

DNA/RNA 提取

DNA 和 RNA 不同的提取方案步骤

Table of contents

| | |
|------------------------|---|
| DNA 提取 | 1 |
| 质粒提取 | 1 |
| gDNA 提取 | 1 |
| RNA 提取 | 1 |
| mRNA 提取 | 2 |
| Total RNA 提取 | 9 |

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"/> 组织 | <input type="checkbox"/> 1.5mL 无核酶离心管 | <input type="checkbox"/> Qubit3.0 |
| <input type="checkbox"/> PBS/DPBS | <input type="checkbox"/> 1mL 移液器 (Eppendorf) | |
| | <input type="checkbox"/> 200 L 移液器 (Eppendorf) | <input type="checkbox"/> 恒温孵育器/水浴锅 |
| | <input type="checkbox"/> 10 L 移液器 (Eppendorf) | <input type="checkbox"/> DynaMag-2 Magnet |
| | <input type="checkbox"/> 2.5 L 移液器 (Eppendorf) | <input type="checkbox"/> Qubit3.0 |
| | <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 |

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

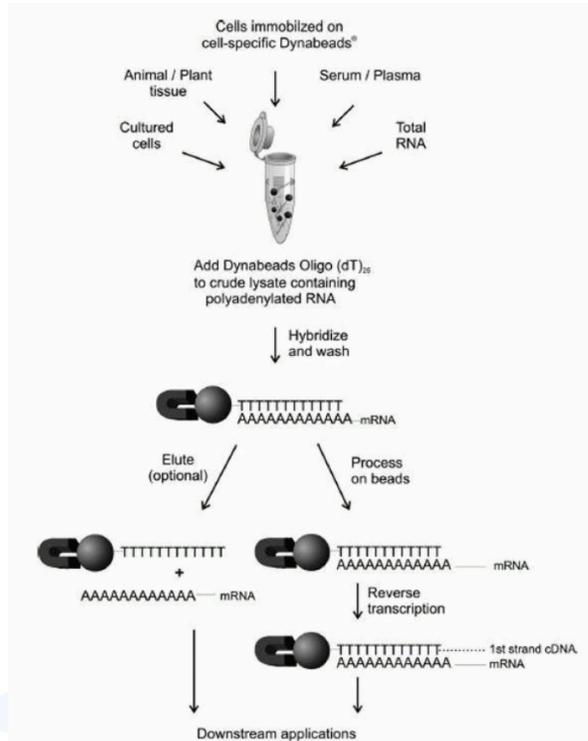


Figure 1: Beads 提取原理

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 |
|-------------|------------|------------|------|
| 250 μ L | 10 μ L | 50 μ L | 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

样照



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



Qubit3.0

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/μL 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/μL 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/μL 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

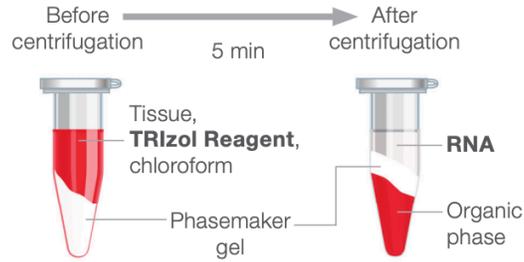


Figure 2: TRIzol

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 处核酸最容易吸收光，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 |

| 比值 | 正常值 | 偏离情况 | 可能的污染物或原因 |
|-----------|---------|-----------------|---------------------------------|
| 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/A230 | 0.0-2.2 | <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 Mg²⁺ 或 Ca²⁺ 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

i 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