

## 动物组织/细胞 RNA & DNA 小量提取试剂盒

### 一、产品简介

本试剂盒适合从 ≤25mg 动物组织、≤5×10<sup>6</sup> 动物细胞(包括培养细胞、分离的白细胞和淋巴细胞)中分别提取 RNA 和 DNA。

裂解液 Buffer RLA 含高浓度异硫氰酸胍, 快速裂解细胞释放 RNA 和 DNA 的同时协同 β-巯基乙醇迅速抑制内源 RNase。裂解液直接加入 DNA 吸附柱-RD 中, 完整的 DNA 被选择性吸附, RNA 保留于滤液中; 加入异丙醇调整结合条件, 过滤枪头去除可能析出的蛋白和动物糖原, RNA 吸附柱-A 有效吸附大分子 RNA (包括 rRNA 和 mRNA, 不包括 tRNA 和降解为 5S 的小 RNA)。

后续 Buffer RW1 洗涤去除残留的蛋白, Buffer RW2 洗涤去除残留的盐, 使用去离子水洗脱 RNA, 获得的 RNA 已去除大部分 tRNA 和降解为 5S 的小 RNA, 可直接用于 5'RACE 和 3'RACE。

DNA 吸附柱-RD 可根据实验需要通过两种方法处理获得不同纯度和完整性的 DNA。高完整性 DNA 提取方法: 获得的 DNA 纯度低、产量低, 但完整性高可达到 150 kb, 可用于 Southern、酶切和常规 PCR。高纯度 DNA 提取方法(需单独订购试剂): 获得的 DNA 长度为 20-30 kb, 产量和纯度高于前者, 可用于芯片和质谱。

### 二、试剂盒组成和储存

组成内容	RK401-01 (20 次)	RK401-02 (50 次)	原理与用途
Buffer RLA <sup>*</sup>	15 ml	35 ml	裂解样品、抑制内源 RNase
Buffer RW1	25 ml	60 ml	洗涤去蛋白
Buffer RW2 <sup>‡</sup>	7 ml	16 ml	洗涤 RNA 吸附柱-A, 去盐
diH <sub>2</sub> O <sup>§</sup>	15 ml	15 ml	洗脱 RNA
Buffer WB1 <sup>‡</sup>	7 ml	16 ml	洗涤 DNA 吸附柱-RD, 去盐
TE <sup>¶</sup>	15 ml	30 ml	洗脱 DNA
DNA 吸附柱-RD	20 个	50 个	截留样品碎片、吸附完整的 DNA
1 ml 枪头	20 个	50 个	与过滤枪头配套使用
过滤枪头	20 个	50 个	去除可能析出的蛋白和动物糖原
RNA 吸附柱-A	20 个	50 个	吸附 RNA
收集管	40 个×2	50 个×4	接收滤液
1.5 ml 离心管	20 个×2	50 个×2	接收洗脱的 RNA 或 DNA
说明书	1 份	1 份	

<sup>\*</sup>Buffer RLA: 第一次使用前按试剂瓶所示体积加入 β-巯基乙醇至终浓度为 1%, 室温放置一周稳定, 重复加入 β-巯基乙醇至 5% 不影响使用效果; 储存温度低于 10°C 时, 会析晶体状不溶物, 需 37-56°C 加热溶解, 并且恢复至室温后使用。

<sup>‡</sup>Buffer RW2、Buffer WB1: 试剂瓶内为浓缩液, 第一次使用前按照试剂瓶所示体积加入无水乙醇, 混合均匀。

<sup>§</sup>diH<sub>2</sub>O: 无 DNase & RNase, 不含 NaN<sub>3</sub> 等防腐剂, 用于洗脱 RNA, 建议分装后存放于 4°C 避免污染和长菌。

TE: 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 0.025% NaN<sub>3</sub>, pH 8.0(25°C), 用于洗脱 DNA。

所有试剂盒组成成分为室温储存。

**高纯度 DNA 提取试剂:** 请按实验需要单独订购

组成内容	适用于 RK401-01(20 次)	适用于 RK401-02 (50 次)
Buffer DE	10 ml	25 ml
Buffer GB	10 ml	25 ml
Buffer WAG	15 ml	30 ml
Proteinase K <sup>°</sup>	0.2 ml	0.5 ml
收集管	20 个	50 个

<sup>°</sup>Proteinase K: 20 mg/ml, 室温保存。可能会析出白色粉末状、絮状或者晶体状不溶物, 不影响使用效果, 使用前混合均匀。

