

DNA/RNA 提取

DNA 和 RNA 不同的提取方案步骤

Table of contents

DNA 提取	2
质粒提取	2
gDNA 提取	2
RNA 提取	2
mRNA 提取	2
试剂	8
样照	8
Total RNA 提取	10

DNA 提取

质粒提取

gDNA 提取

RNA 提取

RNA 提取是分子生物学中的一项基础实验技术，用于从细胞或组织中分离纯化 RNA。高质量的 RNA 是后续如 RT-PCR、RNA 测序 (RNA-seq)、Northern blot 等实验的关键

mRNA 提取

1. 试剂和仪器准备

Materials	耗材试剂	设备
<input type="checkbox"/> 消化收集的细胞	<input type="checkbox"/> Dynabeads mRNA Direct Kit	<input type="checkbox"/> HulaMixer™ 样品混合器
<input type="checkbox"/> -80 冻存细胞	<input type="checkbox"/> 1.5mL 无核酶离心管	<input type="checkbox"/> Qubit3.0
<input type="checkbox"/> 组织	<input type="checkbox"/> 1mL 移液器 (Eppendorf)	<input type="checkbox"/> 恒温孵育器/水浴锅
<input type="checkbox"/> PBS/DPBS	<input type="checkbox"/> 200 L 移液器 (Eppendorf)	<input type="checkbox"/> DynaMag-2 Magnet
	<input type="checkbox"/> 10 L 移液器 (Eppendorf)	<input type="checkbox"/> Qubit3.0
	<input type="checkbox"/> 2.5 L 移液器 (Eppendorf)	
	<input type="checkbox"/> Qubit RNA 定量试剂盒	

2. 试剂成分和提取原理

Dynabeads® mRNA DIRECT™ 试剂盒的优势:

- **快速** — 15 分钟的程序即可获得纯净、完整的 mRNA
- **高纯 mRNA 分离** — cDNA 合成上游的理想选择
- **灵敏的 mRNA 分离** — 可实现来自超小起始样品的 cDNA 合成和 cDNA 文库构建 (支持从单个细胞构建 cDNA 文库)

Table 2: Kit 成分表

Component	容量
Dynabeads Oligo(dT)25 (=5mg/mL, supplied in PBS pH7.4)	5mL
Lysis/Binding Buffer <ul style="list-style-type: none">• 100mM Tris-HCl, pH7.5• 500mM LiCl• 10mM EDTA, pH 8• 1% LiDS• 5mM dithiothreitol (DTT)	30mL
Washing Buffer A <ul style="list-style-type: none">• 10mM Tris-HCl, pH 7.5• 0.15M LiCl• 1mM EDTA• 0.1% LiDS	60mL

Component	容量
Washing Buffer B	30mL
<ul style="list-style-type: none"> • 10mM Tris-HCl, pH 7.5 • 0.15M LiCl • 1mM EDTA 	
10mM Tris-HCl Ph 7.5 (Elution Buffer)	

分离方案依赖于在大多数 mRNA 3' 端 polyA 残基与共价偶联到 Dynabeads® 表面的寡核苷酸 (dT)25 之间的碱基配对。其他缺乏 polyA 尾的 RNA 种类不会与微珠杂交, 并且易于洗涤。核糖体 RNA、DNA、蛋白和小 RNA 分子 (如转运 RNA、微小 RNA 和小核仁 RNA) 不会与珠结合且会被丢弃

Tip

1 mg Dynabeads® 寡核苷酸 (dT)25 微珠 (200µL) 能够结合高达 2 µg mRNA。一个常规的哺乳细胞包含 10-30pg 的 total RNA, 1%-5% 是 mRNA 只有当 bead 和 sample 比例合适的时候才不会发生 mRNA size 的 bias, 当有大量 mRNA 或孵育时间过短, beads 更倾向于短分子

