

操作手册

环境样品通用 DNA/RNA 提取试剂盒

Catalog No. TR202-50 (50 次反应)

Highlights

- 可从粪便，土壤，水样，生物膜，拭子，唾液，生物体液中快速提取到高纯度的 DNA/RNA(含 micro RNA)。
- 该产品创新的裂解体系可以完美裂解格兰仕阳性菌，阴性菌，原生生物，藻类，真菌，病毒。
- 获得的 DNA/RNA，产量高、纯度好，可以直接用高通量测序等下游分子生物学实验。

产品组成:

试剂盒组成	保存	50 次
裂解管	室温	50 个
核酸保护剂	室温	50 ml
DNA/RNA 裂解液	室温	50 ml
DNA/RNA 预洗液	室温	2X25 ml
DNA/RNA 洗涤液	室温	2X24 ml
抑制物去除液	室温	3X30 ml
DNase/RNase Free Water	室温	30 ml
DNase I(选配)	-20°C	1 管
DNA 消化液(选配)	室温	4 ml
蛋白酶 K 套装 (选配)	室温	1 套
抑制物去除柱	室温	100 个
3 号柱 Y(黄色)	室温	50 个
3 号柱 G(绿色)	室温	50 个
收集管 (2ml)	室温	300 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:** 可有效的从 200mg 以内的哺乳动物粪便, 250mg 以内土壤, 200mg 以内植物/种子和 50-100mg (湿重) 的真菌细菌细胞, 生物膜和水样中有效的提取到细菌, 真菌, 原生生物, 病毒, 线粒体和宿主 RNA,
- **纯度:** 获得的 DNA/RNA 产量高、纯度好, $A_{260}/A_{280} > 1.8$, $A_{260}/A_{230} > 1.8$, 提供 DNase I 去除痕量的 DNA, 得到的 DNA/RNA 可应用于高通量测序等各种分子生物学实验。

- 大小:可回收到 DNA 和 ≥ 17 核苷酸的 RNA。
- 产量: 3 号 G 的最大结合能力为 100 μg 。

试剂制备

DNA/RNA 洗涤液 在使用之前一定要配好, **添加好乙醇后在试剂瓶上做好标记!!!**

需要添加 96ml100%的乙醇 (或 104ml95%乙醇) 到 24ml 的 **DNA/RNA 洗涤液** 中
溶解冻干粉状态的 DNase I 需要按照管子上的量添加 RNase-free H₂O

一般250U的DNase I 需要添加275 μl 的DNase/RNase-free H₂O,终浓度为1U/ μl

操作步骤:

整个操作步骤是由2个步骤组成: (I) 样品裂解匀浆 (II) 核酸纯化

(I) 样品裂解匀浆

以下离心步骤均在 10,000-16,000 x g 下室温 (20-30 $^{\circ}\text{C}$) 离心 30 秒, 如无特殊说明。

样品类型	最大输入量
粪便	200mg
土壤	250mg
植物/种子	200 mg
液体样品	250 μl
细胞 (重悬在核酸保护剂中 或PBS等液体中)	50-100 mg (2×10^9 细菌, 2×10^8 酵母细胞, 2×10^7 哺乳动物细胞动物细胞)
样本保存液配套产品	750 μl

1. 直接添加样品到裂解管中, 然后添加 750 μl 的核酸保护剂到裂解管中, 拧紧盖子防止泄漏, 如果样品已经保存在添加了核酸保护剂的耗材中, 则直接进行第二步。

2. 在涡旋仪上最大速下振荡 5 分钟混匀。（如果使用高频振荡器时间可以适当缩短）
3. 离心裂解管 1 分钟。
4. 将上一步所得上清（最多 400 μ l）加到一个干净的 RNase-free 的离心管里。
5. 直接添加 2 倍体积的 DNA/RNA 裂解液（~800 μ l）到离心管里混匀。

