

版本号: DP151216

# DNA/RNA/Protein Isolation Kit

## DNA/RNA/蛋白质共提取试剂盒

(离心柱型)

目录号: DP423

### 产品内容

产品组成	DP423 (50 preps)
裂解液RL (Buffer RL)	30 ml
去蛋白液RW1 (Buffer RW1)	40 ml
漂洗液RW(Buffer RW)	12 ml
RNase-Free ddH <sub>2</sub> O	15 ml
RNase-Free吸附柱CR3 (含2 ml收集管) (RNase-Free Spin Column CR3 in a 2 ml Collection Tube)	50套
DNA吸附柱 CB3 (Spin Columns CB3)	50个
缓冲液GD (Buffer GD)	13 ml
漂洗液PW (Buffer PW)	15 ml
洗脱缓冲液TB (Buffer TB)	15 ml
RNase-Free离心管 (1.5 ml) (RNase-Free Centrifuge Tubes 1.5 ml)	100 个
RNase-Free离心管 (2 ml) (RNase-Free Centrifuge Tubes 2 ml)	50 个
RNase-Free收集管 (2 ml) (RNase-Free Collection Tubes 2 ml)	50个
蛋白沉淀剂PR (Buffer PR)	220 ml
蛋白溶解缓冲液SP (Buffer SP)	15 ml

---

## 选配试剂

DNaseI (目录号: RT411)

## 储存条件

加入  $\beta$ -巯基乙醇的裂解液RL 4°C 可放置一个月; 其他试剂室温保存一年。

## 产品简介

本试剂盒可从培养的动物细胞或者组织中快速同步提取DNA、总RNA和蛋白质, 可同时处理大量不同样品。

## 预防RNase污染, 应注意以下几方面

1. 经常更换新手套。因为皮肤经常带有细菌, 可能导致RNase污染。
2. 使用无RNase的塑料制品和枪头避免交叉污染。
3. RNA在裂解液RL中时不会被RNase降解。但提取后继续处理过程中应使用不含RNase的塑料和玻璃器皿。玻璃器皿可在150°C烘烤4 h, 塑料器皿可在0.5 M NaOH中浸泡10 min, 然后用水彻底清洗, 再灭菌, 即可去除RNase。
4. 配制溶液应使用无RNase的水。(将水加入到干净的玻璃瓶中, 加入DEPC至终浓度0.1%(V/V), 放置过夜, 高压灭菌。)

## 使用前注意事项

1. 操作前在RL中加入  $\beta$ -巯基乙醇至终浓度为1%, 如1 ml RL中加入10  $\mu$ l  $\beta$ -巯基乙醇。此裂解液最好现用现配。配好的RL 4°C 可放置一个月, 裂解液RL在储存时可能会形成沉淀, 如果有沉淀出现, 请加热至56°C溶解并平衡至室温后使用。
2. 第一次使用前应在漂洗液RW、PW和缓冲液GD中加入无水乙醇, 加入量请参见瓶上标签。
3. 以下操作如非指明, 均在室温下进行。
4. 对于某些敏感的RNA应用实验可能需要完全去除DNA, 可以参照DNase I 消化流程在柱上进行。

## 一. 从培养细胞中同时提取DNA和总RNA

### 1. 收集细胞:

悬浮细胞的收集（收集细胞数量请不要超过 $1 \times 10^7$ ）：估计细胞数量， $300 \times g$ 离心5 min，将细胞收集到离心管中，仔细吸除所有培养基上清。

单层贴壁细胞的收集（收集细胞数量请不要超过 $1 \times 10^7$ ）：可直接在培养容器中裂解（容器直径不超过10 cm），或者使用胰蛋白酶处理后离心收集细胞沉淀。（在摇瓶中培养的单层贴壁细胞通常采用胰蛋白酶处理的方法。）

- 1) 直接裂解法：确定细胞数量，彻底吸除细胞培养基上清，立即进行第2步裂解步骤。
- 2) 胰蛋白酶处理法：确定细胞数量，吸除培养基，用PBS洗涤细胞，吸除PBS，向细胞中加入含有0.10-0.25%胰蛋白酶的PBS处理细胞，当细胞脱离容器壁时，加入含有血清的培养基失活胰蛋白酶，将细胞溶液转移至1.5 ml RNase-Free的离心管中， $300 \times g$ 离心5 min，收集细胞沉淀，仔细吸除所有上清。