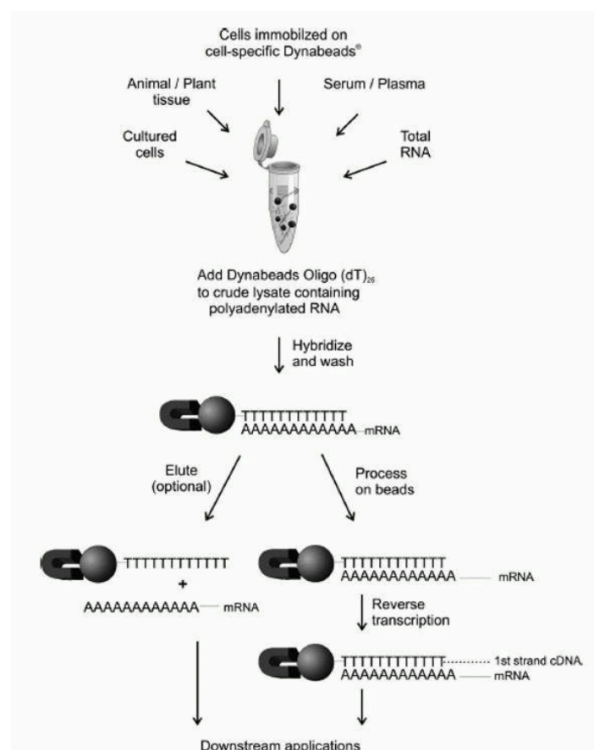


Figure 1: Beads 提取原理

3. 步骤

开始前准备

🔥 Caution

1. Beads 需要涡旋或者移液器打匀进行重悬，并且在室温回温半小时
2. Lysis/Binding Buffer 和 Washing Buffers A 和 B 提前放置在室温
3. 10mM Tris-HCl 在使用之前拿出或者放置在 2-8 度冰浴。
4. 需要在 wash Beads 后彻底吸干净 buffer，buffer 中含有 LiDS-具有强烈的酶活抑制

3.1 样本前处理

植物或动物组织需要液氮速冻后，加入裂解液进行离心，做到之后再行补充

1. 离心收集细胞 (400xg, 8min, 4 度)

标准量	Micro	Mini	Maxi
1-4x10 ⁶	<150000	0.15-1 x 10 ⁶	4-20 x 10 ⁶

2. 使用 PBS/DPBS 重悬细胞，重新离心，清洗细胞。
3. 按照不同的细胞量添加不同量的培养基

标准量	Micro	Mini	Maxi
1250μL	300μL	300μL	5mL

4. 使用移液器多次吹打直到 DNA 全部释放，得到粘稠的液体

3.2 Dynabeads Oligo(dT)25 准备

1. 重悬 Beads，按照需要的量将 Beads 转移到 1.5mL 无核酶离心管中，将离心管放置到磁力架上

Table 5

标准量	Micro	Mini	Maxi
250μL	10μL	50μL	1mL

2. 经过 30s 或者 1min 后，当溶液变澄清，移除上清液
3. 将离心管从磁力架上移下来，使用表格 Table 5 中的 Lysis/Binding Buffer 量清洗 beads

3.3 mRNA 提取

1. 将上一步清洗后的 beads 放置到磁力架上, 静置 30s 或 1min, 等待 beads 全部被吸附。
2. 移除上清液体后, 按照 Table 5 加入合适的样品裂解液, 移液器重悬 beads
3. 将混合后的 beads 使用 HulaMix 或者 roller mix 进行孵育, 3-5min, 使得 mRNA 与 beads 结合

! Important

千万不要用涡旋仪进行混匀, 会将 mRNA 打断

4. 将孵育后的 beads 放置到磁力架上 2min, 如果粘度很多增加到 10min 左右
5. 吸去上清之后, 室温下加入合适体积的 **Wash A Buffer**, 重复磁力架-吸取上清的步骤

标准量	Micro	Mini	Maxi
1-2mL	600 μ L	600 μ L	10mL

6. 使用 **Wash B Buffer** 室温下进行清洗, 如果分离的 mRNA 用于后续的酶反应 (RT-PCR), 再进行额外一次的 wash Buffer B 清洗

标准量	Micro	Mini	Maxi
1-1.5mL	300 μ L	300 μ L	5mL

7. mRNA 解离, 按照表中加入合适的洗脱液 10mMTris-HCl pH7.5, 然后在 65°C–80°C 孵育 2min, 立即将 beads 放到磁力架上, 将 Elution Buffer 吸取放置到冰上

标准量	Micro	Mini	Maxi
10-25 μ L	10 μ L	10 μ L	50-100 μ L

3.4 rRNA 清除 (可选)

