

# 操作手册

## 血清/血浆游离核酸（DNA/RNA）提取试剂盒

Catalog No. TD172-50 (50 次反应)

### Highlights

- 可从 3ml 以内的血清/血浆或其它液体样品中提取到高纯度的游离 DNA 和/或游离 RNA。
- 获得的 DNA 和 RNA 产量高、纯度好，可以直接用于高通量测序等分子生物学实验。
- 和同类产品比较，该试剂盒的结合体系最多可回收到 515x microRNA。

## 产品组成:

试剂盒组成	保存	50 次
蛋白酶 K	-20°C (混匀之后)	8x20 mg
蛋白酶 K 保存液	室温	8 x 1.2 ml
游离核酸消化液	室温	150 ml
游离核酸结合液	室温	2x150 ml
游离核酸回收液	室温	20 ml
游离核酸洗涤液 1	室温	100 ml
游离核酸洗涤液 2	室温	3x12 ml
DNase/RNase-free 水	室温	10 ml
1 号柱	室温	100 个
25ml 漏斗	室温	50 个
3 号柱 Y(黄色)	室温	50 个
收集管 (2ml)	室温	200 个

**Note** –售出后一年内产品质量是可以保证。试剂已经过大量的常规检测来保证其可操作性。此产品仅供研究并且需要由专业人员来使用。试剂盒中的部分试剂是有刺激性的。请带好手套和防护眼镜。

## 特性:

- **样品种类:** 最多 3ml 的血清, 血浆, 羊水, 脑脊液 (CSF), 尿液等液体样本。
- **纯度:** 获得的游离 DNA 和游离 RNA 可以直接用于 qPCR ,高通量测序等各种分子生物学实验。
- **片段大小:** DNA $\geq$ 50bp, RNA $\geq$ 17nt。
- **产量:** 本试剂盒针对无细胞的游离核酸提取经过优化, 总量根据不同的样品个体差异可能会比较大。一般从血清或血浆中提取到的游离 DNA 和游离 RNA 的浓度在 1-100 ng/ml。

- **需要的仪器设备:** 水浴锅或者金属浴。微型离心机，负压多联器或立式离心机。
- **操作时间:** 一般 30-45 分钟可以处理 10 个样品。样品消化步骤需要 2 个小时。

### 试剂制备:

1. 使用前需要添加1040 $\mu$ l蛋白酶K保存液到蛋白酶K (20mg)里。蛋白酶K的终浓度约为20mg/ml。混匀之后放在-20 $^{\circ}$ C保存
2. 使用前需要添加48 ml 95-100%的无水乙醇到12ml的游离核酸洗涤液。

### 操作步骤:平行提取游离DNA和游离RNA

所有的离心步骤均在 $\geq 12,000 \times g$ 的离心力下离心 30 秒除非特殊说明。

一般常温（20-30 $^{\circ}$ C）进行以下操作步骤。

1. 在 $\geq 12,000 \times g$ 的离心力下离心样品15分钟来去除细胞杂质和沉淀。
2. 按照每200 $\mu$ l样品（血浆，血清或其他生物液体样品）添加 200 $\mu$ l游离核酸消化液，放入一个15ml的离心管，混匀。如果样品体积 $\geq 1.5$ ml，则需要试用50ml的离心管。
3. 按照每200 $\mu$ l样品添加10 $\mu$ l的蛋白酶K溶液，涡旋混匀10秒，37 $^{\circ}$ C下孵育2小时。
4. 添加1体积的游离核酸结合液到消化的样品中并且涡旋混匀10秒。（例如400 $\mu$ l结合液到410 $\mu$ l的消化样品中。）
5. 添加1.5倍体积的100%的异丙醇到步骤4中的混合物中，涡旋混匀10秒。  
（例如1.2ml的异丙醇到810 $\mu$ l的混合物中。）

快速操作表格

样品体积	200 $\mu$ l	500 $\mu$ l	1 ml	3 ml (最大)
游离核酸消化液	200 $\mu$ l	500 $\mu$ l	1 ml	3 ml
蛋白酶 K	10 $\mu$ l	25 $\mu$ l	50 $\mu$ l	150 $\mu$ l
涡旋混匀并且在 37 $^{\circ}$ C下孵育 2 小时				
游离核酸结合液	400 $\mu$ l	1 ml	2 ml	6 ml
100%异丙醇	1.2ml	3 ml	6 ml	18 ml
总体积	2 ml	5 ml	10 ml	30 ml

