版本号：FRI1109

FinePure DNA/RNA Isolation Kit

FinePure DNA/RNA 共提取试剂盒

（离心柱型）

目录号:FR801

产品内容：

Contents	FR801 (50 preps)
Buffer RLTplus	30 ml
Buffer RW	40 ml
Buffer RW2	12 ml
RNase Free ddH_2O	15 ml
Buffer DW1	13 ml
Buffer DW2	12 ml
Buffer TB	15 ml
DNAPure Spin Columns	50 个
RNAPure Spin Columns	50 个
2 ml Collection Tubes	2 x 50 个
1.5 ml RNase Free Microcentrifuge Tubes	2 x 50 个

储存条件：

本试剂盒中所有组分可室温(15-25℃)保存一年。

本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床治疗、食品及化妆品等用途。

产品简介：

本试剂盒可从培养的动物细胞或者组织中快速同步提取DNA和总RNA，可同时处理大量不同样品。仅需40-50 min内即可完成反应，提取的DNA和RNA纯度高，质量稳定可靠，使用本试剂盒提取的FFPE DNA和RNA可适用于多种下游应用，如PCR和Real-time PCR；SNP基因分析STR基因分析；药物基因组学研究。

注意事项：

1.经常更换新手套。因为皮肤经常带有细菌，可能导致 RNase 污染。

2.使用无 RNase 的塑料制品和枪头避免交叉污染。

3.RNA 在裂解液 RLTplus 中时不会被 RNase 降解。但提取后继续处理过程中应使用不含 RNase 的塑料和玻璃器皿。玻璃器皿可在 150℃烘烤 4 h，塑料器皿可在 0.5 M NaOH 中浸泡 10 min，然后用水彻底清洗，再灭菌，即可去除 RNase。

4.配制溶液应使用无 RNase 的水。（将水加入到干净的玻璃瓶中，加入 DEPC 至终浓 0.1%(v/v)，放置过夜，高压灭菌。）

使用前注意事项:

1.操作前在 RLTplus 中加入 β-巯基乙醇至终浓度为 1%，如 1 ml RLTplus 中加入 10 μl β-巯基乙醇或 10 μl 1M DTT。配好的 RLTplus 4℃可放置一个月，裂解液 RLTplus 在储存时可能会形成沉淀，如果有沉淀出现，请加热至 56℃溶解并平衡至室温后使用。

2.第一次使用前应在 Buffer RW2、DW1 和 Buffer DW2 中加入无水乙醇，加入量请参见瓶上标签。

3.以下操作如非指明，均在室温下进行。

4.对于某些敏感的 RNA 应用实验可能需要完全去除 DNA，可以参照 DNase I 消化流程在柱上进行。

DNase I母液的配制：

先用 1 ml 注射器吸取 550 μl RNase Free ddH_2O，然后打进装有 DNase I 干粉（2,000 U）的玻璃瓶中，轻柔混匀，分装后-20℃贮存（可保存 9 个月）。 **(如果需要另外购买 DNase I,**

目录号：RA102-01) 。

注意：从-20℃融化后的DNase I母液保存于4℃ (可保存6周)，不要再次冻存。

操作步骤：

第一次使用前应在 Buffer RW2、DW1 和 Buffer DW2 中加入无水乙醇，加入量请参见瓶上标签。

一．从培养细胞中同时提取 DNA 和总 RNA

1. 收集细胞：

悬浮细胞的收集（收集细胞数量请不要超过 1×10^7）：估计细胞数量，300×g 离心 5 min，将细胞收集到离心管中，仔细吸除所有培养基上清。

单层贴壁细胞的收集（收集细胞数量请不要超过 1×10^7）：可直接在培养容器中裂解（容器直径不超过 10cm），或者使用胰蛋白酶处理后离心收集细胞沉淀。（在摇瓶中培养的单层贴壁细胞通常采用胰蛋白酶处理的方法。）

