

DNA/RNA 同步纯化试剂盒说明书

产品组成

DNA/RNA 同步纯化试剂盒	5 次样品	50 次制备
Cat. No.	5002005	5002050
DNA 纯化柱	5 套	50 套
RNA 纯化柱	5 套	50 套
β-巯基乙醇	50 μl	500 μl
Buffer RLT	4 ml	32 ml
Buffer WA	3 ml	24 ml
Buffer WBR	2 ml	20 ml
Buffer TE	0.6 ml	6 ml
RNase-free Water	1.5 ml	2 ml×2
说明书	1 份	1 份

产品储存与有效期

试剂盒如果储存于常温（0~30℃），可在两年内保持使用性能无明显变化；如果将产品储存于 2~8℃，可延长产品的有效期至两年以上。

技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部：e-mail: technical@simgen.cn, 电话：400-0099-857。

产品介绍

本产品不涉及酚氯仿的使用，适合从≤25 mg 组织或≤1×10⁷ 培养细胞中分离纯化 DNA 和 RNA。样本经裂解液溶解后分别滤过 DNA 纯化柱和 RNA 纯化柱，溶解的蛋白与 PCR 抑制物则被过滤除去。最后结合在纯化柱上的 DNA 或 RNA 分别被 Buffer TE 和 RNase-free Water 洗脱，可用于 PCR，RT-PCR，Northern blot，Dot blot，mRNA 分离等各种分子生物学实验。

用户需自备的试剂与物品

1. 无水乙醇和 70%乙醇。
2. RNase-free 1.5 ml 离心管
3. 移液器及吸头（为避免 RNA 酶的污染，建议选用含有滤芯的 RNase-free 移液器吸头）
4. 一次性手套及防护用品和纸巾
5. 台式小量离心机（可配离心 1.5 ml 离心管和 2 ml 离心管的转子）
6. 旋涡振荡器
7. 无 RNA 酶使用的实验室

使用前准备

1. 如果离心机有制冷功能，请将温度设置到 25℃。
2. 每 1 ml Buffer RLT 中加入 10 μl β-巯基乙醇，混合均匀。加入β-巯基乙醇的 Buffer RLT 一个月内使用不影响实验结果。
3. 根据试剂瓶标签上的指示在 Buffer WA 和 Buffer WBR 中加入无水乙醇，并在标签的方框中打勾做好“乙醇已加”的标记。
4. 因唾液、皮肤上均含有 RNA 酶，请在 RNA 提取的全过程中都戴乳胶手套和口罩。

组织中 DNA/RNA 同步纯化操作步骤：

1. 在研钵中加入约 200~400 mg 切成碎屑的动物组织，加入液氮，将组织研磨至粉末状，再用液氮预冷的 1.5 ml 离心管称取 20~25 mg 研磨成粉末状的组织。

* 研磨组织时应及时补加液氮，避免组织融化，以免内源性的 RNA 酶恢复活性而降解 RNA。

* 勿使用超过 25 mg 组织，否则可能导致 DNA 纯化柱堵塞，并使纯化的 RNA 中混有基因组 DNA 污染。

2. 加入 600 μ l 已经加入了 β -巯基乙醇的 Buffer RLT，漩涡振荡直至组织全部溶解，溶液呈半透明状。

* Buffer RLT 具腐蚀性，请戴防护用品进行操作。

DNA 纯化：

3. 13000 rpm 离心 2 分钟，将组织溶解物中的上清液全部转移到 DNA 纯化柱中，盖上管盖，13000 rpm 离心 1 分钟。将滤液转移到一个洁净的 RNase-free 1.5 ml 离心管中，进入步骤 4 操作。将 DNA 纯化柱置回 2 ml 离心管中，由此进入步骤 6 的 DNA/RNA 同步纯化操作。

* 勿吸取管底沉淀，以免堵塞 DNA 纯化柱。

RNA 纯化：

4. 向滤液中加入 600 μ l 70%乙醇并直接用吸头吸注 6~8 次混合均匀，吸取 600 μ l 混合液加入到 RNA 纯化柱中，盖上管盖，13000 rpm 离心 1 分钟。弃 2 ml 离心管中的滤液，将 RNA 纯化柱置回到 2 ml 离心管中。

* 加入 70%乙醇混合后如果有沉淀产生，请将沉淀一起加入到 RNA 纯化柱中。

* 滤液无须彻底弃尽，如果要避免粘附在离心管管口的滤液对离心机的污染，可将 2 ml 离心管在纸巾上倒扣拍击一次。

5. 吸取剩余的混合液加入到 RNA 纯化柱中，13000 rpm 离心 1 分钟。弃 2 ml 离心管中的滤液，将 RNA 纯化柱置回到 2 ml 离心管中，由此进入步骤 6 的 DNA/RNA 同步纯化操作。

DNA/RNA 同步纯化：

6. 在 DNA 纯化柱和 RNA 纯化柱中分别加入 500 μ l Buffer WA，盖上管盖，13000 rpm 离心 1 分钟。

* 确认在 Buffer WA 中已经加入无水乙醇。

7. 弃 2 ml 离心管中的滤液，将 DNA 纯化柱和 RNA 纯化柱分别置回到 2 ml 离心管中，分别加入 600 μ l Buffer WBR，盖上管盖，13000 rpm 离心 1 分钟。

* 确认在 Buffer WBR 中已经加入无水乙醇。

8. 弃 2 ml 离心管中的滤液，将 DNA 纯化柱和 RNA 纯化柱分别置回到 2 ml 离心管中，14000 rpm 离心 1 分钟。

* 如果离心机的离心速度达不到 14000 rpm，则用最高速离心 2 分钟。

* 请勿省略该步骤，否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的 PCR/RT-PCR 效果。

9. 弃 2 ml 离心管，将 DNA 纯化柱和 RNA 纯化柱分别置于一个洁净的 RNase-free 1.5 ml 离心管中，在 DNA 纯化柱的膜中央加入 100 μ l Buffer TE，在 RNA 纯化柱的膜中央加入 50 μ l RNase-free Water，室温静置 2 分钟，12000 rpm 离心 1 分钟。