所有组成成分为室温储存。

### 三、安全注意事项

1. Buffer RLA、Buffer RW1、 Buffer DE 和 Buffer WAG 含刺激性化合物，避免沾染皮肤、眼睛和衣服、谨防吸入口鼻。若沾染皮肤、眼睛，立即使用大量水或生理盐水冲洗沾染处，必要时寻求医疗咨询。
2. RNA 或者 DNA 洗脱步骤，如果离心机转子没有盖子或者使用气密型盖子，在将 1.5ml 离心管盖子扣在吸附柱上后，务必去除吸附柱的盖子(剪掉或者拧断，见相应步骤图示)；因为高速离心时未扣在吸附柱上的盖子容易脱落，造成安全隐患。

### 四、RNA 提取操作流程



## 五、实验准备

1. 异丙醇。
2. 第一次使用前，在 Buffer RW2 和 Buffer WB1 中按试剂瓶标签注明体积加入无水乙醇，混合均匀。  
**！加入 Buffer RW2 的乙醇和量取乙醇的容器需提取 RNA 专用，如果没有合适的容器量取乙醇，可根据乙醇的密度计算重量直接加入试剂瓶中。**  
无水乙醇的密度为 0.7893 g/ml，20 ml 无水乙醇为 15.8 g，45 ml 无水乙醇为 35.5 g，185 ml 无水乙醇为 146 g。
3.  $\beta$ -巯基乙醇。第一次使用前按试剂瓶所示体积在 Buffer RLA 中加入  $\beta$ -巯基乙醇至终浓度为 1%，室温放置一周稳定，重复加入  $\beta$ -巯基乙醇至 5% 不影响使用效果；如果实验间隔时间较长，也可以在每次使用时加入 Buffer RLA 1% 体积的  $\beta$ -巯基乙醇。
4. 动物组织需准备合适的匀浆器材。
5. **八、高纯度 DNA 提取方法**需准备 56℃ 温箱。
6. 可选：65-70℃ 预热 diH<sub>2</sub>O 和 TE，能提高洗脱效率。预热 diH<sub>2</sub>O 能使 RNA 二级结构均一化，有利于电泳鉴定。

## 六、RNA 提取操作步骤

所有离心时间按使用台式快速离心机设定，通常 10 秒内可达最高转速/离心力；如使用慢升速离心机，离心时间需延长 30 秒。

所有离心条件为室温；如未注明离心力，均为 12,000-16,000×g；如离心机只能设定转速，设定为低于最高转速 1,000 rpm。

RNA 吸附柱-A 中加入溶液后可能会有白色纤维层从底部脱落悬浮于溶液中，不影响使用效果。

### 1. 匀浆：保持实验的连贯性，事项准备好匀浆器材，Buffer RLA 中加入 $\beta$ -巯基乙醇

#### A. $\leq 25$ mg 动物组织

称取  $\leq 25$  mg 动物组织放入合适的离心管中，立即加入 600  $\mu$ l Buffer RLA (如未在试剂瓶中加入  $\beta$ -巯基乙醇或者加入后时间超过一周，在此步骤加入 6  $\mu$ l  $\beta$ -巯基乙醇)，使用研磨棒或者匀浆机迅速匀浆直至无可见的块状组织，室温放置 5 min (不超过 2 小时)。继续操作步骤 2；

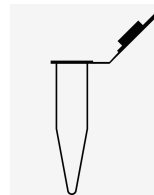
！松软的组织比如脑脊髓，可以使用研磨棒匀浆，应选择与研磨棒匹配的尖底离心管；

！电动匀浆机更容易打碎韧性的组织，应选择圆底或者底部带棱角的离心管，匀浆时用探头将样品压在离心管底部，匀浆时间不超过 30 秒。

！不要使用超声匀浆。

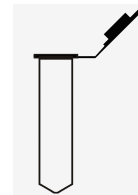
！如果平行处理多个样品，应逐个取样，充分匀浆后再进行下一个样品处理。匀浆液在室温放置 2 小时内稳定，或者 -20℃~-80℃ 冻存长期保存。