在一些情况下提取的 mRNA 会存在 rRNA 的污染，对于 Northern Blot 和 RT-PCR 是没有干扰的，但是对于 cDNA 文库的构建和 microarray 分析 rRNA 需要被避免

原则上是通过重新分离 mRNA 去洗脱，重新使用 beads 是被推荐的，否则新的 beads 需要使用焦磷酸钠清洗

1. 按照上述步骤得到洗脱的 mRNA
2. 将洗脱的 mRNA 转移到新的无核酶 1.5mL 离心管中放置在冰上,不要扔掉 beads
3. 使用 **Washing Buffer B** 清洗两次 beads
4. 使用 4 倍体积 Elution buffer 加入 Lysis/Binding Bffer(洗脱用 20 μ Lbuffer，添加 80 μ L Lysis/Bingding Buffer)
5. 移除 Washing Buffer B，加入上一步稀释好的 mRNA
6. 在室温下，孵育 3-5min
7. 之后进行 Washing Buffer A 清洗–Washing Buffer B 清洗–洗脱

3.5 RNA 定量

试剂

Qubit™ RNA 高灵敏度 (HS)、宽范围 (BR) 和扩展范围 (XR) 定量试剂盒

样照



Qubit3.0

{#fig-Qubit width="300"

height="200" fig-alt = "Qubit2"}
}

Qubit RNA HS 定量试剂盒 Qubit RNA HS（高灵敏度）定量试剂盒用于准确检测初始浓度为 0.2 至 200 ng/ μ L 的 RNA 样品（具体取决于样品体积），检测范围为 4–200 ng

Qubit RNA BR 定量试剂盒 Qubit RNA BR（宽范围）定量试剂盒，该定量试剂盒设计用于准确检测初始浓度为 0.5 至 1,200 ng/ μ L 的 RNA 样品（具体取决于样品量），检测范围为 10–1,200 ng

Qubit RNA XR 定量试剂盒 Qubit RNA XR（扩展范围）定量试剂盒，该定量试剂盒设计用于准确检测初始浓度为 5 至 20,000 ng/ μ L 的 RNA 样品（具体取决于样品量），检测范围为 100–20,000 ng

1. 准备样品和标准品，室温下面回温，最好将染料分装。
2. RNA BR assay 需要两个标准品进行校准，耗材是特定的 0.5mL PCR tubes
3. Qubit working solution 是 Qubit RNA BR **1: 200** 稀释在 RNA BR Buffer 中。

! Important

荧光染料，不要在玻璃容器中进行混匀

4. 添加标准品或样品到 buffer mix 中，补足 200 μ L 体积

	标准品测试	样本测试
Volume of working solution	190 μ L	180–199 μ L
Volume of standard	10 μ L	–
Volume of user sample	–	1–20 μ L
Total volume in each assay tube	200 μ L	200 μ L

5. 涡旋 3-5 秒
6. 室温放置孵育 2min，注意避光。
7. 将 PCR 管放置到 Qubit 中，在屏幕上点击 Home–touch RNA–选择 RNA Broad Range
8. 按照试剂上的标签，标准品分为 #1 和 #2，先将 #1 插入 Qubit 读取，再插入 #2 插入 Qubit 读取

💡 Tip

1. 注意测量方式的选择，不能选错，Qubit 分为 RNA，dsDNA，ssDNA
2. 标准品测定要区分数据

9. 将样品放置到 Qubit 中，选择上样的量 (1-20 μ L)，选择合适的单位之后，进行读取

Total RNA 提取

1. 仪器和试剂准备

Materials	耗材试剂	设备
<input type="checkbox"/> 消化收集细胞	<input type="checkbox"/> TRIzol	<input type="checkbox"/> 冷冻离心机 (12000g)
<input type="checkbox"/> 液氮速度组织器官	<input type="checkbox"/> 异丙醇	<input type="checkbox"/> 生物安全柜
<input type="checkbox"/> PBS/DPBS	<input type="checkbox"/> 氯仿	<input type="checkbox"/> NanoPhotometer(Implen)
<input type="checkbox"/> DEPC(可选)	<input type="checkbox"/> 75% 乙醇	<input type="checkbox"/> Qubit 3.0
	<input type="checkbox"/> 1.5mL 无核酶离心管	<input type="checkbox"/> 水浴或金属浴加热块 (Eppendorf)
	<input type="checkbox"/> 1.5mL 移液器	
	<input type="checkbox"/> 200 L 移液器	
	<input type="checkbox"/> 2 L 移液器	

