4. 向RNase-Free 吸附柱CR3中央加入80 μl的DNase I 工作液，室温放置15 min。
5. 向RNase-Free 吸附柱CR3中加入350 μl 去蛋白液RW1，12,000 rpm(~13,400×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℃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℃，离心10 min，弃上清。
3. 加入100 μl冰冷的95%乙醇于沉淀中，4℃，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 μl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℃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℃保存数月或者4℃数天。

TIANGEN®
Order: 010-59822688
Toll-free: 800-990-6057 /400-810-6057
TIANGEN BIOTECH (BEIJING) CO., LTD

版本号: DP171221

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_2O	15 ml
RNase-Free吸附柱CR3 (含2 ml收集管) (RNase-Free Spin Column CR3 set)	50 套
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

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。

选配试剂

DNaseI (目录号：RT411)

储存条件

加入β-巯基乙醇的裂解液RL 4℃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℃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β-巯基乙醇至终浓度为1%，如1 ml RL中加入10 μl β-巯基乙醇。此裂解液最好现用现配。配好的RL 4℃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℃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。

基因组DNA提取

10. 向DNA吸附柱CB3中加入500 μl 缓冲液GD （**使用前请先检查是否已加入乙醇**），12,000 rpm (~13,400×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 μl 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×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×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 μl洗脱缓冲液TB，室温放置2 min，12,000 rpm(~13,400×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 μl RNase-Free ddH_2O中，轻柔混匀，分装后-20℃贮存（可保存9个月）。

注意：从-20℃融化后的DNase I储存液保存于4℃（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 μl 去蛋白液RW1，12,000 rpm(~13,400×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 μl DNase I 储存液放入新的1.5 ml RNase-Free离心管中，加入70 μl RDD溶液，轻柔混匀。

2. 12,000 rpm(~13,400×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(~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

3. 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）。

   注意：配制70%乙醇时请使用RNase-Free ddH$_2$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(~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：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$_2$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。

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1×10^7）：估计细胞数量，300×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1×10^7）：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×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β-巯基乙醇**），旋涡震荡30 sec。

沉淀细胞数量	裂解液RL(μl)
<5×10^6	350
5×10^6-1×10^7	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β-巯基乙醇**），将细胞裂解液转移至离心管中，涡旋震荡30 sec。

容器直径（cm）	裂解液RL(μl)
<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$_2$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$_2$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 μl 缓冲液GD （**使用前请先检查是否已加入乙醇**），12,000 rpm (~13,400×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 μl 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×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×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 μl洗脱缓冲液TB，室温放置2 min，12,000 rpm(~13,400×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β-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(μl)
10-20 mg	350
≥ 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。