

# 操作手册

## DNA/RNA 提取试剂盒 (配合 DNA/RNA Shield™ 血液保存管)

Catalog No. TR 151-50 (50 次反应)

### Highlights

- 本试剂盒是针对用 DNA/RNA Shield™ 血液保存管后续 DNA/RNA 提取设计的。
- 无需离心等去除保护剂的步骤即可进行 DNA/RNA 的提取。
- 纯化得到的 DNA 和 RNA (含 small/micro RNA) 可应用 高通量测序等实验。

Ver.1.0.6

## 产品组成:

试剂盒组成	保存	50 次
DNA/RNA 预洗液	室温	50 ml
DNA/RNA 洗涤液	室温	24 ml 使用前按说明加指定量乙醇
RNA 回收液	室温	10 ml
DNA 回收液	室温	9 ml 使用前按说明加指定量乙醇
RNase-free H <sub>2</sub> O	室温	6 ml
DNase I	-20℃	1 管
DNA 消化液	室温	4 ml
蛋白酶 K 套装	-20℃	125 mg
3 号柱 G (绿色)	室温	50 个
25ml 漏斗	室温	50 个
收集管 (2ml)	室温	100 个

## 特性:

1. 样品来源: 针对保存在DNA/RNA shield™ 血液保存管中的样品 (3ml人或动物的全血)。
2. 样品保存: DNA/RNA保护剂可有效裂解细胞, 灭活病毒和核酸酶活性, 可在常温下运输和保存各种样品。
3. 片段大小: 回收到DNA和总RNA≥17 nt。
4. 回收率: 一般DNA的产量在15-30µg 之间, RNA的产量在6-30µg(3ml人全血)
5. 所需设备: 台式离心机, 涡旋仪, 真空多连器 (推荐)。

## 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%的乙醇)到 24ml 的 **RNA 洗涤液** 中

**DNA 回收液** 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 6ml（95-100%）的乙醇到 9ml 的 **DNA 回收液** 中。

## **蛋白酶K**

需添加6.5ml蛋白酶K保存液到冻干粉的蛋白酶K里，蛋白酶K的终浓度约为20mg/ml，之后放在-20℃保存

## **DNase I**

添加275μl的RNase-free H<sub>2</sub>O到冻干粉状态的DNase I中，DNase I浓度为1U/μl，颠倒混匀后放在-20℃保存

## 操作步骤:

所有离心操作的离心力均在10,000-16,000 x g范围内进行，如无特殊说明离心时间均为30秒。

所有步骤都应该在室温下（20-30℃）下操作如果无特殊说明。操作步骤兼容真空多连器等负压装置。

操作步骤分为DNA提取步骤，RNA提取步骤，DNA/RNA提取步骤，

## DNA提取步骤

1. 将DNA/RNA Shield™ 血液保存管里的全部溶液（9ml）加到一个50ml离心管内。如果保存管处于冷冻状态，则在室温下解冻保存管。
2. 添加120μl蛋白酶K到保存管内混合并且涡旋振荡。在室温下（20-30℃）孵育30分钟。
3. 添加9ml的异丙醇混合并且涡旋振荡。
4. 将25ml漏斗插入3号柱G（绿色）并且放到真空多联器上。将上述步骤的混合物直接到漏斗内，打开真空源，直到所有液体通过3号柱G（绿色）。  
\*如果没有真空多连器，可通过反复填充700μl 的混合物到3号柱G（绿色）中离心过柱。  
\*蛋白酶K和异丙醇的用量可根据实际添加的样本量等比例调整。(如：3ml采血管溶液 30μl蛋白酶K 3ml异丙醇)
5. 去除25ml漏斗，并将3号柱G（绿色）放到一个收集管内，离心去除残留的液体。
6. 添加400μl DNA/RNA预洗液到柱中，离心，去除滤出液。

7. 添加200µl RNA回收液到柱中，放置5分钟然后离心，去除滤出液。
8. 添加700µl DNA/RNA洗涤液到柱中，离心。去除滤出液。
9. 添加400µl DNA/RNA洗涤液到柱中，离心。去除滤出液。
10. 添加200µl DNA回收液到柱中，离心2分钟以完全去除洗涤液的残留。将柱子放置到一个新的1.5ml离心管内。
11. 添加100µl RNase-free H<sub>2</sub>O到柱基质中，放置5分钟，离心洗脱DNA(最少添加量为50µl)。