**注意：**收集细胞时一定要将细胞培养液去除干净，否则会导致裂解不完全，影响RNA与吸附柱的结合，造成RNA的产量降低。

### 2. 裂解处理:

对于离心得到的细胞沉淀：轻弹离心管底部，使细胞沉淀松散，加入适量裂解液RL（见下表，使用前请先检查是否已加入 $\beta$ -巯基乙醇），漩涡震荡30 sec。

沉淀细胞数量	裂解液RL( $\mu$ l)
$<5 \times 10^6$	350
$5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$	600

对于直接裂解的细胞：RL（见下表，使用前请先检查是否已加入 $\beta$ -巯基乙醇），将细胞裂解液转移至离心管中，漩涡震荡30 sec。

容器直径 (cm)	裂解液RL( $\mu$ l)
$<6$	350
6-10	600

- 
3. 将所有溶液转移至DNA吸附柱CB3 (吸附柱CB3放在2 ml RNase-Free离心管中), 12,000 rpm (~13,400×g) 离心30-60 sec, 收集滤液。将吸附柱CB3放在收集管中室温或4℃放置至后续提取DNA。

## 总RNA提取

4. 向滤液中加入1倍体积70%乙醇 (通常为350 μl或600 μl), 混匀 (此时可能会出现沉淀), 得到的溶液和沉淀一起转入RNase-Free 吸附柱CR3中 (RNase-Free 吸附柱CR3放入离心管(此管自备)中), 12,000 rpm(~13,400×g)离心30-60 sec, 保留离心管中的液体 (用于沉淀蛋白), 将RNase-Free 吸附柱CR3放入收集管中。

**注意: 配制70%乙醇时请使用RNase-Free ddH<sub>2</sub>O, 如果滤液体积有所损失, 请相应减少70%乙醇用量。将溶液和沉淀转移至RNase-Free 吸附柱CR3时, 如果体积大于吸附柱容量, 可以分两次完成。**

5. 向RNase-Free 吸附柱CR3中加入700 μl 去蛋白液RW1, 12,000 rpm(~13,400×g)离心30-60 sec, 倒掉收集管中的废液, 将RNase-Free 吸附柱CR3放回收集管中。
6. 向RNase-Free 吸附柱CR3中加入500 μl 漂洗液RW (使用前请先检查是否已加入乙醇), 室温静置2 min, 12,000 rpm(~13,400×g)离心30-60 sec, 倒掉收集管中的废液, 将RNase-Free 吸附柱CR3放回收集管中。

7. 重复步骤6。

8. 12,000 rpm(~13,400×g)离心2 min, 倒掉废液。将RNase-Free 吸附柱CR3置于室温放置数分钟, 以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

**注意: 此步骤目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除, 离心后将RNase-Free 吸附柱CR3在室温放置片刻, 以充分晾干。如果有漂洗液残留, 可能会影响后续的RT等实验。**

9. 将RNase-Free 吸附柱CR3转入一个新的1.5 ml RNase-Free离心管中, 加入100 μl RNase-Free ddH<sub>2</sub>O室温放置2 min, 12,000 rpm(~13,400×g)离心2 min, 得到RNA溶液。

**注意: 洗脱缓冲液体积不应少于30 μl, 体积过小影响回收效率。RNA溶液请于-70℃保存。**

---

## 基因组DNA提取

10. 向DNA吸附柱CB3中加入500  $\mu$ l 缓冲液GD（使用前请先检查是否已加入乙醇），12,000 rpm (~13,400  $\times$  g)离心30-60 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CB3放回收集管中。
11. 向吸附柱CB3中加入500  $\mu$ l 漂洗液PW（使用前请先检查是否已加入乙醇），室温静置2 min，12,000 rpm (~13,400  $\times$  g)离心30-60 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CB3放回收集管中。
12. 重复步骤11。
13. 12,000 rpm (~13,400  $\times$  g)离心2 min，倒掉废液。将吸附柱CB3置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

