  g 离心 5 分钟收集细胞，用 PBS 洗涤一次。
- **贴壁细胞：**吸弃培养液，用 PBS 洗涤一次。

### 2. 加入适量的 Buffer RNP 至样品中，用移液枪吸打 10~15 次混匀，室温静置 10 分钟。

- $>1 \times 10^6$  个培养细胞，加入 600 $\mu$ l Buffer RNP
- 12 孔培养板，每孔加入 250 $\mu$ l Buffer RNP
- 24 孔培养板，每孔加入 200 $\mu$ l Buffer RNP
- 48 孔培养板，每孔加入 150 $\mu$ l Buffer RNP
- 96 孔培养板，每孔加入 100 $\mu$ l Buffer RNP

注：根据样品和所需的蛋白质，可以加入适量的蛋白酶抑制剂至 Buffer RNP 中。

### 3. 把 gDNA Filter Mini Column 装在 2ml 收集管中，转移全部裂解液至柱子中。12,000 $\times$ g 离心 1 分钟。

### 4. 转移滤液至新的离心管中，保存滤液用于天然蛋白质制备。

## 总 RNA 抽提

### 5. 把 gDNA Filter Mini Column 装在 2ml 收集管中，加入 500 $\mu$ l Buffer RLC 至柱子，静置 5 分钟。12,000 $\times$ g 离心 1 分钟，丢去 gDNA 柱子。

### 6. 加入 0.5 倍体积的无水乙醇至滤液中，用移液器吸打混匀 3~5 次。

### 7. 把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中，转移混合液至柱子中。12,000 $\times$ g 离心 30-60 秒。

### 8. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中，加入 500 $\mu$ l Buffer RW1 至柱子中。12,000 $\times$ g 离心 30-60

秒。

9. 倒弃滤液,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。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所示进行稀释。
10. 倒弃滤液,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。12,000  $\times$  g 离心 30-60 秒。
11. 倒弃滤液,把柱子重新装回收集管中, 12,000  $\times$  g 离心空柱 3 分钟甩干柱子的基质。
12. 把 RNA 柱子装在新的 1.5ml 离心管中。加入 15~50 $\mu$ l RNase Free Water 至柱子的膜中央。室温静置 2 分钟。12,000  $\times$  g 离心 1 分钟。弃去 RNA 柱子,把 RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。

## 蛋白质抽提

13. 取第 4 步获得的滤液,采用脱盐柱 (Sephedex G-50) 或丙酮沉淀回收进行蛋白质的纯化 (任选一种进行操作)。

### A. 丙酮沉淀回收

- (1) 加入 4 倍体积冰冷的丙酮至滤液中,颠倒混匀 6-8 次,冰上放置 15~30 分钟。
- (2) 4 $^{\circ}$ C, 12,000  $\times$  g 离心 10 分钟,小心倒弃上清液。
- (3) 短暂离心收集残液,吸尽残液,室温干燥 5-10 分钟。
- (4) 加入适量缓冲液(如 PBS, SDS 溶解,或其它缓冲液)至沉淀,吸打或涡旋溶解蛋白质。

### B. 脱盐纯化

- (1) 按分子克隆指南制备 Sephadex G-50。
- (2) 按滤液的 10-20 倍体积准备 Sephadex G-50 脱盐柱。
- (3) 把滤液转移至脱盐柱中。离心脱盐即可。

## 常见问题回答

该列表可能有利于您解决在提取过程中所碰到的问题。Magen 技术人员可随时为您提供咨询服务，若您对试剂盒存在疑问或有良好的建议，又或者您在分子生物学实验中碰到问题，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>	
样品不充分打散或匀浆	参照样品的打散及匀浆，提高样品的裂解效果； 减少样品的用量或增加裂解液 RTL 的用量和延长匀浆时间； 若样品含有丰富的蛋白质，推荐使用 HiPure Tissue RNA Kit。
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必要条件；
裂解液加入乙醇之前，需要离心	处理组织，酵母和、细菌时，裂解液在加入乙醇之前需要离心去除不溶的杂质。沉淀中含有细胞碎片会引起柱子的堵塞。处理某些组织样品时，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。
<b>RNA 产物中 DNA 污染</b>	
样品用量太多或样品中基因组 DNA 含量丰富	有些细胞或组织含有丰富的基因组 DNA。减少组织或细胞的用量。 进行 DNase 膜上处理彻底去除 DNA。
<b>下游实验结果不理想</b>	
盐分污染	加入 Buffer RW2 后，静置 5 分钟后，再离心
乙醇污染	确保空柱离心速度高于或等于 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。脱落到质粒中硅胶膜是不溶解的，可能过 12,000xg 离心 2 分钟去除。

若以上的解答还是无法解决您的问题，请您联系我们。