



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118325893 A

(43) 申请公布日 2024. 07. 12

(21) 申请号 202410434316.5

(22) 申请日 2024.04.11

(71) 申请人 徐州医科大学

地址 221000 江苏省徐州市铜山路209号

(72) 发明人 刘英奎 周翔 董佳佳 李家乐

刘思琪 李婷 刘永 李冲

(74) 专利代理机构 北京淮海知识产权代理事务

所(普通合伙) 32205

专利代理师 李妮

(51) Int. Cl.

C12N 15/10 (2006.01)

C07K 1/14 (2006.01)

C07K 1/30 (2006.01)

权利要求书2页 说明书6页 附图5页

(54) 发明名称

一种同时提取生物组织中总代谢物、总RNA、DNA和蛋白质的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种同时提取生物组织中总代谢物、总RNA、DNA和蛋白质的方法,该方法首先使用甲醇/三氯甲烷混合物进行初始的代谢物提取,该步骤同时将RNA、DNA和蛋白质留在沉淀中;然后通过加入TRIzol试剂和三氯甲烷,利用不同生物分子在不同相中的分布特性,实现了RNA、DNA和蛋白质的有效分离。该方法优化了传统的提取流程,通过精确控制试剂的加入量和离心条件,最大限度地减少了样本损失的同时并保证了提取物的质量。本发明简单方便有效,解决了在单独提取每种生物分子可能会导致污染,使得提取结果不准确以及提取过程效率低下等问题,可以获得高质量的产物,满足后续实验的要求。



CN 118325893 A

1. 一种同时提取生物组织中总代谢物、总RNA、DNA和蛋白质的方法,其特征在于,包括以下步骤:

A、取新鲜组织置于离心管中,在液氮环境中充分研磨成细粉状;

B、向步骤A中的离心管中加入甲醇与三氯甲烷的混合液,旋转孵育析出代谢物,离心得到上清液和沉淀,代谢物析出保留在上清液中,将上清液转移至新的离心管中,低温保存;RNA、DNA和蛋白质保留在沉淀中,从沉淀中连续依次分离RNA、DNA和蛋白质;

C、向步骤B中所得到的沉淀中加入TRIzol试剂得到细胞裂解物,将细胞裂解物孵育后离心,得到上清液和沉淀,弃沉淀;

D、将步骤C得到的上清液转移至新的离心管中,加入三氯甲烷,剧烈震荡混匀孵育,离心后得到水相、中间相和苯酚-三氯甲烷相;

E、RNA保留在步骤D中的水相中,将水相转移至新的离心管中,加入异丙醇,颠倒混匀后置冰箱中静置,离心得到上清液和沉淀,弃上清液,多次洗涤沉淀,将洗涤后的沉淀再次离心后吸去残留液体,将沉淀干燥后溶解在水中低温保存;

F、DNA保留在步骤D中的中间相中,蛋白质保留在步骤D中的苯酚-三氯甲烷相中,在苯酚-三氯甲烷相和中间相的混合物中加入乙醇,颠倒静置,离心后得到沉淀和上清液;

G、DNA保留在步骤F得到的沉淀中,将沉淀转移至新的离心管中,多次洗涤沉淀,在沉淀中加入乙醇,静置,离心弃上清液,沉淀干燥后溶解在水中低温保存;

H、蛋白质保留在步骤F得到的上清液中,将上清液转移至试管中,加入异丙醇,静置,离心后得到沉淀和上清液,弃上清液,蛋白质保留在沉淀中,多次洗涤沉淀,离心后干燥,加入十二烷基硫酸钠水浴使沉淀完全溶解后低温保存。

2. 根据权利要求1所述的一种同时提取生物组织中总代谢物、总RNA、DNA和蛋白质的方法,其特征在于,步骤A的具体步骤为:取饲养的目标动物在低温条件下冷冻麻醉,然后取组织置于离心管中,并立即置于液氮中冷冻;在装有组织的离心管中加入液氮使组织脆化,用匀浆器将组织研磨成粉末至无明显颗粒存在。

3. 根据权利要求1或2所述的一种同时提取生物组织中总代谢物、总RNA、DNA和蛋白质的方法,其特征在于,步骤B中,所述甲醇与三氯甲烷之间的体积比为9:1;

所述旋转温度为4°C,旋转时间为10min,旋转转速为50rpm;所述离心温度为4°C,离心时间为10min,离心转速为500g;所述低温为-80°C。

4. 根据权利要求1或2所述的一种同时提取生物组织中总代谢物、总RNA、DNA和蛋白质的方法,其特征在于,步骤C中的TRIzol试剂与步骤D中的三氯甲烷之间的体积比为1:0.2;步骤C中,所述的孵育温度为室温,孵育时间为15min;所述离心温度为4°C,离心时间为10min,离心转速为13000g。

5. 根据权利要求1或2所述的一种同时提取生物组织中总代谢物、总RNA、DNA和蛋白质的方法,其特征在于,步骤D中,所述孵育温度为室温,孵育时间为3min;所述离心温度为4°C,离心时间为15min,离心转速为13000g。

6. 根据权利要求1或2所述的一种同时提取生物组织中总代谢物、总RNA、DNA和蛋白质的方法,其特征在于,步骤E中,所述异丙醇与水相之间的体积比为1:1,所述静置温度为-80°C,静置时间为1h;所述离心温度为4°C,离心时间为10min,离心转速为13000g;所述再次离心温度为4°C,离心时间为5min,离心转速为13000g;

