

Version: AC 6.0 (2024.02.22修订)

SPARKeasy Tissue/Cell RNA/DNA/Protein Kit

组织细胞RNA/DNA/Protein分提试剂盒

(离心柱型)

目录号: AC1602

01/产品组分

序号	组分	50 次 AC1602
1	裂解液 RLT	50 mL
2	去蛋白液 RW1	40 mL
3	漂洗液 RW	10 mL 第一次使用前加入 42 mL 无水乙醇
4	RNase Free H ₂ O	10 mL
5	70%乙醇	9 mL RNase Free H ₂ O 第一次使用前加入 21 mL 无水乙醇
6	抑制物去除液 IR	25 mL
7	漂洗液 WB	15 mL 第一次使用前加入 60 mL 无水乙醇
8	缓冲液 APP	60 mL
9	洗脱缓冲液 EB	10 mL
10	基因组 DNA 吸附柱 DA 和 收集管	50 套
11	RNA 吸附柱 RA 和 收集管	50 套
12	RNase-Free 收集管(1.5 mL)	50 个

02/保存条件

本试剂盒所有组分室温（15-25 °C）保存。

03/产品概述

本试剂盒适用于从同一个动物细胞或组织样品中快速提取分离基因组 DNA、总 RNA 和 Protein。无苯酚、氯仿的 DNA/RNA 快速提取技术配合独家的分离技术，可同时得到高纯度的 RNA、基因组 DNA 和 Protein。得到的 RNA 不需要 DNase 消化，可直接用于反转录 PCR、荧光定量 PCR 等实验。基因组 DNA 也可直接用于下游的 Southern、酶切、PCR 等各种实验。

试剂盒内独特的裂解液能迅速裂解细胞和灭活细胞 RNA/DNA 酶，然后裂解混合物 DNA/RNA/Protein 同时通过一个基因组 DNA 吸附柱，基因组 DNA 被吸附而 RNA/Protein 穿透滤过。DNA 吸附柱上基因组 DNA 经过一系列漂洗、离心步骤后洗脱得到纯净的基

因组 DNA。滤过的 RNA 用乙醇调节结合条件后，在高离子盐状态下选择性吸附于 RNA 吸附柱上，再通过一系列快速的漂洗、离心洗脱得到纯净的 RNA。滤液经选择性沉淀得到 Protein。该产品可在 80 min 内完成样品 DNA/RNA/Protein 的提取。

04/自备材料

无水乙醇、胰蛋白酶（用于细胞）

05/注意事项

请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项

- ◇ 试剂盒内所有溶液都应是澄清的，低温环境中溶液可能形成沉淀，可在 37°C 水浴加热几分钟，待恢复澄清后使用。
- ◇ 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。
- ◇ 所有离心操作步骤，均可在室温（15-25°C）下进行。
- ◇ 样品处理量绝对不要超过基因组 DNA 吸附柱 DA 和 RNA 吸附柱 RA 的处理能力，否则会造成 DNA 残留或产量降低。不同的组织细胞 RNA/DNA 相差极大，例如胸腺、脾脏 DNA 含量丰富，超过 5 mg 就会超过柱子处理能力。COS 细胞 RNA 含量丰富，超过 3×10^6 个细胞就会超过吸附柱吸附能力。因此，若不清楚样品的 DNA/RNA 含量，可使用较少的样品处理量，如细胞不超过 $3-4 \times 10^6$ 个，组织不超过 10 mg，再根据实验情况增加或减少样品量。
- ◇ 裂解液 RLT、抑制物去除液 IR、去蛋白液 RW1 中含有刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套，避免沾染皮肤、眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或生理盐水冲洗。

06/使用方案

1. 样本处理

◆ 组织培养细胞

- a. 收集 $<10^7$ 悬浮细胞到一个 1.5 mL 离心管，对于贴壁细胞，孔板培养可以直接裂解，细胞瓶培养应先用胰蛋白酶消化后吹打下来收集。
- b. 12,500 rpm（14,500×g）离心 10 s（或 300×g 离心 5 min），使细胞沉淀下来。完全吸弃上清，留下细胞团，注意不完全弃上清会稀释裂解液导致产量纯度降低。
- c. 轻弹管壁将细胞沉淀完全松散重悬，加 350 μL（ $<5 \times 10^6$ 细胞）或 600 μL（ $5 \times 10^6-1 \times 10^7$ 细胞）裂解液 RLT，吹打混匀后用手剧烈振荡 20 s 充分裂解。
- d. 匀浆：（处理细胞量极少时 $<1 \times 10^5$ 一般不需要，涡旋振荡一分钟匀浆）。用移液器抽打裂解物 5-10 次或直到得到满意匀浆

