

DNase On Column Kit

简介

DNase On Column Kit 是专门为柱式 RNA 抽提试剂盒而设计的。在 RNA 抽提过程中, 插入 DNase 的柱上消化步骤, 以确保得到无 DNA 污染的 RNA。DNase I 是一种非特异性的核酸内切酶, 切割 DNA 产生具有 3'-羟基和 5'-磷酸末端的二、三和寡聚核苷酸产物。DNase I 可作用于单链、双链、DNA/RNA 杂交体。该产品可同 Magen 的柱式 RNA 抽提试剂盒相配合使用, 也适合于其它公司的柱子 RNA 抽提试剂盒。

生物样品经裂解液匀浆裂解, 加入乙醇调节结合条件后, 转移到 RNA 柱子吸附 RNA。经洗涤液洗涤柱子去除高盐后, 把 DNase 消化液加到柱子的膜上, 室温(25-37°C)消化 15-30 分钟就可以彻底去除膜上吸附的 DNA, 再经三次洗涤去除 DNase 和降解的 DNA 后, 最后用 DEPC 水洗脱出 RNA。得以的 RNA 无 DNA 污染, 无 DNase 污染, 可直接用于荧光定量 RT-PCR 等。

组成

DNase On Column Kit

产品成分	R4911-00	R4911-01	R4911-02
Mini/Micro Kit	10 Preps	50 Preps	250 Preps
Midi Kit	2 Preps	10 Preps	50 Preps
Maxi Kit	1 Preps	5 Preps	25 Preps
Buffer RW1	10 ml	50 ml	250 ml
DNase Buffer	1.8 ml	6 ml	30 ml
DNase I	120ul	600ul	5 x 600ul

保存条件

DNase On Column Kit 保存于-20~8°C。

使用方法

A. 少量抽提柱

- 按柱式 RNA 抽提少量或微量试剂盒的说明书进行操作: 加入裂解液匀浆样品, 裂解液/乙醇混合液上柱结合 RNA。
- 倒弃流出液, 把柱子装在收集管中。**加入 300µl Buffer RW1 至柱子中;** 12,000 × g 离心 2 分钟。
- 倒弃流出液, 小心取出柱子并装在收集管中。按下表配制 DNase I 反应液, 轻轻混匀。(取出柱子时不要让柱子的底部接触到溶液)。

成分	用量 (一个样品)
DNase Buffer	100 µl
DNase I	10 µl

- 把 DNase 反应液全部加到 RNA 柱子的膜中央。室温(25-37°C)静置 20-30 分钟。
- 加入 500µl Buffer RW1 至柱子中;** 静置 3 分钟。12,000 × g 离心 30-60 秒。
- 倒弃滤液把柱子装回收集管中。**加入 500µl Buffer RW2 (已用乙醇稀释)至柱子中,** 12,000 × g 离心 30-60 秒。
- 倒弃滤液把柱子装回收集管中。**加入 500µl Buffer RW2 (已用乙醇稀释)至柱子中,** 12,000 × g 离心 30-60 秒。
- 倒弃滤液, 把柱子装回收集管中。**12,000 × g 离心空柱 2 分钟, 以甩干柱子的基质。**
- 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管。**加入 30-50µl RNase Free Water 至柱子的膜中央。**静置 2 分钟。12,000 × g 离心 1 分钟。若 RNA 产量超过 30µg, 再加入 30-50µl DEPC 水至柱子的膜中央进行第二次洗脱。
- 弃去 RNA 柱子, 把 RNA 保存于-80°C。

B. 中量抽提柱

1. 按柱式 RNA 抽提中量试剂盒的说明书进行操作: 加入裂解液匀浆样品, 裂解液/乙醇混合液上柱结合 RNA, 以及第一次洗涤液 Buffer RW1 洗柱;
2. 倒弃流出液, 把柱子装在收集管中。按下表配制 DNase I 反应液, 轻轻混匀。

