

AipPure 组织/细胞(miRNA/RNA/DNA/ Protein)分离提取试剂盒(离心柱型)
AipPure Tissue/Cell(miRNA/RNA/DNA/Protein) Isolation and Extraction Kit(Centrifugal Column)

使用说明书

- ◆版本号：231103
- ◆目录号：MR302
- ◆试剂盒组成、储存、稳定性：

试剂盒组成	保存	50 次(MR302-01)
裂解液 RLT Plus	室温	50mL
Wash Solution 1	室温	12mL 第一次使用前加入 28mL 无水乙醇
Wash Solution 2/3	室温	10mL 第一次使用前加入 42mL 无水乙醇
RNase-free Water	室温	10mL
抑制物去除液 IR	室温	25mL
漂洗液 WB	室温	15mL 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 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组织样品中，同时提取分离基因组 DNA 和包含 miRNA 的总 RNA 和 Protein(如另购 miRNA 吸附柱和配套溶液，还可将同一个样品的总 RNA 和 miRNA 分离并提取，富集 miRNA)。
- ◆**产品储存：**本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。不合适的储存于低温(4°C 或者 -20°C)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°C - 25°C)进行。
- ◆**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 和包括 miRNA 的总 RNA 和 Protein。配备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 RNA/miRNA/DNA/Protein 同时通过一个基因组 DNA 吸附柱，基因组 DNA 被吸附而 miRNA/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 miRNA/RNA 用乙醇调节结合条件后, miRNA/RNA 在高离序盐状态下选择性吸附于 miRNA/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 miRNA/RNA。滤液经选择性沉淀得到 Protein。本试剂盒是在无苯酚、氯仿的 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 miRNA/RNA/基因组 DNA 纯度高, 互不干扰。得到的 miRNA/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 等相关试验。

◆产品特点:

1. 操作安全, 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 miRNA/RNA/DNA/Protein 分离操作一般可在 1 小时内完成。
3. 爱普科学独家吸附柱和溶液配方确保高效清除基因组 DNA 残留, 一般情况下得到的 miRNA/RNA 无需 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 miRNA/RNA/基因组 DNA 的高纯度, 可直接用于下游相关实验。

◆注意事项:

1. Wash Solution 1、Wash Solution 2/3和漂洗液WB加入无水乙醇后, 可以在常温密封保存。Wash Solution 2/3可能加入乙醇使用几天后出现沉淀晶体, 并不影响使用, 直接不吸晶体, 吸上清使用即可。
2. 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°C水浴加热几分钟, 即可恢复澄清。
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。
4. 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。
5. 样品处理量绝对不要超过基因组DNA清除柱和和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 3×10^6 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 $3-4 \times 10^6$, 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。
6. 裂解液RLT Plus、抑制物去除液IR、Wash solution 1、Wash solution 2/3中含有刺激性化合物, 操作时需穿防护服并佩戴一次性手套, 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。

7. **预防RNase污染及实验前的准备:** 经常更换新手套, 因为皮肤经常带有细菌, 可能导致RNase污染。使用RNase-free的塑料制品和枪头避免交叉污染。RNA提取过程中应使用RNase-free的塑料和玻璃器皿。玻璃器皿可在150°C烘烤4小时, 塑料器皿可在0.5M NaOH 中浸泡10分钟, 然后用水彻底清洗, 再灭菌, 即可去除RNase。配制溶液应使用RNase-free的水或DEPC水(DEPC水的制备: 将水加入到干净的玻璃瓶中, 加入DEPC至终浓度0.1%(v/v), 37°C放置过夜, 高压灭菌)。
8. 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/miRNA/RNA提取, 如有需要请咨询我们, 可能需要用到其它试剂。
9. 如购买额外miRNA吸附柱子和配套溶液, 还可以将同一个样品的总RNA和miRNA分离并提取, 富集miRNA。如有需要请咨询我们。
10. **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), 本公司的组织/细胞miRNA/RNA/DNA/Protein分提试剂盒(货号: MR302), 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。

◆ **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Wash Solution 1、Wash Solution 2/3和漂洗液WB瓶中按照标签提示加入指定量无水乙醇! 并打钩做好标记避免重复加入!

一、 **样品处理**

<p>培养细胞: (悬浮或贴壁)</p>	<ol style="list-style-type: none"> 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($<5 \times 10^6$细胞)或600μL(5×10^6-1×10^7细胞)裂解液RLT Plus, 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$<1 \times 10^5$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
---------------------------------	--

	<p>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。</p> <p>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)。</p> <p>6) 13,000rpm 离心30秒,保留滤过液(miRNA/RNA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°C度备用。</p> <p>注: 确保离心后液体全部滤过,膜上没有残留,如有必要,可以加大离心力和离心时间。</p>
<p>动物组织: (例如鼠肝脑)</p>	<p>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 Plus后电动彻底匀浆20-40秒。</p> <p>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 Plus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。</p> <p>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)。</p> <p>4) 13,000rpm 离心30秒,保留滤过液(miRNA/RNA/Protein在滤过液中)。DNA吸附柱上(膜上吸附有基因组DNA),短时间可存放4°C,备用用于基因组DNA提取。</p> <p>注: 确保离心后液体全部滤过,膜上没有残留,如有必要,可以加大离心力和离心时间。</p>

二、以下步骤为提取 RNA 步骤:

1. 样品处理后,用微量移液器较精确估计滤过液体积(350μL或600μL左右,滤过时损失体积应该减去),加入1.25倍体积的无水乙醇,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。
2. 立刻将混合物(每次小于700μL,多可以分两次加入)加入一个RNA吸附柱中,(吸附柱放入收集管中)13,000rpm 离心30秒,保留滤过液以备用于提取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)的离心管内保存在4°C,备用用于后续的Protein提取。
注: 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内保存在4°C,备用用于后续的基因组DNA提取。
3. 加入700μL Wash Solution 1(请先检查是否已加入无水乙醇!),12,000rpm 离心30秒,弃掉废液。

4. 加入500 μ L Wash Solution 2/3(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500 μ L Wash Solution 2/3, 重复操作一遍。
5. 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。
6. 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入30-50 μ L 的RNase-free Water, 室温放置1分钟, 12,000rpm 离心1分钟, 收集RNA溶液, -70 $^{\circ}$ C保存RNA, 防止降解。

注: 如果预期RNA产量>30 μ g, 加30-50 μ L RNase-free Water重复步骤10操作, 合并两次洗脱液; 如果需要RNA浓度高, 可使用第一次的洗脱液重新加回到吸附柱重复步骤操作10。洗脱两遍的RNA洗脱液浓度高, 分两次洗脱合并洗脱液的RNA产量高, 比前者高15-30%, 但是浓度要低, 用户根据实验需要自行选择。

三、以下步骤为提取 DNA 步骤:

1. 在RNA提取步骤2保存的DNA吸附柱和收集管的DNA吸附柱上(膜上吸附有基因组DNA)加入500 μ L抑制物去除液IR, (吸附柱放入收集管中)12,000rpm 离心30秒, 弃废液。
2. 加入700 μ L漂洗液WB(请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000rpm 离心30秒, 弃掉废液。
3. 加入500 μ L漂洗液WB, 12,000rpm 离心30秒, 弃掉废液。
4. 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。
5. 取出DNA吸附柱, 放入新的无酶离心管中, 在吸附膜的中间部位加100 μ L洗脱缓冲液EB(洗脱缓冲液如果事先在65-70 $^{\circ}$ 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, 收集DNA溶液存放在2-8 $^{\circ}$ C, 如果需长时间存放, 可以放置在-20 $^{\circ}$ C保存。

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50 μ L, 体积小降低DNA洗脱效率, 减少DNA产量。

四、以下步骤为提取 Protein 步骤:

1. 在RNA提取步骤2保存的滤过液以备用提取Protein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。
2. 13,000rpm 离心5-10分钟, 小心弃上清。加入0.5mL 70%乙醇, 颠倒混匀后离心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。
3. 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。

4. 将蛋白沉淀溶解于30-150 μ L 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 Plus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: 如果需要BCA蛋白定量, 可能需要把8M 尿素稀释到3M浓度。

5. 95 $^{\circ}$ C放置5分钟溶解和变性蛋白, 恢复到室温, 最高速离心1分钟, 取上清进行SDS-PAGE电泳或Western Blot等相关试验。

◆附录 1: microRNA 相对富集方法(microRNA/去除了 microRNA 的总 RNA 分别提取)

提示: 第一次使用前请先在 Wash Solution 1 和 Wash Solution 2/3 瓶中按照标签提示加入指定量无水乙醇! 并打钩做好标记避免重复加入!

1. 首先按照样品处理步骤操作, 准备好裂解匀浆液或者离心后的上清。
2. 在裂解匀浆液或离心后的上清加入一半体积的无水乙醇(0.5 体积), 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。
3. 将混合物(每次小于 720 μ L, 多可以分两次加入)加入一个基因组 DNA 清除柱中, (清除柱放入收集管中)12,000rpm 离心 2 分钟, 保留滤液(microRNA 在滤液中)。

注: 此时滤过液含有 microRNA, 基因组 DNA 清除柱内溶液是去除了 microRNA 的总 RNA(不包含 microRNA), 如果需要, 可以按照前面 RNA 提取操作步骤 3-6 操作, 漂洗、洗脱回收得到去除了 microRNA 的总 RNA。

4. 用微量移液器较精确估计滤过液体积, 加入等体积无水乙醇(必须是室温!), 涡旋或者吹打充分混匀, 不要离心。
5. 立刻将混合物(每次小于 700 μ L, 多可以分两次加入)加入一个吸附柱 RA 中, (吸附柱放入收集管中)12,000rpm 离心 2 分钟, 弃掉废液。

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

6. 按照前面 RNA 提取操作步骤 3-6 操作, 漂洗、洗脱得到富集的 microRNA。

注意: 不同的实验可以选择不同的方法, 例如 Northern-Blot 或者表达芯片谱分析可以选择提取包括 microRNA 的总 RNA。相对富集方法提取的 microRNA 因为去除了较大片段的 mRNA 和 rRNA 等, 可能减少某些下游试验的扩增背景, 当背景较高或者非特异扩增较多时, 可以尝试使用相对富集方法提取的 microRNA。总的原则是首选提取使用总 RNA(包含了 microRNA)做实验, 只有确实使用总 RNA(包含

microRNA)效果不佳的时候,或者实验设计要求必须富集分离 microRNA 和 mRNA,才尝试采用富集 microRNA 的方法。

=====