！冻存的组织应在解冻前加入 Buffer RLA 进行匀浆，取出样品后可根据经验迅速剪切合适大小的组织块放入事先已加入 Buffer RLA 的离心管中。



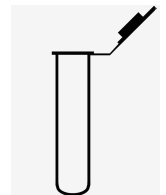
尖底离心管

适合使用研磨棒



底部带棱角的离心管

适合电动匀浆机



圆底离心管

适合电动匀浆机

#### B. $\leq 5 \times 10^6$ 动物细胞

**培养的悬浮细胞：**估算细胞数量，300×g 离心 5min，收集  $\leq 5 \times 10^6$  细胞，倒弃上清，简短离心，仔细吸除残留的培养基；轻弹离心管底部使细胞沉淀呈松散状，加入 600  $\mu$ l Buffer RLA (如未在试剂瓶中加入  $\beta$ -巯基乙醇或者加入后时间超过一周，在此步骤加入 6  $\mu$ l  $\beta$ -巯基乙醇)，用 1ml 枪头快速吹打 10 次，室温放置 5 min (不超过 2 小时)。继续操作步骤 2；

**平皿中的贴壁细胞：**估算  $\leq 5 \times 10^6$  细胞，仔细吸除培养基，加入 600  $\mu$ l Buffer RLA (如未在试剂瓶中加入  $\beta$ -巯基乙醇或者加入后时间超过一周，在此步骤加入 6  $\mu$ l  $\beta$ -巯基乙醇)，用细胞刮刀/铲收集细胞和 Buffer RLA 至平皿一侧，用 1ml 枪头快速吹打 10 次，室温放置 5 min (不超过 2 小时)。继续操作步骤 2；

**分离的白细胞、淋巴细胞：**估算  $\leq 5 \times 10^6$  细胞，仔细吸除液体，轻弹离心管底部使细胞沉淀呈松散状，加入 600  $\mu$ l Buffer RLA (如未在试剂瓶中加入  $\beta$ -巯基乙醇或者加入后时间超过一周，在此步骤加入 6  $\mu$ l  $\beta$ -巯基乙醇)，用 1ml 枪头快速吹打 10 次，室温放置 5 min (不超过 2 小时)。继续操作步骤 2；

### 2. 将匀浆液转入 DNA 吸附柱-RD (置于收集管中)，7000×g 离心 30 秒；离心后按顺序保留 DNA 吸附柱-RD 和收集管。

偶尔会有溶液残留在预过滤柱-RD 中，这种情况说明起始样品量已超 DNA 吸附柱-RD 承载能力，应减少起始样品量；

不要通过延长离心时间或提高离心力使溶液完全滤下，因为被堵塞的 DNA 吸附柱-RD 在长时间高速离心下会出现局部裂缝失去预过滤作用。

### 3. 实验准备：根据样品数量，在离心管架上放置 2 排干净的收集管，其中一排放入 RNA 吸附柱-A，并按顺序编号；

### 4. 将 DNA 吸附柱-RD 连同收集管按顺序放置于离心管架上；

**DNA 吸附柱-RD：**转入步骤 3 准备的干净的收集管中，按照七、高完整性 DNA 提取方法或者八、高纯度 DNA 提取方法提取 DNA，

1 小时内进行操作不影响实验结果；

**收集管中的滤液：**加入 150  $\mu$ l 异丙醇，将移液器调至 1 ml，用试剂盒携带的 1 ml 枪头缓慢吹吸 3 次，吸取全部溶液；

将 1 ml 枪头紧插在过滤枪头，缓慢吹打使溶液滤过滴入 RNA 吸附柱-A (置于收集管中)。

如过滤枪头未插紧，溶液不能完全滤过；重新插紧过滤枪头，再次吹打。继续操作步骤 5；

### 5. 离心 1 min，弃废液，将 RNA 吸附柱-A 放回收集管中。

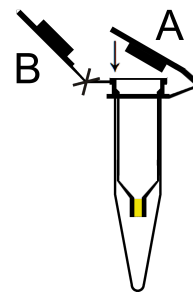
以下步骤注意避免外源 RNase 污染：更换手套，使用 RNA 专用的移液器和枪头，从试剂瓶中吸取试剂时避免移液器接触试剂瓶内缘。

- 加入 **500  $\mu$ l Buffer RW1**，离心 1 min，丢弃收集管，将 RNA 吸附柱-A 放入另外一个干净的收集管中。
- 加入 **700  $\mu$ l Buffer RW2**，离心 1 min，弃废液，将 RNA 吸附柱-A 放回收集管中。
- 加入 **100  $\mu$ l Buffer RW2**，离心 2 min。
- 将 RNA 吸附柱-A 转入试剂盒携带的 1.5 ml 离心管中，在硅胶膜中央加  $\geq 15 \mu$ l diH<sub>2</sub>O，将 1.5 ml 离心管盖(A)扣在 RNA 吸附柱上，做好标记，去除 RNA 吸附柱的盖子(B)。离心 1 min。