所述洗涤方法具体为:在沉淀中加入洗涤液DEPC-75%乙醇,DEPC-75%乙醇为采用DEPC水配制的体积分数为75%的乙醇溶液,上下颠倒将RNA沉淀悬起进行洗涤,在离心温度为4°C,离心时间为5min,离心转速为7500g的条件下,离心弃上清,重复该洗涤过程一次;每次加入的洗涤液DEPC-75%乙醇与TRIzol试剂之间的体积比为1:1;

所述沉淀干燥为开盖室温干燥5~10min;所述将沉淀干燥后溶解在水中的水为RNase-free双蒸水;所述低温为-80°C。

7.根据权利要求1或2所述的一种同时提取生物组织中总代谢物、总RNA、DNA和蛋白质的方法,其特征在于,步骤F中,苯酚-三氯甲烷相和中间相的混合物、TRIzol试剂与乙醇之间的体积比为1:1:0.3;乙醇体积分数为100%;所述静置温度为室温,静置时间为3min;所述离心温度为4°C,离心时间为5min,离心转速为7500g。

8.根据权利要求1或2所述的一种同时提取生物组织中总代谢物、总RNA、DNA和蛋白质的方法,其特征在于,步骤G中,所述洗涤方法具体为:在沉淀中加入洗涤液体积分数为10%的乙醇,室温静置10~30min,在离心温度为4°C、离心转速为7500g、离心时间为5min的条件下,离心弃上清,重复该洗涤过程一次;

沉淀洗涤结束后再次加入体积分数为75%的乙醇;所述静置温度为室温,静置时间为10~30min;所述离心温度为4°C,离心时间为5min,离心转速为4000g;所述沉淀干燥为开盖室温干燥5~10min;所述沉淀干燥后溶解在水中的水为RNase-free双蒸水;TRIzol试剂、体积分数为10%的乙醇与体积分数为75%的乙醇之间的体积比为1:1:1。

9.根据权利要求1或2所述的一种同时提取生物组织中总代谢物、总RNA、DNA和蛋白质的方法,其特征在于,步骤H中,所述静置温度为室温,静置时间为10min;所述离心温度为4°C,离心时间为10min,离心转速为12000g;TRIzol试剂与异丙醇的体积比为1:1.5;

所述洗涤方法具体为:在沉淀中加入洗涤液0.3M盐酸胍-95%乙醇溶液,0.3M盐酸胍-95%乙醇溶液为采用0.3M盐酸胍配制的体积分数为95%的乙醇溶液,室温静置10min,在离心温度为4°C、离心转速为7500g、离心时间为5min的条件下,离心弃上清,在沉淀中加入无水乙醇,室温静置10min,在离心温度为4°C、离心转速为7500g、离心时间为5min的条件下,离心弃上清;TRIzol试剂、洗涤溶液0.3M盐酸胍-95%乙醇与无水乙醇之间的体积比为1:1:1;

所述干燥为开盖室温干燥20~30min;所述十二烷基硫酸钠的质量分数为1%,水浴温度为50~60°C。

10.根据权利要求1或2所述的一种同时提取生物组织中总代谢物、总RNA、DNA和蛋白质的方法,其特征在于,所述离心管均为RNase-free离心管。

## 一种同时提取生物组织中总代谢物、总RNA、DNA和蛋白质的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种同时提取生物组织中总代谢物、总RNA、DNA和蛋白质的方法。

### 背景技术

[0002] 目前,研究人员通过分离并研究组织中的总代谢物、DNA、RNA、蛋白质等生物分子来深入了解基因功能、表达调控、蛋白质结构与功能等生物学特征,从而揭示生物体内各种生物过程的机制。其次,生物样品中生物分子的提取和分离也为疾病研究与诊断提供了基础。通过分析血液、组织等样品中的特定生物分子,研究人员能够进行疾病的准确诊断、疾病进展的监测以及治疗方案的评估,为医学领域的进步提供了重要支持。此外,生物样品中生物分子的提取和分离对药物研发与评估、生物工程与生物制造以及生态研究与环境监测也至关重要。在药物研发过程中,了解药物在生物体内的代谢过程、靶点和副作用等信息需要进行生物分子的分离和研究;而在生态学和环​​境科学领域,分析生物样品中的DNA、RNA等分子可以评估生态系统的健康状况、生物多样性以及环境污染物的分布和影响,为环境保护提供数据支持。

[0003] 传统上,生物学研究通常需要使用多种不同的实验方法来分别提取和分离生物样品中的各种单一的生物分子,如代谢物、RNA、DNA和蛋白质。这些传统方法通常需要分别进行,并且在处理过程中可能会导致样品的损失或污染,这不仅耗时而且可能导致样本之间的可比性降低,从而影响结果的准确性和可重复性。此外,目前各种“组学”技术用于全面了解生物系统内生物分子的复杂相互作用。基因组学、转录组学、蛋白质组学和代谢组学的技术发展使得能够以高通量方式监测和定量生物分子。当不使用相同的样品进行全面的分子分析时,组学技术的整合是困难的。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供了一种同时提取生物组织中总代谢物、总RNA、DNA和蛋白质的方法,该方法能提高提取效率和提取结果的准确性。

[0005] 为实现上述发明目的,本发明采用的技术方案为:

[0006] 一种同时提取生物组织中总代谢物、总RNA、DNA和蛋白质的方法,包括以下步骤:

[0007] A、取新鲜组织置于离心管中,在液氮环境中充分研磨成细粉状;

[0008] B、向步骤A中的离心管中加入甲醇与三氯甲烷的混合液,旋转孵育析出代谢物,离心得到上清液和沉淀,代谢物析出保留在上清液中,将上清液转移至新的离心管中,低温保存;RNA、DNA和蛋白质保留在沉淀中,从沉淀中连续依次分离RNA、DNA和蛋白质;

[0009] C、向步骤B中所得到的沉淀中加入TRIzol试剂得到细胞裂解物,将细胞裂解物孵育后离心,得到上清液和沉淀,弃沉淀;

[0010] D、将步骤C得到的上清液转移至新的离心管中,加入三氯甲烷,剧烈震荡混匀孵

育,离心后得到水相、中间相和苯酚-三氯甲烷相;

[0011] E、RNA保留在步骤D中的水相中,将水相转移至新的离心管中,加入异丙醇,颠倒混匀后置冰箱中静置,离心得到上清液和沉淀,弃上清液,多次洗涤沉淀,将洗涤后的沉淀再次离心后吸去残留液体,将沉淀干燥后溶解在水中低温保存;

[0012] F、DNA保留在步骤D中的中间相中,蛋白质保留在步骤D中的苯酚-三氯甲烷相中,在苯酚-三氯甲烷相和中间相的混合物中加入乙醇,颠倒静置,离心后得到沉淀和上清液;

[0013] G、DNA保留在步骤F得到的沉淀中,将沉淀转移至新的离心管中,多次洗涤沉淀,在沉淀中加入乙醇,静置,离心弃上清液,沉淀干燥后溶解在水中低温保存;

[0014] H、蛋白质保留在步骤F得到的上清液中,将上清液转移至试管中,加入异丙醇,静置,离心后得到沉淀和上清液,弃上清液,蛋白质保留在沉淀中,多次洗涤沉淀,离心后干燥,加入十二烷基硫酸钠水浴使沉淀完全溶解后低温保存。

[0015] 进一步的,步骤A的具体步骤为:取饲养的目标动物在低温条件下冷冻麻醉,然后取组织置于离心管中,并立即置于液氮中冷冻;在装有组织的离心管中加入液氮使组织脆化,用匀浆器将组织研磨成粉末至无明显颗粒存在。

[0016] 优选的,步骤B中,所述甲醇与三氯甲烷之间的体积比为9:1;

[0017] 所述旋转温度为4°C,旋转时间为10min,旋转转速为50rpm;所述离心温度为4°C,离心时间为10min,离心转速为500g;所述低温为-80°C。

[0018] 优选的,步骤C中的TRIzol试剂与步骤D中的三氯甲烷之间的体积比为1:0.2;步骤C中,所述的孵育温度为室温,孵育时间为15min;所述离心温度为4°C,离心时间为10min,离心转速为13000g。

[0019] 优选的,步骤D中,所述孵育温度为室温,孵育时间为3min;所述离心温度为4°C,离心时间为15min,离心转速为13000g。

[0020] 优选的,步骤E中,所述异丙醇与水相之间的体积比为1:1,所述静置温度为-80°C,静置时间为1h;所述离心温度为4°C,离心时间为10min,离心转速为13000g;所述再次离心温度为4°C,离心时间为5min,离心转速为13000g;

[0021] 所述洗涤方法具体为:在沉淀中加入洗涤液DEPC-75%乙醇,DEPC-75%乙醇为采用DEPC水配制的体积分数为75%的乙醇溶液,上下颠倒将RNA沉淀悬起进行洗涤,在离心温度为4°C,离心时间为5min,离心转速为7500g的条件下,离心弃上清,重复该洗涤过程一次;每次加入的洗涤液DEPC-75%乙醇与TRIzol试剂之间的体积比为1:1;

[0022] 所述沉淀干燥为开盖室温干燥5~10min;所述将沉淀干燥后溶解在水中的水为RNase-free双蒸水;所述低温为-80°C。

[0023] 优选的,步骤F中,苯酚-三氯甲烷相和中间相的混合物、TRIzol试剂与乙醇之间的体积比为1:1:0.3;乙醇体积分数为100%;所述静置温度为室温,静置时间为3min;所述离心温度为4°C,离心时间为5min,离心转速为7500g。

[0024] 优选的,步骤G中,所述洗涤方法具体为:在沉淀中加入洗涤液体积分数为10%的乙醇,室温静置10~30min,在离心温度为4°C、离心转速为7500g、离心时间为5min的条件下,离心弃上清,重复该洗涤过程一次;

[0025] 沉淀洗涤结束后再次加入体积分数为75%的乙醇;所述静置温度为室温,静置时间为10~30min;所述离心温度为4°C,离心时间为5min,离心转速为4000g;所述沉淀干燥为

开盖室温干燥5~10min;所述沉淀干燥后溶解在水中的水为RNase-free双蒸水;TRIzol试剂、体积分数为10%的乙醇与体积分数为75%的乙醇之间的体积比为1:1:1。

[0026] 优选的,步骤H中,所述静置温度为室温,静置时间为10min;所述离心温度为4°C,离心时间为10min,离心转速为12000g;TRIzol试剂与异丙醇的体积比为1:1.5;

