

**Animal Tissue and Cell DNA/RNA Extraction Kit****动物组织细胞 DNA/RNA 共提取试剂盒****说明书****【产品简介】**

本试剂盒的抽提试剂采用独特的配方和添加剂，能高效的裂解细胞和组织，在短时间内同时分别分离 DNA 和 RNA，还可以有效地抑制各种外源性和内源性的核酸酶，同时结合特制的纯化柱，能最大限度的保持核酸的完整性、高得率以及纯度。

**【试剂盒组成】**

试剂盒组成	LN-0113A (50 次)	LN-0113B (100 次)
RNase A	100µl	200µl
DNase Buffer	100µl	200µl
DNase I	50µl	100µl
裂解液 LB	40ml	80ml
吸附液 BEH	4ml	8ml
漂洗液 WB1	40ml	80ml
漂洗液 WB2	30ml	2×30ml
洗脱液 EB	3×2ml	12ml
DNA 离心纯化柱	50 个	100 个
RNA 离心纯化柱	50 个	100 个
说明书	1 份	1 份

**注意:** 使用前请按照标签提示在漂洗液 WB1 中适量无水乙醇, 漂洗液 WB2 中加入适量无水乙醇。储存时, DNase I 和 RNase A 在-20℃保存。

**【试剂运输及储存条件】**

试剂运输可在常温环境下进行。储存时, 室温保存。一年有效。

**【操作步骤】**

1. A: 从组织中提取总 DNA 和 RNA, 在冷冻的研钵中切下约 10mg 深层冷冻的组织样品, 并用电子天平称量。然后立即将该组织转移至加有 700µl 裂解液 LB 的无核酸酶的离心管中, 用电动匀浆机在冰浴中匀浆组织约 15s 直到看不见明显的组织块, 之后操作见第 2 步。

**注意:** 组织样品应储存于液氮或低温冰箱(-80℃)。该实验流程只适用于在小于 30mg 的组织样品中抽提核酸。

B: 从细胞样品中提取 DNA 和 RNA, 先把培养皿或培养瓶置于冰上, 弃尽培养液, 用预冷的 1XPBS 洗涤细胞两次。然后加入 700µl 裂解液 LB, 用细胞刮刮下所有细胞, 将裂解物转移至无核酸酶的 1.5ml 离心管中, 充分振荡 30s, 之后操作见第 3 步。

**注意:** 1. 试剂盒中不提供 1XPBS, 可另外配制。2. 重悬细胞还可以先将细胞 2000xg, 离心 3min, 用 1XPBS 洗涤后再加入 500µl 裂解液 LB。3. 该实验流程只适用于从少于  $1 \times 10^6$  细胞中提取核酸。

2. 往裂解物中加入 50µl 吸附液 BEH (如加入 0.1% 的巯基乙醇效果更佳), 振荡混匀 5s。

3. 把裂解物于室温静置 1min 后, 加入 0.5ml 三氯甲烷, 小心盖上管盖, 剧烈摇动 15s。**注意: 请不要漩涡震荡。**

4. 将离心管再次置于室温 1min, 4℃, 12,000xg 离心 15min。将上清水相转移至另一新的无核酸酶离心管中, 并加入等体积的 10% 异丙醇, 用移液器轻柔吹打混匀。**注意: 10% 异丙醇需自行按比例配制。**

**基因组 DNA 提取**

5. 立即吸取 700µl 样品以及有可能形成的沉淀, 加入带有 2ml 收集管的 DNA 离心纯化柱。轻盖盖子, 11,000xg, 室温离心 1min, 收集流穿液在另一新的 1.5ml 离心管中。