(II) 核酸纯化

以下离心步骤均在 10,000-16,000 x g 下室温（20-30 $^{\circ}$ C）离心 30 秒，如无特殊说明。

针对不同的目的采用方案 A 或方案 B 进行样品纯化。

方案 A 总核酸（DNA 和 RNA）纯化步骤

1. 添加等体积的乙醇（95%-100%）~1200 μ l 混匀。
2. 将上述混合物放入套在收集管上的3号柱Y（黄色）里，离心。去除滤出液。
3. 添加400 μ l的DNA/RNA预洗液到3号柱Y（黄色）里，离心。去除滤出液。
4. 添加400 μ l的DNA/RNA洗涤液到3号柱Y（黄色）里，离心。去除滤出液。将柱子放入一个干净的1.5ml离心管内。
5. 在吸附膜的中间部位加100 μ l RNase-free 水，静置5分钟，离心洗脱粗提的总核酸（DNA和RNA）。
6. 添加2倍体积（~200 μ l）的DNA/RNA裂解液到粗提的总核酸中，混匀。
7. 添加等体积的乙醇（95%-100%）~300 μ l，混匀。
8. 将混合物添加到一个放入套在收集管上的3号柱G里，离心。去除滤出液。
9. 添加400 μ l的DNA/RNA预洗液到3号柱G（绿色）里，离心。去除滤出液。
10. 添加700 μ l的DNA/RNA洗涤液到3号柱G（绿色）里，离心。去除滤出液。
11. 添加400 μ l的DNA/RNA洗涤液到3号柱G（绿色）里，离心2分钟完全去除洗涤液残留。
12. 取出3号柱G，放入一个无RNA酶的离心管中，在吸附膜的中间部位加100 μ l RNase-free 水，静置5分钟，离心洗脱总核酸（DNA和RNA）。
13. 将抑制物去除柱套在一个收集管内，添加600 μ l的抑制物去除液，在 \geq 8,000 x g下离心3分钟。

14. 将洗脱的总核酸放入制备好的抑制物去除柱内，抑制物去除柱套在一个干净的1.5ml离心管内，并在16,000 x g下离心3分钟，得到的总核酸可进行后续试验。

方案 B DNA 或 RNA 分别纯化步骤

1. 将上述混合物~1200µl放入套在收集管上的3号柱Y（黄色）里，离心。保存滤出液用于RNA提取。保存柱子用于DNA提取。

DNA提取	RNA提取
<ol style="list-style-type: none"> 2. 将3号柱Y（黄色）套在一个新的收集管。 	<ol style="list-style-type: none"> 2. 添加等体积的乙醇（95%-100%）~1200µl 混匀。将上述混合物放入套在收集管上的 3 号柱 G(绿色)里，柱子的最大承载体积是 700µl，反复离心。去除滤出液。 (此步骤之后可选做DNase I 处理)

3. 添加400µl的DNA/RNA预洗液到柱里，离心。去除滤出液。
4. 添加700µl的DNA/RNA洗涤液到柱里，离心。去除滤出液。
5. 添加400µl的DNA/RNA洗涤液到柱里，离心。去除滤出液。将柱子放入一个干净的1.5ml离心管内。
6. 在吸附膜的中间部位加100µl RNase-free 水，静置5分钟，离心洗脱DNA或RNA。
7. 将抑制物去除柱套在一个收集管内，添加600µl的抑制物去除液，在≥8,000 x g下离心3分钟。
8. 将洗脱的DNA或RNA放入制备好的抑制物去除柱内，抑制物去除柱套在一个干净的1.5ml离心管内，并在16,000 x g下离心3分钟，得到的总核酸可进行后续试验。

DNase I处理（选做）

1. 在RNA提取第2步后，添加400µl的DNA/RNA洗涤液到柱里，离心。去除滤出液。

2. 针对每一次提取 配置 80 μ l的DNase I反应体系（75 μ l 的DNA消化液和5 μ l的DNase I溶液）。
3. 添加80 μ l 的DNase I体系到柱基质上，然后在室温下（20-30 $^{\circ}$ C）孵育15分钟。然后进行下面的步骤完成RNA的提取。