

## 一、 实验准备阶段

### 1. 实验所需仪器

台式高速离心机；

微量加样器；

六十孔板。

### 2. 实验所需环境

普通实验室。

### 3. 实验所需样品

EDTA 抗凝人血、或其它哺乳动物的 EDTA 抗凝血液。

### 4. 实验所需试剂及耗材

1.5m 离心管、加样器吸头、异丙醇、无水乙醇、高纯水。

90%乙醇洗涤液配制：取 45ml 无水乙醇溶液，加入 5ml 的新鲜高纯水，混匀。

### 5. 注意事项

1) 该方法不适宜放置于-70~0 摄氏度下冰箱中保存的抗凝血样本。

2) 在室温下放置了过长的 EDTA 抗凝血，所提取的 DNA 得量会减少，甚至消失。但室温下放置 3 个月的人抗凝血标本，也能提取到少量的 DNA。

3) 本说明书中，离心特指室温下进行 12,000g、5 分钟（或 3,000g、20 分钟）离心；短暂离心特指室温下进行 12,000g、30 秒钟（或 3,000g、5 分钟）离心。

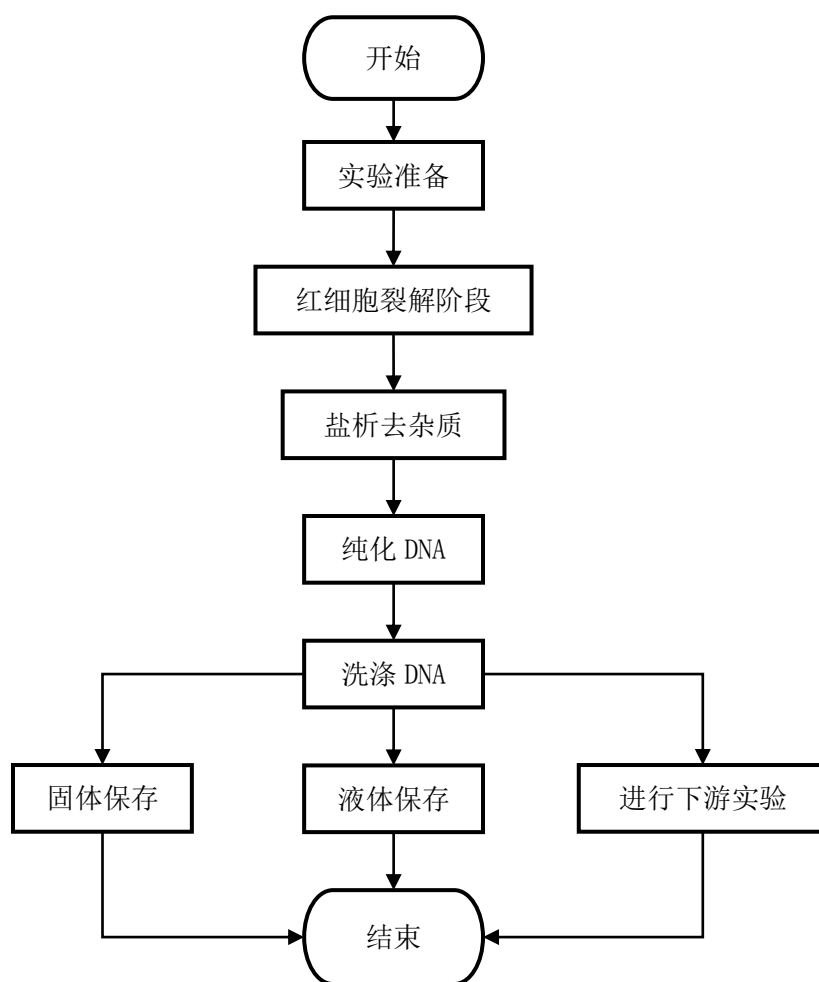
4) 在核酸的四相纯化步骤中，快速倒掉异丙醇上相和高盐下相液体，可避免上下相之间的杂质固相挂在离心管壁上，并在离心管中形成一个无蛋白、包括无核酸酶的微小环境。如倾倒缓慢，会导致杂质相挂在管壁，污染核酸样品。

5) 在操作时，需戴上手套，并在整洁的环境下进行。如皮肤、粘膜上黏上了试剂成分，可以用大量自来水冲洗。

## 二、 提取阶段

提取流程图

## 人指血固体 RNA 和固体 DNA 提取操作说明



### 1. 红细胞裂解阶段

#### 红细胞裂解方法 1

1) 在 1.5ml 离心管中加入 0.1~0.3ml EDTA 抗凝血, 和 1ml 蒸馏水, 盖上盖, 反复颠倒 10 次, 进行充分混合, 可见血细胞悬液变得澄清; 进行室温下 12,000g, 1 分钟离心。