2. 试剂成分和提取原理

TRIzol 试剂是一种即用型试剂，用于在 **1 小时**内从人类、动物、植物、酵母或细菌来源的细胞和组织样本中提取高质量的总 RNA（以及 DNA 和蛋白质）。TRIzol 试剂含有**苯酚**、**异硫氰酸胍**和其他特殊组分的单相溶液，可促进提取各种大或小分子量

的 RNA。在 TRIzol 试剂进行样本匀浆化的过程中，它可以破坏细胞，溶解细胞组分，同时高效的抑制 RNA 酶的活性，从而维持 RNA 的完整性。TRIzol 试剂可同时处理大量样本，对 Chomczynski 和 Sacchi 开发的一步法提取 RNA (Chomczynski 和 Sacchi, 1987) 的改进

采用 TRIzol 试剂进行样本匀浆化后，加入氯仿，匀浆物可分成透明的上层水相层（含有 RNA）、相界面和红色的下层有机层（含有 DNA 和蛋白质）。然后用异丙醇从水相层中沉淀出 RNA。用乙醇从相界面和有机层中沉淀出 DNA。利用异丙醇沉淀从酚-乙醇上清液中沉淀出蛋白质。洗涤沉淀的 RNA、DNA 或蛋白质，去除杂质，重悬浮后供下游应用

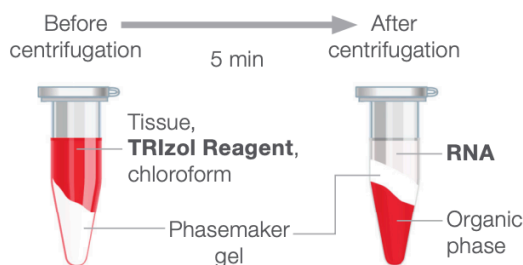


Figure 2: TRIzol

3. 核酸提取

3.1 样品前处理

- 组织：每 50-100mg 组织 (可速冻) 加入 1mL TRIzol 试剂，并用匀浆机破碎
- 单层贴壁细胞
 1. 移除培养基
 2. 使用预冷的 DPBS/PBS 冲洗一遍细胞，吸取干净。有时候为了避免 mRNA 降解也不进行清洗。
 3. 加入 1mL (可根据细胞量适量减少 TRIzol 量) TRIzol 试剂到培养皿中裂解细胞

4. 一定要使用移液器反复吹打使细胞充分裂解
- 悬浮细胞处理
 1. 通过离心收集细胞并弃掉上清
 2. 由于悬浮细胞量大，向细胞中加入 1mL TRIzol
 3. 反复吹打使细胞裂解

 Tip

- 组织或细胞可以放置在 -80°C 中保存，直到使用前加入 TRIzol
- 也可以加入 TRIzol 后，样本可以在 4°C 保存过夜，第二天处理，也可以放在 -20°C 保存长达一年，-80°C 更长时间的保存，标签一定要做好
- TRIzol 味道很大，有很强的挥发性，建议在通风橱中进行

3.2 Total RNA 提取

1. 将上一步裂解的 TRIzol 混合物移到透明的 1.5mL 离心管中，室温孵育 5min 使核蛋白复合物完全解离
2. 每 1mL 的 TRIzol 试剂中添加 0.2mL 氯仿，盖紧试管盖子，然后通过摇动彻底混合

 Important

氯仿加进去之后，由于密度大，会沉在离心管底部，一定要进行摇匀，否则离心之后会失败

3. 室温孵育 2-3min
4. 在 4°C 下 12,000×g 离心样本 15 分钟

混合物分离成下层的红色苯酚 - 氯仿层和以及无色的上层水相

5. 通过 45° 倾斜试管并将透明溶液吸出，将含有 RNA 的水相转移到新管中

! Important

主要是吸取透明的上清，不能吸取白色的中间层和下面红色层，如果吸取了可以打掉只保留透明的部分，45° 或者垂直吸取都可以，也可以保留一些不必要全部抽取干净

6. 1mL TRIzol 大约能抽取 0.4-0.5mL 的上清液，然后加入 0.5mL 异丙醇
7. 4°C 或者室温孵育 10min
8. 在 4°C 下 12,000×g 离心 10 分钟