1） 直接裂解法：确定细胞数量，彻底吸除细胞培养基上清，立即进行第 2 步裂解步骤。

2） 胰蛋白酶处理法：确定细胞数量，吸除培养基，用 PBS 洗涤细胞，吸除 PBS，向细胞中加入含有 0.1-0.25%胰蛋白酶的 PBS 处理细胞，当细胞脱离容器壁时，加入含有血清的培养基失活胰蛋白酶，将细胞溶液转移至 RNase Free 的离心管中，300×g 离心 5 min，收集细胞沉淀，仔细吸除所有上清。

注意：收集细胞时一定要将细胞培养液去除干净，否则会导致裂解不完全，影响 RNA 与吸附柱的结合，造成 RNA 的产量降低。

2. 裂解处理

对于离心得到的细胞沉淀：轻弹离心管底部，使细胞沉淀松散，加入适量裂解液 RLTplus **（见下表，使用前请先加入 β-巯基乙醇或 DTT）**，涡旋震荡 30 sec。

沉淀细胞数量	裂解液 RLTplus (μl)
$<5\times10^6$	350
5×10^6-1×10^7	600

对于直接裂解的细胞：RLTplus**（见下表，使用前请先检查是否已加入 β-巯基乙醇或 DTT）**，将细胞裂解液转移至离心管中，涡旋震荡 30 sec。

容器直径（cm）	裂解液 RLTplus (μl)
<6	350
6-10	600

3. 将所有溶液转移至 DNA 吸附柱 DNAPure Spin Columns (DNA 吸附柱放在 2ml RNase Free 离心管中)，12,000 rpm 离心 30 sec，收集滤液。将 DNA 吸附柱放在收集管中室温或 4℃放置至后续提取 DNA。

总 RNA 提取

4. 向滤液中加入 1 倍体积 70%乙醇（通常为 350 μl 或 600 μl），混匀（此时可能会出现沉淀），得到的溶液和沉淀一起转入 RNA 吸附柱 RNAPure Spin Columns 中（RNA 吸附柱放入收集管中）， 12,000 rpm 离心 30 sec，倒掉收集管中的废液，将 RNA 吸附柱放回收集管中。

   注意：配制 70%乙醇时请使用 RNase Free ddH_2O，如果滤液体积有所损失，请相应减少 70%乙醇用量。将溶液和沉淀转移至 RNA 吸附柱时，如果体积大于吸附柱容量，可以分两次完成。

5. 向 RNA 吸附柱中加入 700 μl Buffer RW，12,000 rpm 离心 30 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附放回收集管中。
6. 向 RNA 吸附柱中加入 500 μl Buffer RW2（**使用前请先检查是否已加入乙醇**），12,000 rpm 离心 30 sec，倒掉收集管中的废液，将 RNA 吸附柱放回收集管中。
7. 重复操作步骤 6 一次。
8. 12,000 rpm 离心 3 min，倒掉废液。
9. 将 RNA 吸附柱转入一个新的 1.5 ml RNase Free 离心管中，加入 100 μl RNase Free ddH_2O 室温放置 1 min，12,000 rpm 离心 1 min，得到 RNA 溶液。

   注意：洗脱体积不应少于 30 μl，体积过小影响回收效率。RNA 溶液请于-70℃保存。

基因组 DNA 提取

10. 向 DNA 吸附柱 DNAPure Spin Columns 中加入 500 μl Buffer DW1（**使用前请先加入无水乙醇），**12,000 rpm 离心 30 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。
11. 向 DNA 吸附柱中加入 500 μl Buffer DW1（**使用前请先加入无水乙醇），**12,000 rpm 离

心 30 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。

11. 重复操作步骤 11 一次。
12. 12,000 rpm 离心 3 min，倒掉废液。
13. 将 DNA 吸附柱转入一个新的 1.5ml RNase Free 离心管中，加入 100 µl Buffer TB，室温放置 1 min，12,000 rpm 离心 1 min，得到 DNA 溶液。