结果（或者电动匀浆 30 s），可以剪切 DNA，降低粘稠度防堵塞柱子和提高产量。

- e. 将裂解混合物或匀浆混合物全部加到 DNA 吸附柱上（吸附柱放在收集管内）。
- f. 接操作步骤 2。

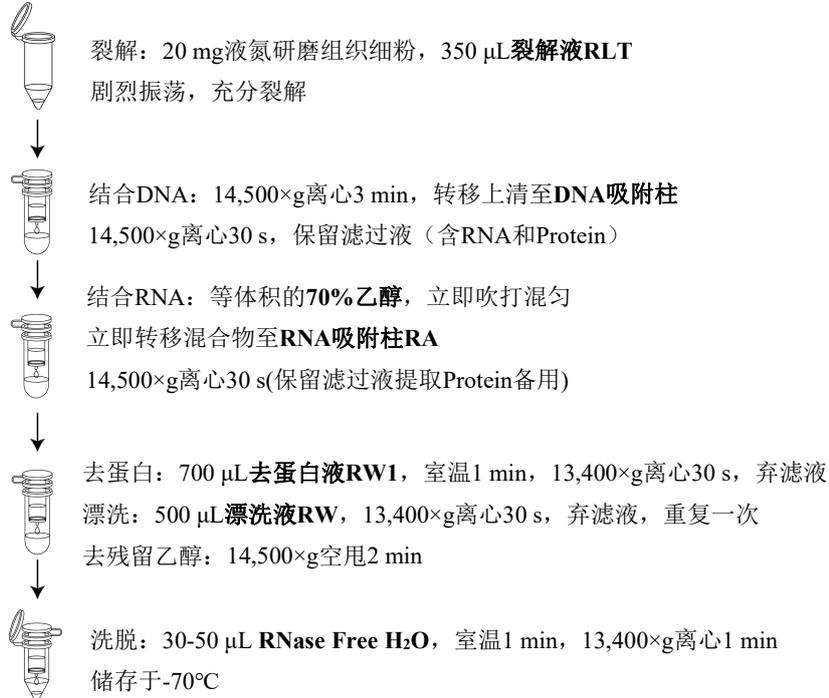
◆动物组织（例如鼠肝脑）

- a. 电动匀浆：新鲜组织用解剖刀迅速切成小碎块，加入 350 μL (<20 mg 组织) 或者 600 μL (20-30 mg 组织) 的裂解液 RLT 后电动彻底匀浆 20-40 s。
 - b. 液氮研磨+匀浆：在液氮中研磨组织成细粉后，取适量组织细粉（20 mg/30 mg）转入装有 350 μL /600 μL 裂解液 RLT 的 1.5 mL 离心管中，用手剧烈振荡 20 s，充分裂解。用移液器抽打裂解物 10 次或直到得到满意匀浆结果（或者电动匀浆 30 s），可以剪切 DNA，降低粘稠度防堵塞柱子和提高产量。
 - c. 将匀浆后裂解物 12,500 rpm (14,500 \times g) 离心 3 min，沉淀可能存在的裂解困难的碎片或者不溶物，将裂解物上清全部加到 DNA 吸附柱上（吸附柱放在收集管内）。
 - d. 接操作步骤 2。
2. 12,500 rpm (14,500 \times g) 离心 30 s，保留滤过液（RNA/Protein 在滤过液中）。DNA 吸附柱（膜上吸附有基因组 DNA）短时间可存放 4 $^{\circ}\text{C}$ 备用。
- ▲确保离心后液体全部滤过去，膜上没有残留，如有必要，可以加大离心力和离心时间。
 - ▲将 DNA 吸附柱放回收集管保留在 4 $^{\circ}\text{C}$ ，用于从步骤 10 开始的基因组 DNA 提取。

