

## DNA/RNA 共提试剂盒简明说明书 (BW-DR3111)

### 产品构成

Catalog#	-00	-01	-02
Preps	10	50	250
DNA Columns	10	50	250
2 mL Collection Tubes	10	50	250
RNA Columns	10	50	250
1.5 mL RNase-free Microfuge Tubes	10	50	250
Buffer HLY	12 mL	60 mL	260 mL
Buffer RB	12 mL	60 mL	260 mL
DNA Wash Buffer*	3 mL	12 mL	50 mL
RNA Wash Buffer*	3 mL	12 mL	50 mL
DNA Elution Buffer	1 mL	10 mL	25 mL
DEPC-treated ddH <sub>2</sub> O	1 mL	10 mL	25 mL
User Manual	1	1	1

### 产品简介

本试剂盒提供了一种简便快速的方法，可同时从细胞、组织、全血、血浆、血清和体液等生物样品中分离基因组和总 RNA。该共提系统节省了样品处理的时间，避免样品变异，并且节约了宝贵的样品。当可用的样品数量有限时，这是至关重要的。

### 产品贮存及稳定性

本试剂盒自生产之日起可保存 12 个月。所有试剂及用品可保存于室温 (4-28°C)。

### 要点

- Buffer HLY: 使用前确定 Buffer HLY 的用量，每 1 mL Buffer HLY 内加入 20 μL 的β-巯基乙醇，混合液可在室温(15-25°C)放置 1 个月。
- Buffer HLY 有可能形成结晶，使用前请于 37°C 溶解。
- DNA/RNA Wash Buffer: 使用前请将 12 mL (BW-DR3111-00) 或 48 mL (BW-DR3111-01) 或 200 mL (BW-DR3111-02) 100% 乙醇加入至每个 RNA Wash Buffer 瓶或 DNA Wash Buffer 内。终浓度为 80%。

### 实验前需准备的材料

- 台式离心机
- 无菌的 RNase-free 1.5 mL 离心管
- β-巯基乙醇
- 真空负压装置 (若使用负压/离心步骤)

**注:** 室温下 (15-25°C) 进行所有操作，包括离心。尽可能快速操作以避免 RNA 降解。

### 组织样品的破坏和匀浆化

为了获得高质量的 RNA，对样品进行完全和适当的破坏和均质化是至关重要的。均质化是为了通过剪切基因组 DNA 和其他高分子量细胞成分来降低粘度。均质化不完全可能导致柱子堵塞，从而降低 RNA 得率。

#### 1. 使用研钵和研杵研磨样本

- 立即切除组织并冷冻于液氮中

- 在液氮存在下，用陶瓷研钵和研杵将样品研磨成细粉
- 将悬浮液转移至液氮预冷的离心管内，让液氮蒸发，同时样品保持冷冻状态
- 在样品解冻前加入 Buffer HLY

#### 2. 使用 homogenization columns 均质化

每个柱子可上样 700 μL。Homogenization column 可从 BEIWO 单独购买。

#### 3. 使用转子-定子对样品破坏和匀浆

使用合适大小的转子和定子，对大部分样品进行破坏和匀浆化。

#### 4. 使用 glass beads 研磨破坏样品和均质化

在 Buffer HLY 中加入 glass beads，快速研磨可使细胞和组织被破坏并均质化。动物组织使用 4-8 mm 的 glass beads，酵母细胞使用 0.5 mm 的 glass beads，细菌样品使用 0.1 mm 的 glass beads。

### RNA 质量

强烈建议在下游应用前鉴定 RNA 质量。RNA 质量可通过琼脂糖凝胶电泳和 EB 染色鉴定评估，应可见 28 S 和 18 S 核糖体 RNA 条带以及特定量的 mRNA。若这些条带靠向低分子量的 RNA，说明在制备、处理或储存过程中 RNA 发生了严重降解。小于 200 个碱基的 RNA 分子不能被高效吸附。A260/280 在 1.8-2.0 说明核酸纯度在 90-100%。