**注意：**此步骤目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除，离心后将吸附柱CB3在室温放置片刻，以充分晾干。如果有漂洗液残留，可能会影响后续的RT等实验。

14. 将吸附柱CB3转入一个新的1.5 ml RNase-Free离心管中，加入100  $\mu$ l洗脱缓冲液TB，室温放置2 min，12,000 rpm (~13,400  $\times$  g)离心2 min，得到DNA溶液。

蛋白质提取流程见说明书第8页。

## 二、从动物组织中同步提取DNA和总RNA

### 1. 匀浆处理：

切割小块组织加入适量裂解液RL（见下表，使用前请先检查是否已加入 $\beta$ -巯基乙醇），用电动或玻璃匀浆器将组织彻底研磨。旋涡震荡30 sec。

起始组织量	裂解液RL( $\mu$ l)
10-20 mg	350
$\geq 20$ mg	600

**注意：**组织量一定不要超过30 mg，否则将导致RNA得率和质量下降。

- 
2. 12,000 rpm( $\sim 13,400 \times g$ )离心3-5 min, 小心吸取上清至DNA吸附柱CB3 (吸附柱CB3放在2 ml RNase-Free离心管中), 12,000 rpm( $\sim 13,400 \times g$ )离心30-60 sec, 收集滤液。将吸附柱CB3放在收集管中室温或4 $^{\circ}$ C放置至后续提取DNA。

## 总RNA提取

3. 向滤液中加入1倍体积70%乙醇 (通常为350  $\mu$ l或600  $\mu$ l), 混匀 (此时可能会出现沉淀)。

**注意: 配制70%乙醇时请使用RNase-Free ddH<sub>2</sub>O, 如果滤液体积有所损失, 请相应减少70%乙醇用量。**

4. 得到的溶液和沉淀一起转入RNase-Free 吸附柱CR3中 (RNase-Free 吸附柱CR3放入2 ml RNase-Free离心管中), 12,000 rpm( $\sim 13,400 \times g$ )离心30-60 sec, 保留离心管中的液体 (用于沉淀蛋白), 将RNase-Free 吸附柱CR3放入收集管中。

**注意: 将溶液和沉淀转移至RNase-Free 吸附柱CR3时, 如果体积大于吸附柱容量, 可以分两次完成。**

5. 向RNase-Free 吸附柱CR3中加入700  $\mu$ l 去蛋白液RW1, 12,000 rpm( $\sim 13,400 \times g$ )离心30-60 sec, 倒掉收集管中的废液, 将RNase-Free 吸附柱CR3放回收集管中。

6. 向RNase-Free 吸附柱CR3中加入500  $\mu$ l 漂洗液RW (使用前请先检查是否已加入乙醇), 室温静置2 min, 12,000 rpm( $\sim 13,400 \times g$ )离心30-60 sec, 倒掉收集管中的废液, 将RNase-Free 吸附柱CR3放回收集管中。

7. 重复步骤6。

8. 12,000 rpm( $\sim 13,400 \times g$ )离心2 min, 倒掉废液。将RNase-Free 吸附柱CR3置于室温放置数分钟, 以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

**注意: 此步骤目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除, 离心后将RNase-Free 吸附柱CR3在室温放置片刻, 以充分晾干。如果有漂洗液残留, 可能会影响后续的RT等实验。**

9. 将RNase-Free 吸附柱CR3转入一个新的1.5 ml RNase-Free离心管中, 加入100  $\mu$ l RNase-Free ddH<sub>2</sub>O室温放置2 min, 12,000 rpm( $\sim 13,400 \times g$ )离心2 min, 得到RNA溶液。