**注意:** 完成穿流液收集后, 立即将穿流液置于冰浴, 待后续 RNA 提取中使用。

6. 将剩余的样品转移至离心柱, 重复第 6 步。

7. 向每份样品的膜中央滴加 20µl RNase A 消化液, 室温静置 20min。每份样品所需 RNase A 消化液量的配制如下。



组份	用量/样品
RNase A	2 $\mu$ l
DEPC ddH <sub>2</sub> O	18 $\mu$ l
总体积	20 $\mu$ l

8. 往离心柱中加入700 $\mu$ l漂洗液WB1, 轻盖盖子, 室温放置2min, 11,000xg, 室温离心15s, 弃尽废液。

**注意: 第一次使用前请确认是否已经往漂洗液WB1中加入适量无水乙醇。**

9. 往离心柱中加入500 $\mu$ l漂洗液WB2, 11,000xg, 室温离心15s, 弃尽废液。重复步骤洗涤一次。

**注意: 第一次使用前请确认是否已经往漂洗液WB2中加入适量无水乙醇。完全去除洗液对最后溶解是非常重要的, 洗液的残留会影响最终的洗脱。**

10. 11,000 x g离心空柱1min干燥硅胶膜。

11. 将离心柱转移至新的无核酸酶的1.5ml离心管中, 往硅胶膜中央滴加60 $\mu$ l洗脱液EB, 轻盖管盖, 室温静置1min, 11,000xg离心1min洗脱DNA。

12. 把洗脱液滴加回硅胶膜重复第14步洗脱。

13. 如需后续操作, 请始终将溶解的DNA至于冰上, 保存请置于-80 $^{\circ}$ C。

#### 总RNA提取

6. 如需抽提总RNA, 则在上述**第5步**收集的流穿液中加入等体积的无水乙醇, 漩涡震荡3s后立即吸取700 $\mu$ l样品以及有可能形成的沉淀, 加入带有2ml收集管的RNA离心纯化柱。轻盖盖子, 11,000xg, 室温离心1min, 弃尽废液。**注意: 流穿液可能较多, 需分管操作。**

7. 将剩余的样品转移至离心柱, 重复第7步。

8. 向每份样品的膜中央滴加20 $\mu$ l DNase消化液, 室温静置20min。DNase消化液配制见下表。

组份	用量/样品
DNase Buffer	2 $\mu$ l
DNase I	1 $\mu$ l
DEPC ddH <sub>2</sub> O	17 $\mu$ l
总体积	20 $\mu$ l

9. 往离心柱中加入700 $\mu$ l漂洗液WB1, 轻盖盖子, 室温放置2min, 11,000xg, 室温离心15s, 弃尽废液。

10. 往离心柱中加入500 $\mu$ l漂洗液WB2, 11,000xg, 室温离心15s, 弃尽废液。重复步骤洗涤一次。

11. 11,000xg离心空柱2min干燥硅胶膜。

12. 将离心柱转移至新的无核酸酶的1.5ml离心管中, 往硅胶膜中央滴加50 $\mu$ l洗脱液EB, 轻盖管盖, 室温静置1min, 11,000xg离心1min洗脱RNA。**注意: 洗脱体积不宜小于50 $\mu$ l, 否则会影响洗脱效果。**

13. 把洗脱液滴加回硅胶膜重复第15步洗脱。

14. 如需后续操作, 请始终将溶解的RNA至于冰上, 保存请置于-80 $^{\circ}$ C。

#### 【RNA定量】

**实例: 用常规比色皿测量RNA浓度。**

RNA样品总体积: 50 $\mu$ l

稀释因子, 1:100 (10 $\mu$ l RNA样品+990 $\mu$ l无核酸酶高压灭菌水)

A260读值: 0.20 (在1ml比色皿中测量)

因此, RNA样品浓度=40 $\times$ A260 $\times$ 稀释因子=40 $\times$ 0.20 $\times$ 100=800 $\mu$ g/ml

RNA样品的得率=800 $\times$ 0.05=40 $\mu$ g

#### 【DNA定量】

**实例: 用常规比色皿测量RNA浓度。**

DNA样品总体积: 50 $\mu$ l

稀释因子, 1:100 (10 $\mu$ l DNA样品+990 $\mu$ l无核酸酶高压灭菌水)

A260读值: 0.20 (在1ml比色皿中测量)

因此, DNA样品浓度=50 $\times$ A260 $\times$ 稀释因子=50 $\times$ 0.20 $\times$ 100=1000 $\mu$ g/ml

DNA样品的得率=1000 $\times$ 0.05=50 $\mu$ g

**注: 本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床治疗、食品及化妆品等用途。**