

## 一、 实验准备阶段

### 1. 实验所需仪器

台式高速离心机；

组织匀浆器（也可以用液氮研磨设备，部分样品可以用 Dounce 匀浆器）；

操作台（无 RNase 污染）；

微量加样器；

六十孔板。

### 2. 实验所需环境

普通实验室，若该实验室做过提取 DNA 的实验，则需要在操作台中进行实验。

### 3. 实验所需样品

人指血和哺乳动物的新鲜血。

### 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。

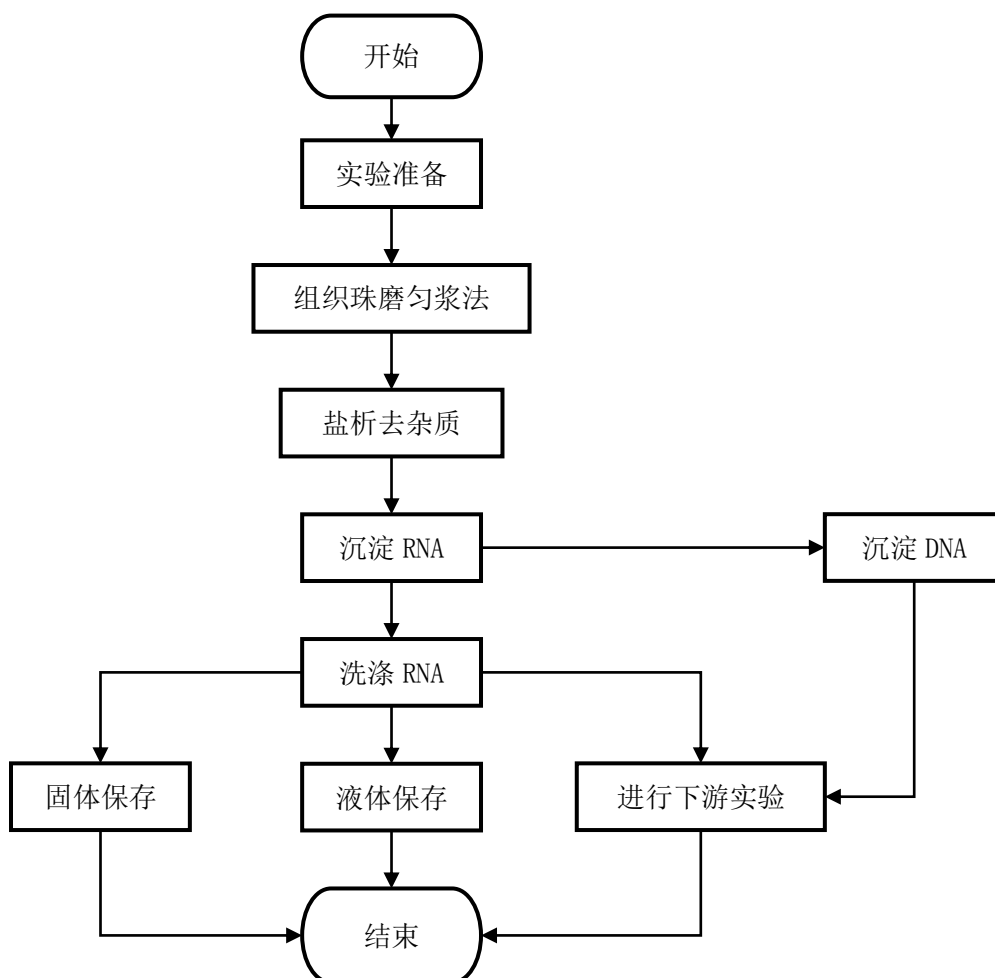
### 5. 注意事项

- a) 该方法不适宜放置于 4 度冰箱中的各种抗凝血样本；也不适合用于一些鱼类，两栖类，爬行类，鸟类的血液全核酸提取。
- b) 将试剂 A 和试剂 B 按照 20:1 的体积比，所配制的试剂 1，需要现制现用，不能存放过夜。
- c) 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。
- d) 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。

- e) 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



### 1. 匀浆阶段

取 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 **700 $\mu$  1 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；然后，将离心管在室温下进行 12,000g、5 分钟离心；离心后，将离心管中上清液倒入一个新的低吸附 1.5ml 离心管中。

## 3. 沉淀 RNA 阶段

### 1) 混匀

向离心管中加 **500 $\mu$  1 异丙醇**，盖上盖反复颠倒离心管 10 次以上进行充分混合，然后室温下放置 15 分钟。

### 2) 离心

将离心管在室温下进行 12,000g、5 分钟离心，离心后取出离心管，常常可见其底部的白色沉淀。（注：有些生物材料含有的 RNA 量少，就见不到离心管底部的核酸颗粒，但在洗涤阶段中，可见在酒精洗涤液中漂浮的核酸沉淀）

从此步骤开始所有的操作必须在无 RNase 污染的环境下进行，特别是实验室不能使用 RNase A。所用的所有试剂和耗材，如洗涤用乙醇，溶解 RNA 的水，都必须是无 RNase 污染的。

### 3) 倒液

将离心管中的上下液相及其之间的固体杂质**快速倒掉**，放入一个新的 1.5ml 离心管中（用于固体 DNA 提取）；然后倒扣原离心管于面巾纸上 3 秒钟，以便流干管内液体，留在离心管底部的白色沉淀是固体 RNA。（注：**快速倒掉**离心管中的液体，可以防止上下液相之间的杂质挂在离心管壁上，导致固体 RNA 的污染）

## 4. 洗涤和保存阶段

### 1) 洗涤

加 1ml **70%乙醇**洗涤液到离心管中，反复颠倒 5 次，洗涤离心管中的固体 RNA，然后短暂离心（室温下进行 12,000g、30 秒离心），**缓慢倒掉**乙醇洗涤液。（注：在短暂离心之后，得到的固体 RNA 没有任何蛋白污染，在乙醇洗涤液中的粘性极低，所以要**缓慢倾倒**乙醇洗涤液，以防止固体 RNA 随着乙醇洗涤液而倒掉）

用**无水乙醇**代替 70%乙醇，重复上一次洗涤。

## 2) 室温固体保存

晾干离心管内的无水乙醇。将离心管盖上盖，可以将固体 RNA 放于室温下，进行保存和邮寄。正常情况下可保存 1 个月。（晾干过程，可倒扣离心管于面巾纸上 3 秒，然后平放离心管，以便完全蒸发残留乙醇，同时又防止 RNA 掉落到面巾纸上而丢失。）

## 3) 液体保存

将上述 RNA 沉淀固体溶解于适量体积的无 RNase 的高纯水后，可放于-20℃或者更低温度的冰箱中储存一年以上。

## 4) 进行下游实验

将上述 RNA 沉淀固体溶解于适量体积的无 RNase 的高纯水后，可直接用于下游实验。

## 5. 沉淀 DNA 阶段

将沉淀 RNA 阶段中倒入新离心管中的剩余液体中加入 100 $\mu$ l 蒸馏水，并盖上盖，反复颠倒离心管以混匀其内液体。然后参照 RNA 提取步骤进行离心提取、洗涤、保存固体 DNA。