[0027] 所述洗涤方法具体为:在沉淀中加入洗涤液0.3M盐酸胍-95%乙醇溶液,0.3M盐酸胍-95%乙醇溶液为采用0.3M盐酸胍配制的体积分数为95%的乙醇溶液,室温静置10min,在离心温度为4°C、离心转速为7500g、离心时间为5min的条件下,离心弃上清,在沉淀中加入无水乙醇,室温静置10min,在离心温度为4°C、离心转速为7500g、离心时间为5min的条件下,离心弃上清;TRIzol试剂、洗涤液0.3M盐酸胍-95%乙醇与无水乙醇之间的体积比为1:1:1;

[0028] 所述干燥为开盖室温干燥20~30min;所述十二烷基硫酸钠的质量分数为1%,水浴温度为50~60°C。

[0029] 优选的,所述离心管均为RNase-free离心管。

[0030] 本发明采用了一系列操作来确保从单一组织样本中有效、高纯度地同时提取出这些生物大分子。关键步骤包括使用甲醇/三氯甲烷混合物进行初始的代谢物提取,此操作同时将RNA、DNA和蛋白质留在沉淀中;然后通过加入TRIzol试剂和三氯甲烷,利用不同生物分子在不同相中的分布特性,实现了RNA、DNA和蛋白质的有效分离。该方法优化了传统的提取流程,通过精确控制试剂的加入量和离心条件,最大限度地减少了样本损失的同时并保证了提取物的质量。此外,该方法还特别强调了样本准备过程中的细节,如低温条件下的组织冷冻和研磨,以保证生物分子的完整性和稳定性。这一系列操作的设计,旨在满足多组学研究中对于样本处理高效率、高纯度的严格要求,为后续的分析提供了可靠的样本准备工作。

[0031] 本发明的有益效果在于简单方便有效,解决了在单独提取每种生物分子可能会导致污染,使得提取结果不准确以及提取过程效率低下等问题,可以获得高质量的产物,满足后续实验的要求。

## 附图说明

[0032] 图1是本发明的流程框图;

[0033] 图2是组织代谢物色谱图;(a)是雌鼠脑组织代谢物色谱图,(b)是雄鼠脑组织代谢物色谱图;(c)是雌蟋蟀肌肉组织代谢物色谱图;(d)是雄蟋蟀肌肉组织代谢物色谱图;

[0034] 图3是实施例1和实施例2分别所提取的小鼠脑组织和蟋蟀肌肉组织总RNA完整性1%琼脂糖凝胶电泳检测结果图,图中:F-MB为雌鼠脑组织总RNA,M-MB为雄鼠脑组织总RNA,F-GL为雌蟋蟀肌肉组织总RNA,M-GL为雄蟋蟀肌肉组织总RNA;

[0035] 图4是实施例1和实施例2分别所提取的小鼠脑组织和蟋蟀肌肉组织DNA对COI基因PCR扩增结果的检测电泳图,图中:F-MB为雌鼠脑组织COI基因PCR扩增结果,F-GL为雌蟋蟀肌肉组织COI基因PCR扩增结果,M-MB为雄鼠脑组织COI基因PCR扩增结果,M-GL为雄蟋蟀肌肉组织COI基因PCR扩增结果;Marker为DNA标准分子标量D1000 DNA Ladder条带;

[0036] 图5是实施例1和实施例2分别所提取的小鼠脑组织和蟋蟀肌肉组织总蛋白Western Blot结果图;图中:F-MB为雌鼠脑组织总蛋白,F-GL为雌蟋蟀肌肉组织总蛋白,M-MB为雄鼠脑组织总蛋白,M-GL为雄蟋蟀肌肉组织总蛋白。

## 具体实施方式

[0037] 以下结合附图和具体实施例对本发明作进一步详细说明。

[0038] 以下实施例中,实施例所需试剂如下所示:

[0039] TRIzol™ Reagent (美国Thermo Fisher Scientific公司),

[0040] 三氯甲烷(国药集团化学试剂有限公司),

[0041] 异丙醇(国药集团化学试剂有限公司),

[0042] 75%无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司),

[0043] 琼脂糖(BBI Life Sciences Corporation),

[0044] Gel Red核酸染料(BBI Life Sciences Corporation),

[0045] DNALadder(天根生化科技有限公司),

[0046] RNase-free双蒸水(上海生工生物工程股份有限公司),

[0047] 10×MOPS缓冲液(北京索莱宝科技有限公司),

[0048] 甲醇(国药集团化学试剂有限公司),

[0049] 盐酸胍(上海生工生物工程股份有限公司),

[0050] 十二烷基硫酸钠(上海生工生物工程股份有限公司)。

[0051] 以下实施例中,实施例所需仪器如下所示:

[0052] 5424R冷冻离心机(德国Eppendorf公司),

[0053] JA2003天平(天津天马衡基仪器有限公司),

[0054] Chemidoc XRS+凝胶成像系统(美国BIO-RAD公司),

[0055] ND2000 NanoDrop分光光度计(美国Thermo Fisher Scientific公司),

[0056] 高速组织电动研磨器(OSE-Y30)(天根生化科技(北京)有限公司),

[0057] Vortex震荡仪(德国GENIE公司),

[0058] 电泳仪(美国BIO-RAD公司),

[0059] 移液枪(德国Eppendorf公司),

[0060] 眼科镊(上海生工生物工程股份有限公司),

[0061] 眼科剪(上海生工生物工程股份有限公司)。

[0062] 以下实施例中,以小鼠大脑的海马组织和双斑蟋蟀雌雄成虫组织为材料进行以下的说明;小鼠购于南京集萃药康生物有限公司。

[0063] 实施例1

[0064] 如图1所示,一种同时提取生物组织中总代谢物、总RNA、DNA和蛋白质的方法,包括以下步骤:

[0065] A、取C57小鼠海马组织约30mg置于1.5mLRNase-free离心管中,并立即置于液氮中冷冻;在装有组织的离心管中加入1mL液氮使组织脆化,用TGrinder第三代高速组织研磨器将组织研磨成粉末至无明显颗粒存在;

[0066] B、向步骤A中的离心管中加入体积比为9:1的甲醇与三氯甲烷的混合液,旋转孵育析出代谢物,所述旋转温度为4°C,旋转时间为10min,旋转转速为50rpm,离心得到上清液和沉淀,所述离心温度为4°C,离心时间为10min,离心转速为500g,代谢物析出保留在上清液中,将上清液转移至新的1.5mLRNase-free离心管中,-80°C下低温保存或将提取得到的代谢物质经质谱仪分析,得到一系列分离的峰值,反映了不同代谢物的丰度和特性,如图2所

示; ;RNA、DNA和蛋白质保留在沉淀中,从沉淀中连续依次分离RNA、DNA和蛋白质;

[0067] C、向步骤B中所得到的沉淀中加入1mL TRIzol试剂得到细胞裂解物,将细胞裂解物在室温下孵育15min后离心,所述离心温度为4℃,离心时间为10min,离心转速为13000g,得到上清液和沉淀,弃沉淀;

[0068] D、将步骤C得到的上清液转移至新的1.5mLRNase-free离心管中,加入200uL三氯甲烷,剧烈震荡混匀室温孵育3min,离心后得到水相、中间相和苯酚-三氯甲烷相,所述离心温度为4℃,离心时间为15min,离心转速为13000g;

[0069] E、RNA保留在步骤D中的水相中,将水相转移至新的1.5mL RNase-free离心管中,加入与水相等体积的异丙醇,颠倒混匀后置冰箱中静置,静置温度为-80℃,静置时间为1h,离心得到上清液和沉淀,所述离心温度为4℃,离心时间为10min,离心转速为13000g;弃上清液,多次洗涤沉淀,所述洗涤方法具体为:在沉淀中加入1mL洗涤液DEPC-75%乙醇,DEPC-75%乙醇为采用DEPC水配制的体积分数为75%的乙醇溶液,上下颠倒将RNA沉淀悬起进行洗涤,在离心温度为4℃,离心时间为5min,离心转速为7500g的条件下,离心弃上清,重复该洗涤过程一次;将洗涤后的沉淀再次离心后吸去残留液体,所述再次离心温度为4℃,离心时间为5min,离心转速为13000g;将沉淀开盖室温干燥5~10min后溶解在30-50uL的RNase-free双蒸水中于-80℃条件下低温保存,随后进行的RNA电泳分析显示对雌雄小鼠大脑海马组织提取的RNA电泳条带清晰、完整,无杂带,无DNA污染,表明RNA完整性较好(图3);

[0070] F、DNA保留在步骤D中的中间相中,蛋白质保留在步骤D中的苯酚-三氯甲烷相中,在苯酚-三氯甲烷相和中间相的混合物中加入300uL无水乙醇,颠倒室温静置3min,离心后得到沉淀和上清液,所述离心温度为4℃,离心时间为5min,离心转速为7500g;

[0071] G、DNA保留在步骤F得到的沉淀中,将沉淀转移至新的离心管中,多次洗涤沉淀,在沉淀中加入1mL洗涤液体积分数为10%的乙醇,室温静置10~30min,在离心温度为4℃、离心转速为7500g、离心时间为5min的条件下,离心弃上清,重复该洗涤过程一次;在沉淀中加入1mL体积分数为75%的乙醇,室温静置10~30min,离心弃上清液,所述离心温度为4℃,离心时间为5min,离心转速为4000g;沉淀开盖室温干燥5~10min后溶解在30-50uL的RNase-free双蒸水中于-80℃条件下低温保存;随后将雌雄小鼠大脑海马组织提取的DNA用通用引物COI扩增,显示COI电泳条带清晰、完整,无杂带,无DNA污染,表明DNA满足后续的实验(图4);

[0072] H、蛋白质保留在步骤F得到的上清液中,将上清液转移至5mLRNase-free试管中,加入1.5mL的异丙醇,室温静置10min,离心后得到沉淀和上清液,所述离心温度为4℃,离心时间为10min,离心转速为12000g,弃上清液,蛋白质保留在沉淀中,多次洗涤沉淀,所述洗涤方法具体为:在沉淀中加入1mL洗涤液0.3M盐酸胍-95%乙醇溶液,0.3M盐酸胍-95%乙醇溶液为采用0.3M盐酸胍配制的体积分数为95%的乙醇溶液,室温静置10min,在离心温度为4℃、离心转速为7500g、离心时间为5min的条件下,离心弃上清,在沉淀中加入1mL无水乙醇,室温静置10min,在离心温度为4℃、离心转速为7500g、离心时间为5min的条件下,离心弃上清后开盖室温干燥20~30min,加入40-60uL质量分数为1%的十二烷基硫酸钠于50~60℃的水浴温度条件下水浴使沉淀完全溶解后低温保存,后续的SDS-PAGE电泳后得到的总蛋白条带分布清晰可辨,界限分明,没有模糊或弥散的现象(图5)。