6. 将 25ml 漏斗套到 3 号柱 Y(黄色)内，连接紧密后放置在负压多连器上。

7. 倒入上述步骤 6 的混合液，打开真空开关使液体完全通过柱子。确保液体完全通过柱子并且没有残留液体下流后，关闭真空泵并拔掉连接的 25ml 漏斗。
8. 倒入 600 $\mu$ l 游离核酸洗涤液 1 到柱子上，打开真空开关，让液体完全通过 3 号柱 Y(黄色)，关闭真空泵。
9. 将 3 号柱 Y(黄色)套在 2ml 收集管上，然后放置在台式离心机上全速离心 2 分钟以去除液体残留，然后将 3 号柱 Y(黄色)套在一个干净的 1.5ml 离心管内。
10. 添加 200 $\mu$ l 的游离核酸回收液到 3 号柱 Y(黄色)中，室温放置 3 分钟，离心，**保存滤出液**。

<b><u>滤出液：游离 RNA 分离</u></b>	<b><u>3 号柱 Y(黄色)：游离 DNA 分离</u></b>
A1. 添加 300 $\mu$ l 无水乙醇（95-100%）到滤出液中，混匀	B1. 将 3 号柱 Y(黄色)套在一个新的 2ml 收集管上。
A2. 将 1 号柱套在一个新的 2ml 收集管上。	B2. 添加 600 $\mu$ l 的游离核酸洗涤液 1，离心去除滤出液。
A3. 离心去除滤出液。	B3. 添加 700 $\mu$ l 的游离核酸洗涤液 2，离心去除滤出液。
A4. 继续步骤 11。	B4. 重复一次步骤 B3。
	B5. 将 3 号柱 Y(黄色)套在一个新的离心管内。
	B6. 添加 100 $\mu$ l 的 DNase/RNase-free 水到 3 号柱 Y(黄色)基质上，室温下放置 2 分钟然后离心，去除 3 号柱 Y(黄色)。
	B7. 添加 200 $\mu$ l 的游离核酸回收液到上述离心管内，混匀
	B8. 添加 300 $\mu$ l 无水乙醇（95-100%）到离心管内，混匀
	B9. 将 1 号柱套在一个新的 2ml 收集管上。离心去除滤出液。
	B10. 继续步骤 11。

11. 添加 400 $\mu$ l 的游离核酸洗涤液 1，离心去除滤出液。
12. 添加 700 $\mu$ l 的游离核酸洗涤液 2，离心去除滤出液。

13. 添加 400 $\mu$ l 的游离核酸洗涤液 2 到 1 号柱中，离心 2 分钟完全去除柱子上残留的液体，将 1 号柱转移到一个干净的离心管内。

14. 添加 15 $\mu$ l 的 DNase/RNase-free 水到柱基质上，放置 2 分钟然后离心来洗脱游离 DNA 或游离 RNA。

### **操作步骤:游离DNA和游离RNA共同提取**

所有的离心步骤均在  $\geq 12,000 \times g$  的离心力下离心 30 秒除非特殊说明。

一般常温（20-30 $^{\circ}$ C）进行以下操作步骤。

1. 在  $\geq 12,000 \times g$  的离心力下离心样品 15 分钟来去除细胞杂质和沉淀。
2. 按照每 200 $\mu$ l 样品（血浆，血清或其他生物液体样品）添加 200 $\mu$ l 游离核酸消化液体，放入一个 15ml 的离心管，混匀。如果样品体积  $\geq 1.5$ ml，则需要试用 50ml 的离心管。
3. 按照每 200 $\mu$ l 样品添加 10 $\mu$ l 的蛋白酶 K 溶液，涡旋混匀 10 秒，37 $^{\circ}$ C 下孵育 2 小时。
4. 添加 1 体积的游离核酸结合液到消化的样品中并且涡旋混匀 10 秒。（例如 400 $\mu$ l 结合液到 410 $\mu$ l 的消化样品中。）
5. 添加 1.5 倍体积的 100% 的异丙醇到步骤 4 中的混合物中，涡旋混匀 10 秒。  
（例如 1.2ml 的异丙醇到 810 $\mu$ l 的混合物中。）