以下步骤为提取 RNA 步骤：

3. 用微量移液器较精确估计滤过液体积（通常为 350 μL /600 μL ，滤过时的损失体积应减去），加入等体积的 70%乙醇（请先检查是否已加入无水乙醇!），此时可能出现沉淀,但是不影响提取过程，立即吹打混匀，不要离心。
4. 立刻将混合物(每次小于 700 μL ，可以分两次加入)加入一个 RNA 吸附柱 RA 中(吸附柱放入收集管中)，12,500 rpm(14,500 \times g) 离心 30 s，保留滤过液以备提取 Protein。
 - ▲滤过液含有 Protein，请转入一个合适大小（至少 2 倍滤过液体积）的离心管，用于从步骤 16 开始的 Protein 提取。
5. 加 700 μL 去蛋白液 RW1，室温放置 1 min，12,000 rpm (13,400 \times g) 离心 30 s，弃废液。
6. 加入 500 μL 漂洗液 RW（请先检查是否已加入无水乙醇!），12,000 rpm (13,400 \times g) 离心 30 s，弃废液。重复此步骤。
7. 将吸附柱 RA 放回空收集管中，12,500 rpm (14,500 \times g) 离心 2 min，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
8. 取出吸附柱 RA，放入一个 RNase Free 离心管中，根据预期 RNA 产量在吸附膜的中间部位加 30-50 μL RNase Free H₂O（事先在 70-90 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热可提高产量），室温放置 1 min，12,000 rpm (13,400 \times g) 离心 1 min。
9. 如果预期 RNA 产量>30 μg ，加 30-50 μL RNase Free H₂O 重复步骤 8，合并两次洗脱液，或使用第一次的洗脱液加回到吸附柱重复步骤一遍。
 - ▲使用第一次洗脱液重复洗脱两遍的 RNA 浓度高，分两次洗脱合并洗脱液的 RNA 产量比前者高 15-30%，但是浓度要低,用户可根据需要选择。

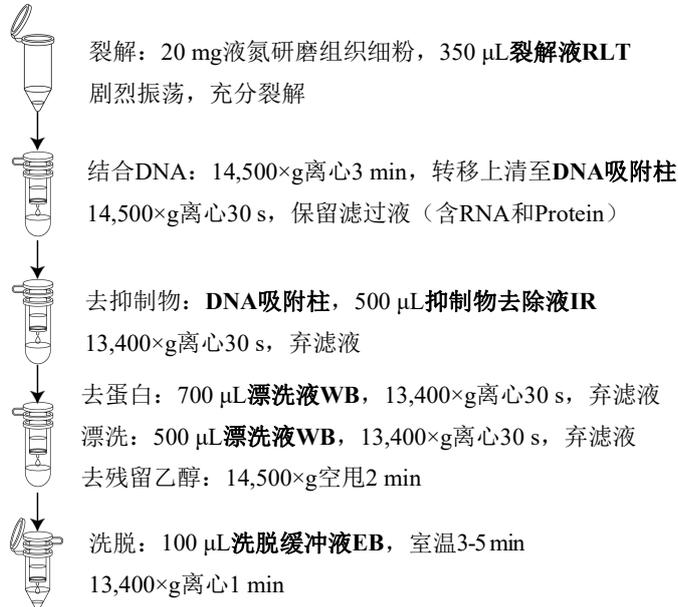
◇ RNA 提取方法



以下步骤为提取 DNA 步骤：

10. 在步骤 2 的 DNA 吸附柱上加入 500 μ L 抑制物去除液 IR，12,000 rpm（13,400 \times g）离心 30 s，弃废液。
11. 加入 700 μ L 漂洗液 WB（请先检查是否已加入无水乙醇！），12,000 rpm（13,400 \times g）离心 30 s，弃废液。
12. 加入 500 μ L 漂洗液 WB，12,000 rpm（13,400 \times g）离心 30 s，弃废液。
13. 将 DNA 吸附柱放回空收集管中，12,500 rpm（14,500 \times g）离心 2 min，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
14. 取出 DNA 吸附柱，放入一个干净的离心管中，在吸附膜的中间部位加 100 μ L 洗脱缓冲液 EB（洗脱缓冲液事先在 65-70 $^{\circ}$ C 水浴中预热效果更好），室温放置 3-5 min，12,000 rpm（13,400 \times g）离心 1 min。将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，室温放置 2 min，12,000 rpm（13,400 \times g）离心 1 min。
▲洗脱体积越大，洗脱效率越高，若需要较高浓度的 DNA，可以适当减少洗脱体积，但是最小体积不应少于 50 μ L，体积过小会降低 DNA 洗脱效率，减少 DNA 产量。
15. DNA 可以存放在 2-8 $^{\circ}$ C，如果要长时间存放，可以放置在 -20 $^{\circ}$ C。

