



AllPure DNA/RNA/Protein Kit

DNA/RNA/Protein 提取试剂盒

目录号：CW0591S (50 preps)

保存条件：室温 (15-30°C)

产品内容

Component	CW0591S 50 preps
Buffer RL	35 mL
Buffer RW1	40 mL
Buffer RW2 (concentrate)	11 mL
RNase-Free Water	10 mL
Buffer GW1 (concentrate)	13 mL
Buffer GW2 (concentrate)	15 mL
Buffer GE	15 mL
Buffer PZ	60 mL
Buffer PLS	15 mL
Spin Columns DM with Collection Tubes	50
Spin Columns RM with Collection Tubes	50
Collection Tubes (2 mL)	100
RNase-Free Centrifuge Tubes (1.5 mL)	100

产品简介

本试剂盒适用于从同一细胞或组织样本中同时分离纯化基因组DNA、总RNA和总蛋白。本产品无需将样品分为3份来分别提取DNA、RNA和蛋白质，也无需先将纯化后的总核酸分为两份后再分别纯化DNA和RNA，因此可最大限度的回收DNA、RNA和蛋白质，可以用于少量样品、珍稀样品的核酸和蛋白纯化。纯化后的DNA、RNA和蛋白质可被单独洗脱，可直接应用于下游多种分子生物学操作。本试剂盒中不包含苯酚和氯仿等有毒物质，无需乙醇沉淀，操作简单、快捷。提取的基因组DNA可用于PCR、Real-time PCR、Southern Blot、Dot Blot、比较基因组杂交 (CGH)、基因分析和SNP分析；总RNA可应用于RT-PCR、cDNA的合成、Northern Blot、Dot Blot和基因芯片等实验；总蛋白可应用于电泳和Western Blot等。

自备试剂

β -巯基乙醇（新开封或提取RNA专用）、70%乙醇（用无RNase的水配制）、无水乙醇。

实验前准备及重要注意事项

1. 预防RNase污染，应注意以下几方面：
 - 1) 使用无RNase的塑料制品和枪头，避免交叉污染。
 - 2) 玻璃器皿应在使用前于180℃高温下干烤4小时，塑料器皿可在0.5 M NaOH中浸泡10分钟，用水彻底冲洗后高压灭菌。
 - 3) 配制溶液应使用无RNase的水。
 - 4) 操作人员戴一次性口罩和手套，实验过程中要勤换手套。
2. 样品应避免反复冻融，否则影响提取DNA、RNA和蛋白质的质量。样品在Buffer RL中，可于-70℃保存一个月。
3. Buffer RL在使用前请加入 β -巯基乙醇，1mL Buffer RL加10 μ L β -巯基乙醇。加入 β -巯基乙醇的Buffer RL室温可保存1个月。
4. 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明在Buffer RW2、Buffer GW1和Buffer GW2中加入无水乙醇。
5. 使用前请检查Buffer RL是否出现结晶或者沉淀，如有结晶或者沉淀，请置于56℃水浴重新溶解。
6. 所有离心步骤均使用台式离心机，室温下进行。

操作步骤

1. 材料处理

1a. 贴壁培养的细胞应先处理为细胞悬液(最大提取量为 10^7 个细胞), 收集细胞, 弃尽培养液, 加入600 μ L Buffer RL (用前检查是否已加入 β -巯基乙醇), 反复吹打使其充分裂解。

注意:一定要弃尽培养液, 否则影响裂解和后续的核酸纯化步骤。

1b. 取不大于30 mg的动物组织, 液氮研磨成细粉末, 加入600 μ L Buffer RL (用前检查是否加入 β -巯基乙醇), 或直接加入600 μ L Buffer RL (使用前检查是否已加入 β -巯基乙醇), 匀浆处理。

注意:匀浆要充分, 否则影响RNA产量。

2. 将上步所得溶液12,000 rpm (~13,400 $\times$ g) 离心3-5分钟, 小心的将上清加入到已装入收集管吸附柱DM (Spin Columns DM) 中, 12,000 rpm离心30-60秒, 收集滤液。将吸附柱DM放在一个新的2mL收集管中, 室温或4 $^{\circ}$ C放置, 待提DNA。