快速操作表格

样品体积	200 $\mu$ l	500 $\mu$ l	1 ml	3 ml (最大)
游离核酸消化液	200 $\mu$ l	500 $\mu$ l	1 ml	3 ml
蛋白酶 K	10 $\mu$ l	25 $\mu$ l	50 $\mu$ l	150 $\mu$ l
涡旋混匀并且在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 2 小时				
游离核酸结合液	400 $\mu$ l	1 ml	2 ml	6 ml
100%异丙醇	1.2ml	3 ml	6 ml	18 ml
总体积	2 ml	5 ml	10 ml	30 ml

6. 将 25ml 漏斗套到 3 号柱 Y(黄色)内，连接紧密后放置在负压多连器上。

7. 倒入上述步骤 6 的混合液，打开真空开关使液体完全通过柱子。确保液体完全通过柱子并且没有残留液体下流后，关闭真空泵并拔掉连接的 25ml 漏斗。

8. 倒入 600 $\mu$ l 游离核酸洗涤液 1 到柱子上，打开真空开关，让液体完全通过 3 号柱 Y(黄色)，关闭真空泵。

9. 将 3 号柱 Y(黄色)套在 2ml 收集管上，然后放置在台式离心机上全速离心 2 分钟以去除液体残留，然后将 3 号柱

Y(黄色)套在一个干净的 1.5ml 离心管内。

10. 添加 100µl 的 DNase/RNase-free 水到 3 号柱 Y(黄色)中，室温放置 2 分钟，离心，去除 3 号柱 Y(黄色)。
11. 添加 200µl 的游离核酸回收液到上述离心管内，混匀
12. 添加 450µl 无水乙醇（95-100%）到离心管内，混匀
13. 将 1 号柱套在一个新的 2ml 收集管上。离心去除滤出液。
14. 添加 400µl 的游离核酸洗涤液 1，离心去除滤出液。
15. 添加 700µl 的游离核酸洗涤液 2，离心去除滤出液。
16. 添加 400µl 的游离核酸洗涤液 2 到 1 号柱中，离心 2 分钟完全去除柱子上残留的液体，将 1 号柱转移到一个干净的离心管内。
17. 添加 15µl 的 DNase/RNase-free 水到柱基质上，放置 2 分钟然后离心来洗脱游离核酸（游离 DNA 和游离 RNA）。

#### **附录1：处理保存在DNA/RNA Shield™保护剂中的样品**

对于保存在DNA/RNA Shield™保护剂(货号TR120)中的无细胞生物样品。采用下述改进的步骤进行操作。

1. 每1ml的DNA/RNA Shield溶液的样品添加25µl的蛋白酶K溶液，涡旋混匀10秒，37℃下孵育2小时。  
(例如：500µl的无细胞体液，500µl的DNA/RNA Shield保护剂，25µl蛋白酶K)
2. 添加1体积的游离核酸消化液到上述消化的样品中并且涡旋混匀10秒。  
(例如1ml游离核酸结合液到1ml的消化样品中)
3. 添加1体积的游离核酸结合液到到步骤2的混合物中并且涡旋混匀10秒。  
(例如2ml游离核酸结合液到2ml的混合物中)
4. 添加1.5倍体积的100%的异丙醇到步骤3中的混合物中，涡旋混匀10秒。  
(例如6ml的100%异丙醇到4ml的混合物中)

快速操作表格

样品体积(含保护剂)	200 µl	500 µl	1 ml	3 ml (最大)
蛋白酶 K	5 µl	12.5 µl	25 µl	75 µl
涡旋混匀并且在 37℃ 下孵育 2 小时				
游离核酸消化液	200µl	500µl	1 ml	3 ml
游离核酸结合液	400µl	1 ml	2 ml	6 ml
100%异丙醇	1.2ml	3 ml	6 ml	18 ml

总体积	2 ml	5 ml	10 ml	30 ml
-----	------	------	-------	-------

6. 接下来按照主操作步骤的第 6 步进行游离 DNA，游离 RNA，或者总游离核酸进行提取。