[0073] 实施例2

[0074] 该实施例中的方法步骤与实施例1一致,仅仅只是将步骤A中的C57小鼠替换为双斑蟋蟀成虫,双斑蟋蟀若虫购于河南蟋王生态繁育基地,随后在实验室进行饲养。取双斑蟋蟀成虫(2-3周)在-20℃低温条件下冷冻麻醉5-7min,然后用均为长度12.5cm的小型医用手镊子和剪刀取40~50mg组织,,其他方法步骤与实施例1一致,对应的结果见图2-5。

[0075] 如图3所示,电泳条带清晰、完整,无杂带,无DNA污染,表明蟋蟀肌肉组织提取的RNA完整性较好。

[0076] 如图4所示,电泳条带清晰单一且符合COI基因分子量大小,表明从蟋蟀肌肉组织所提DNA纯度较好。

[0077] 如图5所示,SDS-PAGE蛋白条带单一且颜色较深,说明所提蛋白浓度较高。

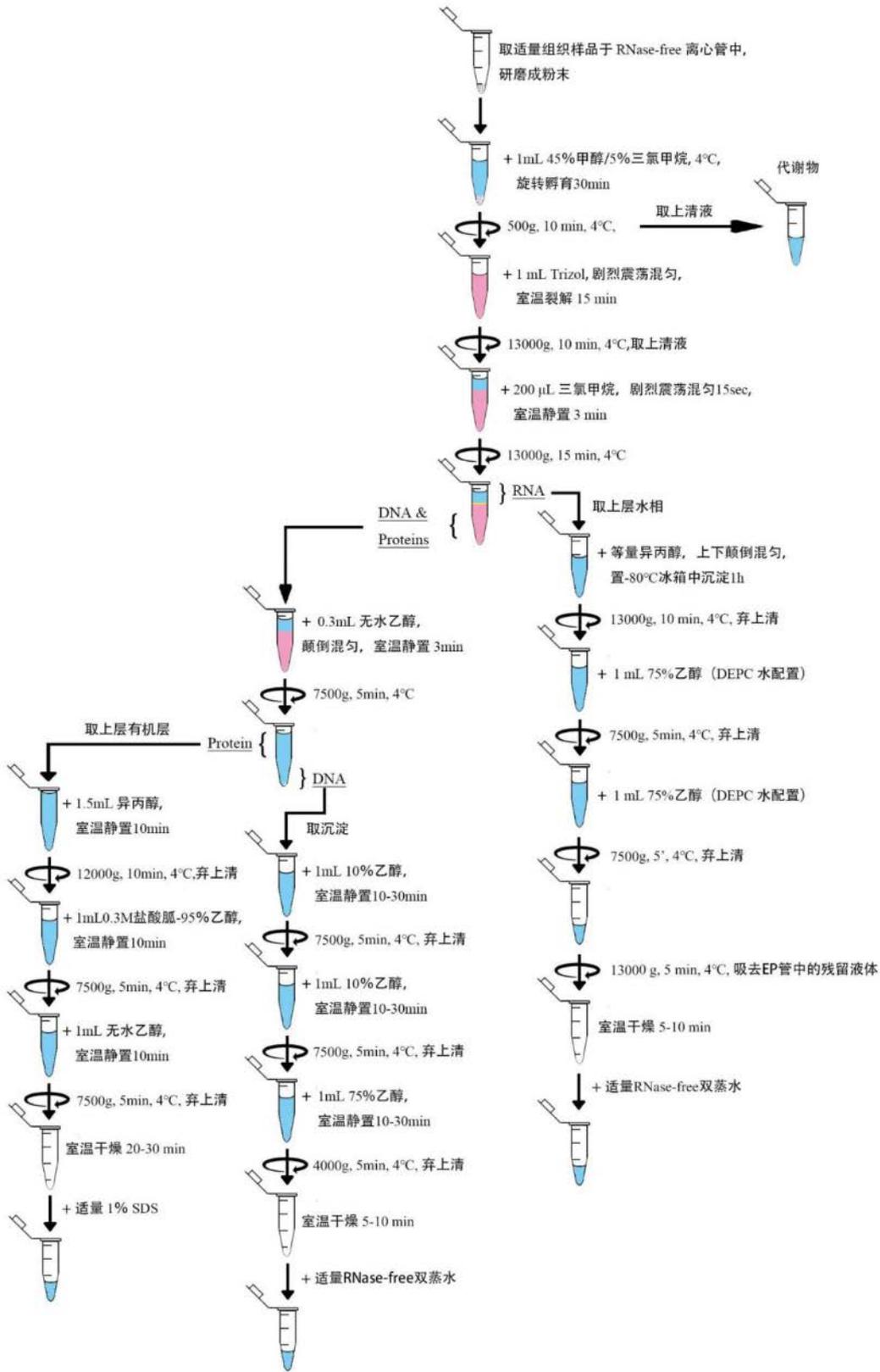
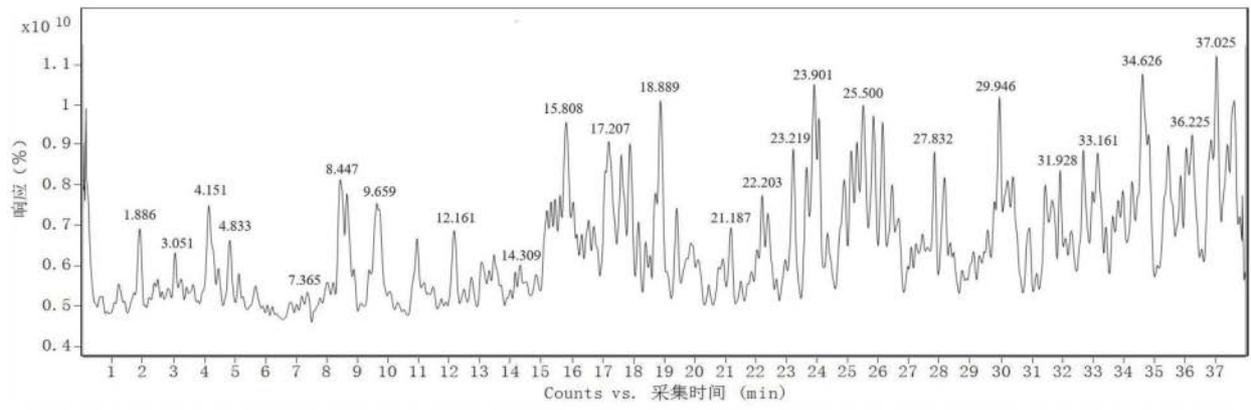
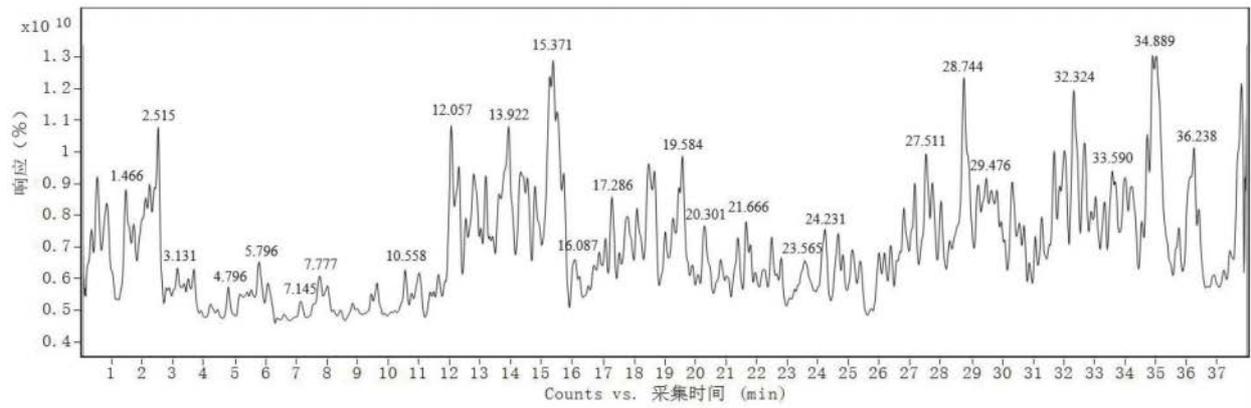