二、从动物组织中同步提取 DNA 和总 RNA

1. 匀浆处理：

   切割小块组织加入适量裂解液 RLTplus（**见下表，使用前请先加入 β-巯基乙醇或 DTT**），用电动或玻璃匀浆器将组织彻底研磨。涡旋震荡 30 sec。

起始组织量	**裂解液 RLTplus (µl)**
10-20mg	350
≥20mg	600

   注意：组织量一定不要超过 30 mg，否则将导致 RNA 得率和质量下降。

2. 12,000 rpm 离心 3-5 min，小心吸取上清至 DNA 吸附柱 DNAPure Spin Columns(DNA 吸附柱放在 2ml 离心管中)，12,000 rpm 离心 30 sec，收集滤液。将 DNA 吸附柱放在收集管中室温或 4℃放置至后续提取 DNA。

总 RNA 提取

3. 向滤液中加入 1 倍体积 70%乙醇（通常为 350 µl 或 600 µl），混匀（此时可能会出现沉淀）。

   注意：配制 70%乙醇时请使用 RNase Free ddH_2O，如果滤液体积有所损失，请相应减少 70%乙醇用量。

4. 将得到的溶液和沉淀一起转入 RNA 吸附柱 RNAPure Spin Columns 中（RNA 吸附柱放入收集管中）， 12,000 rpm 离心 30 sec，倒掉收集管中的废液，将 RNA 吸附柱放回收集管中。

   注意：将溶液和沉淀转移至 RNA 吸附柱时，如果体积大于吸附柱容量，可分两次完成。

5. 向 RNA 吸附柱中加入 700 µl Buffer RW，12,000 rpm 离心 30 sec，倒掉收集管中的废液，将 RNA 吸附柱放回收集管中。

6. 向 RNA 吸附柱中加入 500 µl Buffer RW2（**使用前请先加入无水乙醇**），12,000 rpm 离心 30 sec，倒掉收集管中的废液，将 RNA 吸附柱放回收集管中。
7. 重复操作步骤 6 一次。
8. 12,000 rpm 离心 3 min，倒掉废液。
9. 将 RNA 吸附柱转入一个新的 1.5 ml RNase Free 离心管中，加入 30-100 µl RNase Free ddH_2O 室温放置 1 min，12,000 rpm 离心 1 min，得到 RNA 溶液。

   注意：洗脱缓冲液体积不应少于 30 µl，体积过小影响回收效率。RNA 溶液请于-70℃保存。

基因组 DNA 提取

10. 向 DNA 吸附柱 DNAPure Spin Columns 中加入 500 µl Buffer DW1（**使用前请先加入无水乙醇**），12,000 rpm 离心 30 sec，倒掉收集管中废液，将 DNA 吸附柱放回收集管中。
11. 向 DNA 吸附柱中加入 500 µl Buffer DW2（**使用前请先加入无水乙醇**），12,000 rpm 离心 30 sec，倒掉收集管中的废液，将 DNA 吸附柱放回收集管中。
12. 重复操作步骤 11 一次。
13. 12,000 rpm 离心 3 min，倒掉废液。
14. 将 DNA 吸附柱转入一个新的 1.5 ml RNase Free 离心管中，加入 30-100 µl Buffer TB，室温放置 1 min，12,000 rpm 离心 1 min，得到 DNA 溶液。

DNase I 消化流程（可选）

DNase I 母液的配制：将 DNase I 干粉（2,000 U）溶解在 550 µl RNase Free ddH_2O 中，轻柔混匀，分装后-20℃贮存（可保存 9 个月）。

注意：从-20℃融化后的 DNase I 母液保存于 4℃（可保存 6 周），不要再次冻存。

1. 按照 RNA 提取流程 1-4 步进行提取。
2. 向 RNA 吸附柱 RNAPure Spin Columns 中加入 350 µl Buffer RW1，12,000 rpm 离心 30 sec，弃废液，将 RNA 吸附柱放回收集管中。
3. DNase I 工作液的配制：取 10 µl DNase I 母液放入新的 1.5 ml RNase Free 离心管中，

加入 70 μl DNase I 溶液，轻柔混匀。

4. 向 RNA 吸附柱中央加入 80 μl 的 DNase I 工作液，室温放置 15 min。
5. 向 RNA 吸附柱中加入 350 μl Buffer RW1，12,000 rpm 离心 30 sec，弃废液，将 RNA 吸附柱放回收集管中。
6. 按照 RNA 提取流程 6-9 步进行提取。