2) 取出离心管, 倒掉里面的液体, 并轻轻甩动, 尽量去掉残液; 重复上次的离心, 然后用微量加液器吸出残存的液体, 留下细胞核沉淀。

3) 加入 250 微升试剂 1 到离心管中, 盖上盖, 反复上下晃动离心管, 让液体悬浮细胞核沉淀, 静置~15 分钟后, 可见离心管中液体由不透明变成澄清状态, 说明细胞全部破裂了。

#### 红细胞裂解方法 2

1) 在 1.5ml 离心管中加入 0.3~0.5ml EDTA 抗凝血, 和 1ml 蒸馏水, 盖上盖, 反复颠倒 10 次, 进行充分混合, 可见血细胞悬液变得澄清; 进行室温下 12,000g, 1 分钟离心。

## 人指血固体 RNA 和固体 DNA 提取操作说明

2) 取出离心管,倒掉里面的液体,并轻轻甩动,尽量去掉残液;再加入 0.5ml 蒸馏水,盖上盖,反复颠倒 10 次,以充分悬浮细胞沉淀;重复上次的离心。

3) 倒掉离心管中液体,并倒扣离心管于滤纸(或者面巾纸)上,以尽可能淋干离心管中的残液(一般放置 3~5 分钟后,离心管中残液只剩下不到 50 微升,完全可以达到提取的要求);加入 250 微升 试剂 1 到离心管中,盖上盖,反复上下晃动离心管,让液体悬浮细胞核沉淀;静置 3~15 分钟后,可见离心管中液体由不透明变成澄清状态。

### 红细胞裂解方法 3

1) 在含有 1.0~2.0ml EDTA 抗凝血的抗凝管中,加入 3ml 蒸馏水,盖上盖,反复颠倒 10 次,进行充分混合,然后稍稍静置抗凝管,可见管内血细胞悬液变得澄清;进行室温下 2,000g, 3 分钟离心。

2) 取出抗凝管,倒掉里面的液体,并轻轻甩动,尽量去掉残液;再加入 1ml 蒸馏水,盖上盖,反复颠倒 10 次,以充分悬浮细胞沉淀;重复上次的离心。

3) 倒掉离心管中液体,并倒扣离心管于滤纸(或者面巾纸)上,以尽可能淋干离心管中的残液(一般放置 3~5 分钟后,离心管中残液只剩下不到 50 微升,完全可以达到提取的要求);加入 250 微升试剂 1 到离心管中,盖上盖,反复上下晃动离心管,让液体悬浮细胞核沉淀,静置 3~15 分钟后,可见离心管中液体由不透明变成澄清状态。40 微升人指血(或者其它哺乳动物的现采无抗凝剂的新鲜血)到一个 1.5ml 的离心管中的 210ul 试剂 1(加入 200 ul 试剂 A 和 10 ul 试剂 B,混合而成)中,并加入球磨珠,进行室温下的珠磨匀浆,打碎细胞。(储存:该血液解离液可以在室温下放置 1 星期,在冰上放置 1 个月,在-20℃下放置 3 个月,不影响全核酸提取效果)

## 2. 盐析去杂质阶段

加 0.70ml 试剂 2 到前叙离心管中,盖上盖,反复颠倒 5 次以上,充分混合管内液体;将红细胞裂解方法 1、2 中的 1.5ml 的离心管进行离心(对于红细胞裂解方法 3,则将抗凝管进行 2,000g 5 分钟的室温下离心);离心后,将离心管内的上清液倒入一个新的 1.5ml 离心管中。

## 3. DNA 的四项纯化步骤

1) 向新离心管中加 0.50ml 异丙醇,盖上盖;反复颠倒离心管五次以上,以混合管内液体,然后静置 5~30 分钟以上。

2) 再加入 100 微升蒸馏水到离心管中，并充分混合管内液体；将离心管离心；离心后，取出离心管。

3) 将离心管中的上下液相及其之间的固体杂质快速倒掉；倒扣离心管于滤纸上数秒钟，以便流干管内液体。

#### 4. 洗涤和保存阶段

1) 加 1ml 70%乙醇洗涤液到离心管中；盖上离心管，并反复颠倒离心管以悬浮 DNA 沉淀，然后静置离心管数秒(或短暂离心)；当白色核酸沉淀到达离心管底部，缓慢倒掉乙醇洗涤液，并倒扣离心管于滤纸上 10 秒钟以上。

2) 用无水乙醇代替 70%乙醇洗涤液，重复步骤 4.1 步骤；但将离心管倒扣滤纸数秒后，应将离心管敞盖平放，让残留乙醇很快挥发，同时防止离心管底部的 DNA 沉淀脱离离心管底部、掉到滤纸上，导致丢失。

3) 盖上离心管，可在室温下将离心管中的 DNA 沉淀固体进行保存和邮寄。将上述 DNA 沉淀固体溶解于适量体积的高纯水后，可直接用于下游实验，或者放于-20℃或者更低温的冰箱中储存。