### 确定样品使用量

得率取决于细胞和组织使用量。请参考表 1 来决定样品使用量并

预估得率。

样品	Buffer HLY (500 µL)	Buffer HLY (700 µL)
细胞数	≤5×10 <sup>6</sup>	>5×10 <sup>6</sup> -1×10 <sup>7</sup>
组织量	<15 mg	>16-30 mg

表 1. 每个柱子的 RNA 得率

样品	10 mg/500 µL Buffer HLY	总RNA得率 (µg)
肝	10 mg	50 (10 mg组织)
肾	10 mg	20-30 (10 mg组织)
肌肉*	10 mg	20 (10 mg组织)
脾	10 mg	30-40 (10 mg组织)
心脏*	10 mg	50 (10 mg组织)
脑**	10 mg	80 (10 mg组织)
肺	10 mg	10-20 (10 mg组织)
胰腺	10 mg	20 (10 mg组织)
HeLa细胞	1×10 <sup>6</sup>	15 (1×10 <sup>6</sup> 细胞)
293HEK	1×10 <sup>6</sup>	12 (1×10 <sup>6</sup> 细胞)
COS-7	1×10 <sup>6</sup>	30 (1×10 <sup>6</sup> 细胞)
NIH/3T3	1×10 <sup>6</sup>	10 (1×10 <sup>6</sup> 细胞)

### 操作步骤（从细胞中提取 DNA/RNA）

1. 细胞准备：（不要超过5×10<sup>6</sup>个细胞）

- **悬浮细胞:** 确定细胞数目，300 ×g离心1-3 min收集细胞。吸尽所有上清液，快速进行步骤2。尽量快速操作减少RNA降解。
- **贴壁细胞:** 确定细胞数目，用移液管将培养基完全去除干净，快速进行步骤2。

**注:** 上清液必须去除干净，残留的上清液可能抑制细胞裂解，从而影响

RNA 得率。

2. **悬浮细胞:** 轻弹管子，使细胞颗粒松散，加入**500 µL Buffer HLY**。

**贴壁细胞:** 直接在培养皿内加入**500 µL Buffer HLY**。使用移液管将细胞裂解液混合，转移至1.5 mL管内。

**注:** 确定 Buffer HLY 的使用量，每 1 mL Buffer LY 加入 20 µL 的β-巯基乙醇。Buffer LY/β-巯基乙醇混合物可在室温放置 1 个月。

3. 涡旋或反复吹吸裂解液，直至样品完全均质化。

### RNA分离

4. 将所有裂解液转移至一个**DNA Column**，12,000 rpm离心30 s，保留**DNA Column**。

5. 向滤液中加入0.5倍体积100%乙醇（如：250 µL的100%乙醇加入至500 µL裂解液），用枪头吹打10次以混匀。不要离心。

6. 转移上述混合液至一个**RNA Column**，12,000 rpm离心1 min，丢弃滤液，将柱子放回收集管。

7. 加入**500 µL Buffer RB**，12,000 rpm离心30 s，弃滤液，将柱子放回收集管。

8. 加入**500 µL RNA Wash Buffer**，12,000 rpm离心30 s，弃滤液。

9. 最大速度离心1 min，去除残留乙醇对于洗脱来说至关重要。

10. 转移**RNA Column**至一个**1.5 mL RNase-free Microfuge Tube**，加入**50 µL DEPC-treated ddH<sub>2</sub>O**至膜中央。12,000 rpm离心30 s，RNA在洗脱下的液体中。将RNA溶液储存于-20°C。

### 基因组 DNA 分离

11. 将步骤4的**DNA Column**转移至一个新的2 mL Collection

Tube，加入**500 µL Buffer RB**。12,000 rpm离心1 min，弃滤液，将柱子放回收集管。

12. 加入**500 µL DNA Wash Buffer**，12,000 rpm离心1 min，弃滤液，将柱子放回收集管。

13. 最大速度离心2 min，转移**DNA Column**至一个新的1.5 mL离心管，加入**50 µL DNA Elution Buffer**，12,000 rpm离心1 min洗脱DNA。