注意:确保吸附柱上没有液体残留, 如果有必要可以重复离心, 直至所有的液体通过吸附柱的膜。

总RNA提取

3. 向步骤2所得滤液中加入1倍体积的70%乙醇(无RNase水配制), 混匀。
4. 将上步所得溶液全部加入到已装入收集管的吸附柱 (Spin Columns RM) 中, 若一次不能全部加完溶液, 可分次转入。12,000 rpm离心20秒, 保留收集管中的液体, 用于蛋白提取。
5. 将吸附柱RM放入一个新的2 mL收集管中, 向吸附柱RM中加入700 μ L Buffer RW1, 12,000 rpm离心20秒, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱RM放回收集管中。
6. 向吸附柱RM中加入500 μ L Buffer RW2 (使用前检查是否已加入无水乙醇), 12,000 rpm离心20秒, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱RM放回2 mL收集管中。
7. 重复步骤6。

8. 12,000 rpm离心2分钟, 倒掉收集管中的废液。将吸附柱置于室温数分钟, 以彻底晾干。

注意:此步骤目的是去除吸附柱中残余的乙醇, 乙醇的残留会影响后续的酶促反应(酶切、PCR等)。

9. 将吸附柱RM置于一个新的无RNase的1.5 mL离心管中, 向吸附柱RM的中间部位加入30-50 μ L RNase-Free Water, 室温放置2-5分钟, 12,000 rpm离心1分钟, 收集RNA溶液, -70 $^{\circ}$ C保存RNA, 防止降解。

注意: 1) RNase-Free Water体积不应小于30 μ L, 体积过小影响回收率。

2) 如果要提高RNA的产量, 可用30-50 μ L新的RNase-Free Water重复步骤9。

3) 如果要提高RNA浓度, 可将得到的溶液重新加入到吸附柱中, 重复步骤9。

基因组DNA提取

10. 向吸附柱DM中加入500 μ L Buffer GW1 (使用前检查是否已加入无水乙醇), 12,000 rpm 离心20秒, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱DM放回收集管中。
11. 向吸附柱 DM中加入500 μ L Buffer GW2 (使用前检查是否已加入无水乙醇), 12,000 rpm 离心2分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱DM放回收集管中。

注意: 如需进一步提高DNA纯度, 可重复步骤11。

12. 12,000 rpm离心2分钟, 倒掉收集管中的废液。将吸附柱DM置于室温数分钟, 以彻底晾干吸附柱中的乙醇。

注意: 这一步的目的是将吸附柱中残余的乙醇去除, 乙醇的残留会影响后续的酶促反应 (酶切、PCR等)。

13. 将吸附柱DM置于一个新的离心管中, 向吸附柱DM的中间部位悬空加入100 μ L BufferGE, 室温放置2-5分钟, 12,000 rpm离心2分钟, 收集DNA溶液, -20 $^{\circ}$ C保存DNA。

注意: 1) Buffer GE的体积不应小于100 μ L, 体积小影响回收率。

2) 如果要提高DNA的产量, 将100 μ L新的Buffer GE加至吸附柱上, 重复步骤13; 如果要提高DNA浓度, 可以将步骤13所得的DNA洗脱液重新加至吸附柱上, 重复步骤13。

蛋白质提取

14. 在提取RNA流出液 (即步骤4所得溶液) 中加入1倍体积的Buffer PZ, 充分混匀, 室温放置10-30分钟。
15. 12,000 rpm离心10分钟, 弃上清。
16. 加入500 μ L 70%乙醇, 12,000 rpm离心1分钟, 尽可能吸尽上清。
17. 将离心管置于室温数分钟, 以晾干沉淀。

注意: 这一步的目的是将残余的乙醇去除, 过分干燥会使蛋白沉淀难于溶解, 干燥不彻底残留的乙醇会影响蛋白上样。

18. 加入100 μ L Buffer PLS, 得到蛋白溶液。

注意: 1) 采用Buffer PLS溶解得到的蛋白样品适用于SDS-PAGE和Western Blot检测, 但不适用于Bradford方法进行蛋白定量, 如需采用Bradford方法进行蛋白定量可采用5%SDS溶解蛋白, 或根据下游试验选择合适的蛋白溶解缓冲液。

2) 加入溶解蛋白缓冲液的量根据初始样本量及下游试验具体要求来确定。

3) 溶解的蛋白可置于-20 $^{\circ}$ C保存数月, 置于2-8 $^{\circ}$ C保存数天。

蛋白样品如需进行SDS-PAGE电泳可进行如下操作:

19. 蛋白样品中加入蛋白Loading Buffer, 95 $^{\circ}$ C变性5-10分钟, 将样品冷却至室温。
20. 12,000 rpm离心1分钟, 吸取上清进行下游的SDS-PAGE或Western blot等试验。