▲65-70°C 预热 diH<sub>2</sub>O 能提高 RNA 的洗脱效率；并且高温能使 RNA 二级结构均一化，有利于电泳鉴定。

▲重复洗脱可以提高洗脱效率。重复洗脱的两种方法：

- 洗脱的 RNA 溶液转入 RNA 吸附柱中进行洗脱，获得的 RNA 浓度高于方法 b；
- 重新加入洗脱液进行洗脱，洗脱效率高于方法 a。

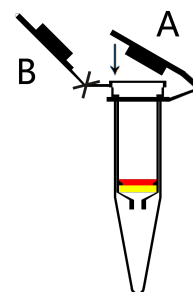


## 七、高完整性 DNA 提取方法

样品在 Buffer RLA 中匀浆后 DNA 未与蛋白完全解离，以较弱的方式吸附于 DNA 吸附柱-RD，可以减少离心时机械力对 DNA 的损伤，可获得完整性较高的 DNA。后续 Buffer RW1 洗涤去除残留的蛋白(不完全)，Buffer WB1 洗涤去除残留的盐，TE 或低盐溶液洗脱 DNA(不充分)，获得的 DNA 产量和纯度偏低，但可以满足 Southern、酶切和常规 PCR 等实验的要求。

### 续：六、RNA 提取操作步骤 4

- 在 DNA 吸附柱-RD 中加入 **500  $\mu$ l Buffer RW1**，室温放置 1-2 min 或更长时间，离心 1 min，弃废液，将 DNA 吸附柱-RD 放回收集管中。
- 加入 **500  $\mu$ l Buffer WB1**，离心 1 min，弃废液，将 DNA 吸附柱-RD 放回收集管中。
- 重复步骤 2。
- 离心 2 min。
- 将 DNA 吸附柱-RD 转入试剂盒携带的 1.5 ml 离心管中，在硅胶膜中央加  $\geq 50 \mu$ l TE 或去离子水(pH $\geq 7.0$ )，将 1.5 ml 离心管盖(A)扣在 DNA 吸附柱上，做好标记，去除 DNA 吸附柱的盖子(B)。离心 1 min。



## 八、高纯度 DNA 提取方法

Buffer DE 溶解 DNA，配合蛋白酶 K 充分降解残留的蛋白，加入 Buffer GB 调整结合条件后 DNA 再次吸附于 DNA 吸附柱-RD，此时充分与蛋白解离的 DNA 与硅胶材料多位点结合，离心力将 DNA 剪切为 20-30 kb 片段。后续 Buffer WAG 洗涤去除残留的蛋白(充分)，Buffer WB1 洗涤去除残留的盐，TE 或者低盐溶液洗脱 DNA(充分)，可满足于芯片和质谱的要求。

### 续：六、RNA 提取操作步骤 4

- 在 DNA 吸附柱-RD 中加入 **400  $\mu$ l Buffer DE** 和 **10  $\mu$ l Proteinase K**，缓慢吹打 3 次，56°C 温箱中放置 10 min 或更长时间。  
! 温培期间会有少量溶液滴入收集管中，不影响效果，在操作步骤 2 结束前不要丢弃收集管。
- DNA 吸附柱-RD：转入另外一个干净的收集管中，按顺序保留原先的收集管，在 DNA 吸附柱-RD 中加入 **350  $\mu$ l Buffer GB**，原先的收集管中的液体：吸取液体合并入 DNA 吸附柱-RD 中，缓慢吹打 3 次混合均匀。
- 离心 1 min，弃废液，将 DNA 吸附柱-RD 放回收集管中。
- 加入 **500  $\mu$ l Buffer WAG**，离心 1 min，弃废液，将 DNA 吸附柱-RD 放回收集管中。
- 加入 **500  $\mu$ l Buffer WB1**，离心 1 min，弃废液，将 DNA 吸附柱-RD 放回收集管中。
- 重复步骤 2。
- 离心 2 min。
- 将 DNA 吸附柱-RD 转入试剂盒携带的 1.5 ml 离心管中，在硅胶膜中央加  $\geq 50 \mu$ l TE 或去离子水(pH $\geq 7.0$ )，将 1.5 ml 离心管盖(A)扣在 DNA 吸附柱上，做好标记，去除 DNA 吸附柱的盖子(B)。离心 1 min。