成分	用量 (一个样品)
DNase Buffer	400 μ l
DNase I	50 μ l

3. 把 DNase 反应液(415 μ l)全部转移至 RNA 中量结合柱的膜中央。室温(25-37 $^{\circ}$ C)静置 15-30 分钟。
4. **加入 2ml Buffer RW1 至柱子中。**静置 3 分钟。3,000 \times g 离心 3 分钟。
5. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管中。**加入 3ml Buffer RW2 (已用乙醇稀释)至柱子中,** 3,000 \times g 离心 3 分钟。
6. 倒弃流出液, 把柱子装回收集管中。**加入 3ml Buffer RW2 (已用乙醇稀释)至柱子中,** 3,000 \times g 离心 3 分钟。
7. 倒弃流出液, 把柱子装回收集管中。**3,000 \times g 离心空柱 15 分钟, 以甩干柱子的基质;**
8. 将柱子转移至新的 15ml 离心管。**加入 400-600 μ l RNase Free Water 至柱子的膜中央。**静置 2 分钟。3,000 \times g 离心 3 分钟。若 RNA 产量超过 500 μ g, 再加入 400-600 μ l DEPC 水至柱子的膜中央进行第二次洗脱。
9. 弃去 RNA 柱子, 把 RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。

C. 大量抽提柱

1. 按柱式 RNA 大量抽提试剂盒的说明书进行操作: 加入裂解液匀浆样品, 裂解液/乙醇混合液上柱结合 RNA, 以及第一次洗涤液 Buffer RW1 洗柱;
2. 倒弃流出液, 把柱子装在新的收集管中。按下表配制 DNase I 反应液, 轻轻混匀。

成分	用量 (一个样品)
DNase Buffer	900 μ l
DNase I	110 μ l

3. 把 DNase 反应液全部转移至 RNA 大量结合柱的膜中央。室温(25-37 $^{\circ}$ C)静置 15-30 分钟。
4. **加入 10ml Buffer RW1 至柱子中;** 静置 3 分钟。3,000 \times g 离心 3 分钟。

5. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管中。**加入 15ml Buffer RW2 (已用乙醇稀释)至柱子中,** 3,000 \times g 离心 3 分钟。
6. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管中。**加入 15ml Buffer RW2 (已用乙醇稀释)至柱子中,** 3,000 \times g 离心 3 分钟。
7. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管中。**3,000 \times g 离心空柱 15 分钟, 以甩干柱子的基质;**
8. 将柱子转移至新的 50ml 离心管。**加入 700-900 μ l RNase Free Water 至柱子的膜中央。**静置 2 分钟。3,000 \times g 离心 3 分钟。若 RNA 产量超过 1000 μ g, 再加入 700-900 μ l DEPC 水至柱子的膜中央进行第二次洗脱。
9. 弃去 RNA 柱子, 把 RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。

D. 96 孔 RNA 结合板

1. 按 96 孔板 RNA 抽提试剂盒的说明书进行操作: 加入裂解液匀浆样品, 裂解液/乙醇混合液上柱结合 RNA, 以及第一次洗涤液 Buffer RW1 洗柱。
2. 倒弃流出液, 把结合板装在收集板中。按下表配制 DNase I 反应液, 轻轻混匀。

成分	用量(一个样品)	96 个样品
DNase Buffer	90 μ l	9.0ml
DNase I	10 μ l	3000 μ l

3. 把 DNase 反应液全部转移至结合板的每一孔的膜中央, 室温(25-37 $^{\circ}$ C)放置 30 分钟。
4. **每孔加入 0.5ml Buffer RW1/RWT,** 静置 3 分钟。3,000 \times g 离心 3 分钟。
5. 倒弃滤液, 把结合板装回收集板中。**每孔加入 0.7ml Buffer RW2(已用乙醇稀释)至结合板中,** 3,000 \times g 离心 3 分钟。
6. 倒弃流出液, 把结合板装回收集板中。**每孔加入 0.7ml Buffer RW2(已用乙醇稀释)至结合板中,** 3,000 \times g 离心 3 分钟。
7. 倒弃流出液, 把结合板装回收集板中。**3,000 \times g 离心空柱 15 分钟, 以甩干的基质;**
8. 将柱子转移至新的收集板。**加入 70-100 μ l RNase Free Water 至结合板的膜中央。**静置 2 分钟。3,000 \times g 离心 3 分钟。
9. 弃去 RNA 结合板。把 RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。