**注意: 洗脱缓冲液体积不应少于30  $\mu$ l, 体积过小影响回收效率。RNA溶液请于-70 $^{\circ}$ C保存。**

---

## 基因组DNA提取

10. 向DNA吸附柱CB3中加入500  $\mu\text{l}$  缓冲液GD (使用前请先检查是否已加入乙醇)，12,000 rpm (~13,400 $\times$ g)离心30-60 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CB3放回收集管中。
11. 向吸附柱CB3中加入500  $\mu\text{l}$  漂洗液PW (使用前请先检查是否已加入乙醇)，室温静置2 min，12,000 rpm (~13,400 $\times$ g)离心30-60 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CB3放回收集管中。
12. 重复步骤11。
13. 12,000 rpm (~13,400 $\times$ g)离心2 min，倒掉废液。将吸附柱CB3置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。  
**注意：此步骤目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除，离心后将吸附柱CB3在室温放置片刻，以充分晾干。如果有漂洗液残留，可能会影响后续的RT等实验。**
14. 将吸附柱CB3转入一个新的1.5 ml RNase-Free离心管中，加入100  $\mu\text{l}$ 洗脱缓冲液TB，室温放置2 min，12,000 rpm (~13,400 $\times$ g)离心2 min，得到DNA溶液。

## DNase I 消化流程（可选）

DNase I储存液的配制：将DNase I干粉（1500 U）溶解在550  $\mu\text{l}$  RNase-Free ddH<sub>2</sub>O中，轻柔混匀，分装后-20 $^{\circ}\text{C}$ 贮存（可保存9个月）。

**注意：从-20 $^{\circ}\text{C}$ 融化后的DNase I储存液保存于4 $^{\circ}\text{C}$ （可保存6周），不要再次冻存。**

1. 按照总RNA提取流程1-4步进行提取。
2. 向RNase-Free 吸附柱CR3中加入350  $\mu\text{l}$  去蛋白液RW1，12,000 rpm (~13,400 $\times$ g)离心30-60 sec，弃废液，将吸附柱放回收集管中。
3. DNase I工作液的配制：取10  $\mu\text{l}$  DNase I 储存液放入新的1.5 ml RNase-Free离心管中，加入70  $\mu\text{l}$  RDD溶液，轻柔混匀。

- 
4. 向RNase-Free 吸附柱CR3中央加入80  $\mu$ l的DNase I 工作液，室温放置15 min。
  5. 向RNase-Free 吸附柱CR3中加入350  $\mu$ l 去蛋白液RW1，12,000 rpm( $\sim$ 13,400  $\times$  g)离心30-60 sec，弃废液，将吸附柱放回收集管中。
  6. 按照RNA提取流程6-9步进行提取。

## 蛋白质提取

1. 将提取完RNA的流出液中加入四倍体积的冷丙酮（客户自备）或蛋白沉淀剂PR，充分混匀，冰上或-20 $^{\circ}$ C放置10-30 min。（请根据体积选择相应的离心管，离心管客户自备）。  
**注意：丙酮沉淀后的蛋白比PR沉淀的蛋白难溶解，但是沉淀的蛋白量较多，可根据试验的需要来选择。**

2. 12,000 rpm，4 $^{\circ}$ C，离心10 min，弃上清。
3. 加入100  $\mu$ l冰冷的95%乙醇于沉淀中，4 $^{\circ}$ C，最大转速离心1 min，用移液器吸出上清，尽可能去除上清。
4. 室温干燥沉淀。

**注意：干燥不彻底也许会由于乙醇的残留导致蛋白上样出现问题，过分干燥会使蛋白沉淀比较难溶。**

5. 加入100  $\mu$ l或适量的蛋白溶解缓冲液SP（采用缓冲液SP溶解之后的蛋白样品适用于SDS-PAGE及Western blot试验，但不适合采用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，亦可根据下游的试验选择适合的蛋白溶解缓冲液），加入的蛋白缓冲液的体积根据初始样本量及下游试验要求来确定。

## 蛋白样品如需进行SDS-PAGE电泳可进行如下操作：

6. 样品中加入蛋白loading buffer，95 $^{\circ}$ C变性5-10 min，然后冷却样品至室温。
7. 最大转速离心1 min，沉淀残余的未溶解物质，吸取上清进行下游的试验如SDS-PAGE和Western Blot等。溶解的蛋白可以-20 $^{\circ}$ C保存数月或者4 $^{\circ}$ C数天。