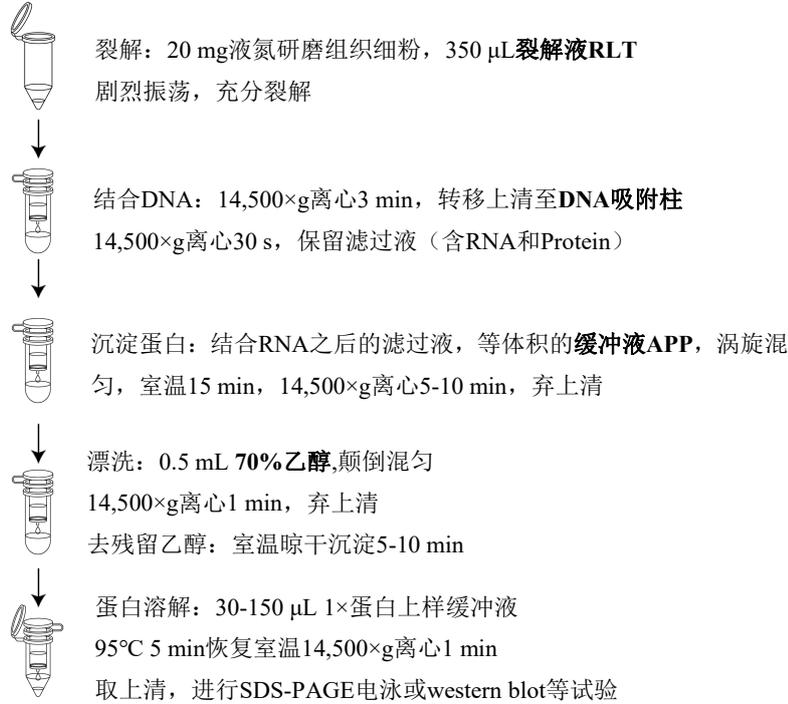
◇ DNA 提取方法



以下步骤为提取 Protein 步骤：

16. 将步骤 4 的滤过液中加入等体积的缓冲液 APP，涡旋振荡混匀，室温放置 15 min 沉淀 Protein。
17. 12,500 rpm (14,500 \times g) 离心 5-10 min，弃上清。加入 0.5 mL 70%乙醇，颠倒后离心 1 min，弃上清，留下蛋白沉淀，尽量将残留液体用移液器吸干净。
18. 室温晾干沉淀 5-10 min，注意一定让乙醇挥发干净，以免影响下游实验。
19. 将蛋白沉淀溶解于 30-150 μL 1 \times 蛋白上样缓冲液（如需要蛋白定量，缓冲液中不应加入溴酚蓝）或其它下游实验要求的缓冲液中。
▲由于裂解液 RLT 的强变性作用和不同蛋白等电点，蛋白可能溶解比较困难，用移液器吹打帮助溶解或者改变 PH 值帮助蛋白溶解，短暂离心取上清使用。或用 5% SDS 或 8 M 尿素帮助溶解蛋白沉淀后做蛋白定量。注意如果需要 BCA 蛋白定量可能需要把 8 M 尿素稀释到 3 M。
20. 95 $^{\circ}\text{C}$ 放置 5 min 溶解和变性蛋白，冷却到室温，12,500 rpm (14,500 \times g) 离心 1 min，取上清进行 SDS-PAGE 电泳或者 western blot 等实验。

◇ 蛋白提取方法



07/相关产品

- AA1002 SPARKeasy 组织/细胞基因组 DNA 快速提取试剂盒 (含蛋白酶 K)
- AC0202 SPARKeasy 组织/细胞 RNA 快速提取试剂盒 (含基因组 DNA 清除柱)
- AG0304 SPARKscript II RT Plus Kit (With gDNA Eraser)
- AG0305 SPARKscript II All-in-one RT SuperMix for qPCR (With gDNA Eraser)
- AH0104 2 \times SYBR Green qPCR Mix (With ROX)
- EA0004 RIPA 裂解液 (弱)

本产品仅用于科学研究!

Tel: 0531-82387577

Web: <http://www.sparkjade.com>

Support: support@sparkjade.com