## **RNA提取步骤**

1. 将DNA/RNA Shield™ 血液保存管里的全部溶液（9ml）加到一个50ml离心管内。如果保存管处于冷冻状态，则在室温下解冻保存管。
2. 添加120µl蛋白酶K到保存管内混合并且涡旋振荡。在室温下（20-30℃）孵育30分钟。
3. 添加9ml的异丙醇混合并且涡旋振荡。
4. 将25ml漏斗插入3号柱G（绿色）并且放到真空多联器上。将上述步骤的混合物直接到漏斗内，打开真空源，直到所有液体通过3号柱G（绿色）。

\*如果没有真空多连器，可通过反复填充700µl 的混合物到3号柱G（绿色）中离心过柱。

\*蛋白酶K和异丙醇的用量可根据实际添加的样本量等比例调整。(如：3ml采血管溶液 30µl蛋白酶K 3ml异丙醇)

5. 去除25ml漏斗，并将3号柱G（绿色）放到一个收集管内，离心去除残留的液体。
6. 添加400µl DNA/RNA预洗液到柱中，离心。去除滤出液。

柱上DNase I消化处理（推荐）此步骤主要是为了去除痕量的DNA。

a) 添加400µl的DNA/RNA洗涤液到柱子上，离心。去除滤出液。

b) 对于每一次的样品处理需要制备80µl的DNase I反应液。配比为 DNase I 5µl DNA消化液 75µl

c) 直接添加80µl的DNase I反应液到柱上，在室温下（20-30℃）孵育15分钟。

7. 添加400µl DNA/RNA预洗液到柱中离心，去除滤出液。
8. 添加700µl DNA/RNA洗涤液到柱中，离心。去除滤出液。
9. 添加400µl DNA/RNA洗涤液到柱中离心2分钟以完全去除洗涤液的残留，去除滤出液。
10. 将柱子放置到一个新的1.5ml离心管内，在吸附膜的中间部位加100µl RNase-free H<sub>2</sub>O，离心洗脱RNA。

## **DNA/RNA共同提取步骤**

1. 将DNA/RNA Shield™ 血液保存管里的全部溶液（9ml）加到一个50ml离心管内。如果保存管处于冷冻状态，则

在室温下解冻保存管。

2. 添加120μl蛋白酶K到保存管内混合并且涡旋振荡。在室温下（20-30℃）孵育30分钟。
3. 添加9ml的异丙醇混合并且涡旋振荡。
4. 将25ml漏斗插入3号柱G（绿色）并且放到真空多联器上。将上述步骤的混合物直接到漏斗内，打开真空源，直到所有液体通过3号柱G（绿色）。

\*如果没有真空多连器，可通过反复填充700μl的混合物到3号柱G（绿色）中离心过柱。

\*蛋白酶K和异丙醇的用量可根据实际添加的样本量等比例调整。（如：3ml采血管溶液 30μl蛋白酶K 3ml异丙醇）

5. 去除25ml漏斗，并将3号柱G（绿色）放到一个收集管内，离心去除残留的液体。
6. 添加400μl DNA/RNA预洗液到柱中，离心，去除滤出液。
7. 添加200μl RNA回收液到柱中，放置5分钟然后离心，**保存滤出液**。

### **DNA提取步骤**

（DNA结合在柱子上）

8. 将3号柱G（绿色）放到一个新的收集管内。
9. 添加700μl DNA/RNA洗涤液到柱中，离心。去除滤出液。
10. 添加400μl DNA/RNA洗涤液到柱中，离心。去除滤出液。
11. 添加200μl DNA回收液到柱中，离心2分钟以完全去除洗涤液的残留。将柱子放置到一个新的1.5ml离心管内。

### **RNA提取步骤**

（RNA在上一步的滤出液中）

8. 添加1体积的无水乙醇（95-100%）到上步的滤出液中，混匀，将混合物添加到3号柱G（绿色）中，柱子放到一个新的收集管内，离心，去除滤出液。（可采用柱上DNaseI消化方式）
9. 添加400μl DNA/RNA预洗液到柱中，离心。去除滤出液。
10. 添加700μl DNA/RNA洗涤液到柱中，离心。去除滤出液。
11. 添加400μl DNA/RNA洗涤液到柱中离心2分钟以完全去除洗涤液的残留，去除滤出液。将柱子放置到一个新的1.5ml离心管内。

12. 添加100μl RNase-free H<sub>2</sub>O到柱基质中，放置5分钟，离心分别洗脱DNA和RNA。