### 操作步骤（从组织中提取 DNA/RNA）

1. 根据表1快速称取合适大小的组织，快速转移至一个提前加入**500 µL Buffer HLY**（使用前加入β-巯基乙醇）的1.5 mL管中，冰上用超声均质器或转子启动器进行组织匀浆。

**注:** Buffer HLY: 使用前确定Buffer HLY的用量，每1 mL Buffer HLY内加入20 µL的β-巯基乙醇，可在室温放置1个月。

**注:** 一个柱子至多承载30 mg组织，否则会造成组织消化不良以及基因组污染。

### RNA 分离

2. 将裂解液12,000 rpm离心1 min，转移澄清的裂解液至**DNA Column**，12,000 rpm离心1 min。保留**DNA Column**。

3. 加入0.5倍体积100%乙醇至裂解液（如：250 µL的100%乙醇加入至500 µL裂解液），用枪头吹打10次以混匀。不要离心。

4. 转移上述混合液至一个**RNA Column**，12,000 rpm离心1 min，弃滤液，将柱子放回收集管。

5. 加入**500 µL Buffer RB**，12,000 rpm离心30 s，弃滤液，将柱子放回收集管。

6. 加入**500 µL RNA Wash Buffer**，12,000 rpm离心30 s，弃滤液，

将柱子放回收集管。

7. 最大速度离心1 min，去除残留乙醇对于洗脱来说至关重要。

8. 转移RNA Column至一个1.5 mL RNase-free Microfuge Tube，加入50 µL DEPC-treated ddH<sub>2</sub>O至膜中央。12,000 rpm离心30 s，RNA在洗脱下的液体中。将RNA溶液储存于-20°C。

### 基因组 DNA 分离

9. 转移DNA Column至一个新的2 mL Collection Tube，加入500 µL Buffer RB，12,000 rpm离心30 s。弃滤液，将柱子放回收集管。

10. 加入500 µL DNA Wash Buffer，12,000 rpm离心30 s，弃滤液，将柱子放回收集管。

11. 12,000 rpm空离2 min干燥DNA柱子，转移柱子至一个1.5 mL离心管，加入50 µL DNA Elution Buffer。

12. 12,000 rpm离心1 min洗脱DNA。

### 常见问题解答

问题	可能原因	建议
A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> 比值低	蛋白污染	使用苯酚：氯仿萃取，RNA 损失预计在 40%以内。
	硫氰酸胍污染	加入 2.5 倍体积的乙醇和 0.1 M 的 NaCl（终浓度）来沉降 RNA，-20°C 孵育 30 min，4°C，10,000 ×g 离心 15 min，用 DEPC-treated ddH <sub>2</sub> O 重悬 RNA 沉淀。
低得率	样品中 RNA 已降解	采集样品后快速液氮冷冻并储存于 -80°C。
	上样量超过了 RNA 柱的最大吸附能力	减少组织样品的加入量。
	乙醇没有加入至 Buffer 中	在 RNA Wash Buffer 内按要求加入一定量的乙醇。
基因组 DNA 污染	RT-PCR 加入过量 RNA	减少 RT-PCR 反应时 RNA 的加入量，控制在 50-100 ng。
	样品富含 DNA	减少样品初始使用量，30 mg 左右的样品初始使用量大多会出现基因组污染的情况。减少细胞数目至 1-2×10 <sup>5</sup> ，增加 buffer 的使用量，分批次多上几次 RNA 柱子。

杭州倍沃医学科技有限公司

[www.beiwobiomedical.com](http://www.beiwobiomedical.com)

400-115-2855

[market@beiwobiomedical.com](mailto:market@beiwobiomedical.com)