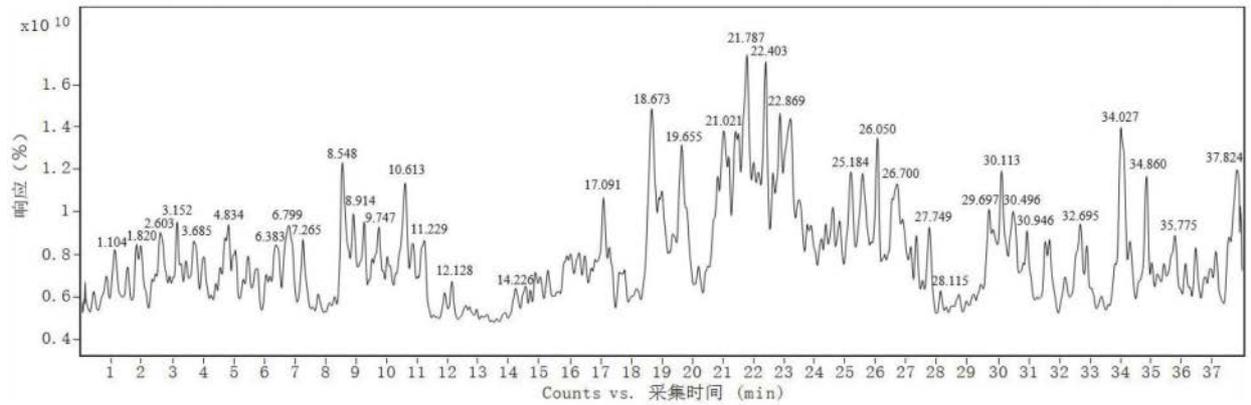
图1



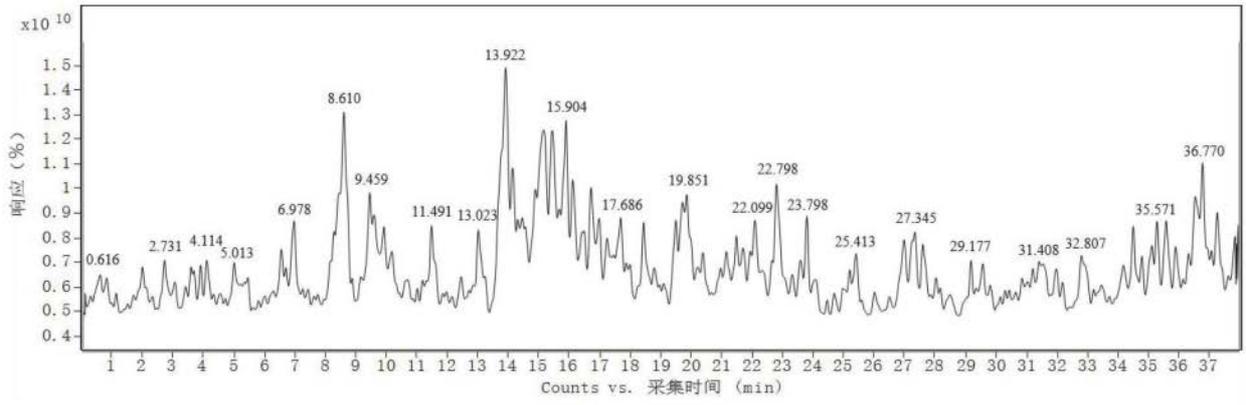
a



b



c



d

图2

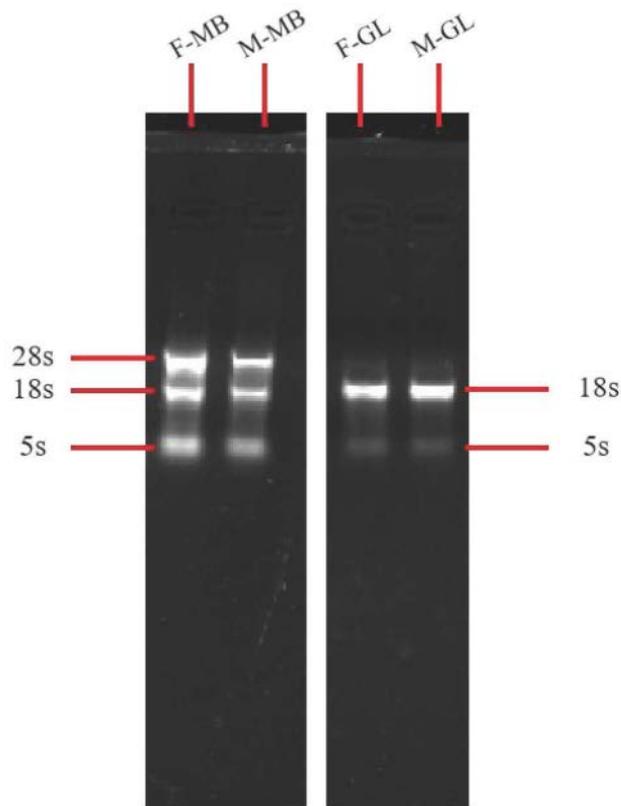


图3

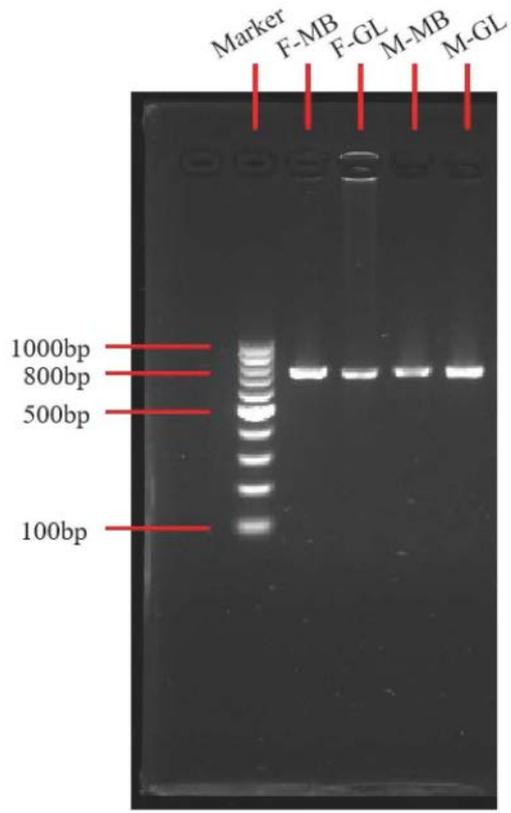


图4

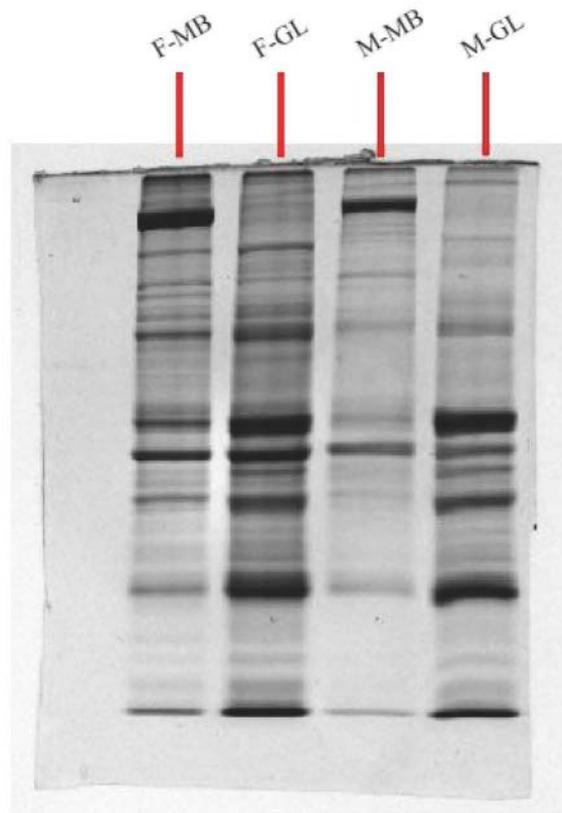


图5