* 如果离心机没有防泄漏的盖子，请将离心条件改为 8000 rpm 离心 1 分钟，以免 1.5 ml 离心管管盖脱落而损伤离心机。

10. 弃纯化柱，洗脱的 DNA 或 RNA 可立即用于各种分子生物学实验；或者将 DNA 储存于 -20 $^{\circ}$ C、RNA 储存于 -70 $^{\circ}$ C 以下备用。

* 即使 RNA 电泳检测观察不到 DNA 条带，也不应认为纯化的 RNA 中不含基因组 DNA 污染。若需要彻底除去 DNA，请用不含 RNA 酶的 DNase I（可单独订购，Simgen Cat.No.8003050）消化残留的 DNA。

细胞中 DNA/RNA 同步纯化操作步骤：

1. 在 1.5 ml 离心管中收集 $\leq 1 \times 10^7$ 培养细胞，弃培养液（培养液无需弃尽）。旋涡振荡使培养细胞在残留的微量培养液中分散开来。

* 勿使用过量的细胞，否则可能导致后续的操作步骤中堵塞纯化柱。

※细胞收集方法：

- a. 悬浮培养的细胞：300×g 离心 5 分钟收集约 1×10^7 培养细胞，弃培养液。
 - b. 贴壁培养的细胞：用胰酶消化或者细胞刮刀刮取的方法收集约 1×10^7 培养细胞，300×g 离心 5 分钟，弃上清液。
 - c. 细胞培养板中单孔培养的细胞：弃培养上清，直接加入 600 μ l 已经加入了 β -巯基乙醇的 Buffer RLT，并用吸头来回吸注数次使细胞溶解，直接进入步骤 3 操作。（如果单孔细胞数 $\leq 5 \times 10^5$ 时，可用 600 μ l 已经加入了 β -巯基乙醇的 Buffer RLT 重复溶解多个单孔中的细胞以增加细胞数量。）
2. 加入 600 μ l 已经加入了 β -巯基乙醇的 Buffer RLT，旋涡振荡直至细胞全部溶解，溶液呈透明状。

DNA 纯化：

3. 将溶解物全部转移到 DNA 纯化柱中，盖上管盖，13000 rpm 离心 1 分钟。将滤液转移到一个洁净的 RNase-free 1.5 ml 离心管中，进入步骤 4 操作。将 DNA 纯化柱置回 2 ml 离心管中，由此进入步骤 6 的 DNA/RNA 同步纯化操作。

RNA 纯化：

4. 向滤液中加入 600 μ l 70% 乙醇并直接用吸头吸注 6~8 次混合均匀，吸取 600 μ l 混合液加入到 RNA 纯化柱中，盖上管盖，13000 rpm 离心 1 分钟。弃 2 ml 离心管中的滤液，将 RNA 纯化柱置回到 2 ml 离心管中。

* 加入 70% 乙醇混合后如果有沉淀产生，请将沉淀一起加入到核酸纯化柱中。

* 滤液无须彻底弃尽，如果要避免粘附在离心管管口的滤液对离心机的污染，可将 2 ml 离心管在纸巾上倒扣拍击一次。

5. 吸取剩余的混合液加入到 RNA 纯化柱中，13000 rpm 离心 1 分钟。弃 2 ml 离心管中的滤液，将 RNA 纯化柱置回到 2 ml 离心管中，由此进入步骤 6 的 DNA/RNA 同步纯化操作。

DNA/RNA 同步纯化：

6. 在 DNA 纯化柱和 RNA 纯化柱中分别加入 500 μ l Buffer WA，盖上管盖，13000 rpm 离心 1 分钟。

* 确认在 Buffer WA 中已经加入无水乙醇。

7. 弃 2 ml 离心管中的滤液，将 DNA 纯化柱和 RNA 纯化柱分别置回到 2 ml 离心管中，分别加入 600 μ l Buffer WBR，盖上管盖，13000 rpm 离心 1 分钟。

* 确认在 Buffer WBR 中已经加入无水乙醇。

8. 弃 2 ml 离心管中的滤液，将 DNA 纯化柱和 RNA 纯化柱分别置回到 2 ml 离心管中，14000 rpm 离心 1 分钟。

* 如果离心机的离心速度达不到 14000 rpm，则用最高速离心 2 分钟。

* 请勿省略该步骤，否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的 PCR/RT-PCR 效果。

9. 弃 2 ml 离心管，将 DNA 纯化柱和 RNA 纯化柱分别置于一个洁净的 RNase-free 1.5 ml 离心管中，在 DNA 纯化柱的膜中央加入 100 μ l Buffer TE，在 RNA 纯化柱的膜中央加入 50 μ l RNase-free Water，室温静置 2 分钟，12000 rpm 离心 1 分钟。

* 如果离心机没有防泄漏的盖子，请将离心条件改为 8000 rpm 离心 1 分钟，以免 1.5 ml 离心管管盖脱落而损伤离心机。

10. 弃纯化柱，洗脱的 DNA 或 RNA 可立即用于各种分子生物学实验；或者将 DNA 储存于 -20°C 、RNA 储存于 -70°C 以下备用。

* 即使 RNA 电泳检测观察不到 DNA 条带，也不应认为纯化的 RNA 中不含基因组 DNA 污染。若需要彻底除去 DNA，请用不含 RNA 酶的 DNase I（可单独订购，Simgen Cat.No.8003050）消化残留的 DNA。