总 RNA 沉淀在试管底部形成白色凝胶状沉淀

9. 使用移液器小心的去掉上清液

3.3 洗涤 RNA

1. 按照每 1mL TRIzol 试剂裂解处理所得到的沉淀重悬于 75% 乙醇中
2. 短暂涡旋样本后，在 4°C 下 7500×g 离心 5 分钟
3. 使用微量移液器弃去上清液
4. 将 RNA 沉淀在真空或空气下干燥 5-10 分钟

! Important

！切勿用真空离心机干燥沉淀。切勿让 RNA 沉淀过度干燥。以确保 RNA 的完全溶解。部分溶解的 RNA 样本的 A230/280 比值 <1.6

3.4 溶解测量 RNA

1. 使用 20-50 L 不含 RNase 的水，或者 TE Buffer(官方还要加 0.1mMEDTA 或 0.5%SDS，看自己需求) 反复吹打使沉淀重新悬浮
2. 在 55-60°C 的水浴或加热块中孵育 10-15 分钟
3. 立即使用放置在冰浴中，或者长期保存在-70°C 下
4. 测定 RNA 含量和纯度。

每个仪器操作上可能有细微差别，但是总体一致，得到 A260/A280, A260/A230 来查看 RNA 的纯度和含量，更精确的定量，可以使用 [Qubit](#)



Figure 3: NanoPhotometer

4. 污染判断

A260 表示核酸在最高吸收峰 260nm 波长处的吸光度值，即 260nm 出核酸最容易吸收光，通过检测 260nm 处吸收的吸光度值可评测纯化双链 DNA，单链 DNA 或 RNA 样品的浓度。

Table 12: Adsorption

波长 (nm)	主要检测物质	应用
260 nm	核酸 (RNA、DNA)	用于计算核酸浓度
280 nm	蛋白质 (含芳香族氨基酸，如 Trp、Tyr)	用于判断蛋白污染
230nm	有机物/盐类 (乙醇、GTC、GuHCl、EDTA 等)	用于判断有机污染物

Table 13: 判断表

比值	正常值	偏离情况	可能的污染物或原因
A260/A280~2.0		<1.8	蛋白质、酚类
A260/A280>2.1		偏高可能为背景干扰或低浓度误差	仪器误差、杂质干扰
A260/A2302.0-2.2		<1.8	GTC (异硫氰酸胍)、GuHCl (盐酸胍)、乙醇、EDTA
A260/A230>2.4		不常见, 可能为测定误差	波长设置问题或杂质吸收峰移位

在 Table 12 中就可以得到下面中常见的干扰因素, 分母越大比值越小, 按照常见污染物的吸收峰即可大概推测到污染物来源, Table ?? 只能作为辅助, 并不是绝对的。之前还根据 A260/A280 大于 2 来判断 RNA 是否降解, 但是仅仅是经验之谈, 还需要跑胶验证。

RNA 的糖环比 DNA 多一个自由羟基, 并且环境中存在大量的 RNA 酶, 因此提取 RNA 很容易出现降解的情况。紫外分光光度计方法很难分辨提取的 RNA 是否完整, 因为无论时完整的 (intact RNA) 还是片段化的 RNA (degraded RNA) 在 260 nm 处都会有一个吸光值

EDTA 在 ~230 nm 处有最高吸收峰, 因此会降低 A260/A230 比值, 但是当 EDTA 螯合 Mg^{2+} 或 Ca^{2+} 后, EDTA-阳离子复合物的紫外吸光度会显著低于游离 EDTA, 因此在含有二价阳离子的 EDTA 溶液中测量 DNA A260/A230 比值很可能超过 3.0。这也是为什么 pure RNA 在 10 mM Tris pH 8.5 溶液中 A260/A230 比值在 2.3-2.4 之间, 而在 TE 缓冲液 (Tris-EDTA) 中 A260/A230 比值在 2.6-3.0 之间

Note

核酸的提取仅仅是下游应用的开始, 注意枪头, 手, 唾液, 离心管和水中的核酶污染基本能控制核酸的完整性, 希望都能提到纯纯的核酸, 顺利进行下一步