

## 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

产品成分	R4911-100	R4911-500
Preps	100 x 50 Preps	500 x 50 Preps
DNase Buffer	600 ml	5 x 600 ml
DNase I	100 x 650 µl	500 x 650 µl

### 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 分钟甩干柱子。
- 倒弃流出液，小心取出柱子并重新装回收集管中。  
取出柱子时不要颠倒或侧转，不要让柱子的底部碰到收集管中的液体。若碰到了液体，倒弃废液后，把柱子放回收集管中再离心一次甩干柱子。

- 按下表比例配制 DNase I 反应液，混匀。

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

- 把全部的 DNase I 反应液滴加到柱子膜中央，盖上盖子，正放 5 分钟，然后再把柱子反放于桌面，让 DNase 反应液尽量覆盖于膜的表面 (大部分的 DNA 在膜表面)，室温静置 5~15 分钟消化去除 DNA。
- 加入 500µl Buffer RW1 至柱子中，静置 2 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 30-100µl 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

- 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;
- 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 $\mu$ l
DNase I	50 $\mu$ l

- 把 DNase 反应液(415 $\mu$ 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。
- 加入 2ml Buffer RW1 至柱子中。静置 3 分钟。3,000  $\times$  g 离心 3 分钟。
- 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。
- 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。
- 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;
- 将柱子转移至新的 15ml 离心管。加入 400-600 $\mu$ 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 $\mu$ g, 再加入 400-600 $\mu$ l 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 $^{\circ}$ C。

## C. 大量抽提柱

- 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;
- 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 $\mu$ l
DNase I	110 $\mu$ l

- 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。
- 加入 10ml Buffer RW1 至柱子中; 静置 3 分钟。3,000  $\times$  g 离心

3 分钟。

- 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。
- 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。
- 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;
- 将柱子转移至新的 50ml 离心管。加入 700-900 $\mu$ 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 $\mu$ g, 再加入 700-900 $\mu$ l 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 $^{\circ}$ C。

## D. 96 孔 RNA 结合板

- 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。
- 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 $\mu$ l	9.0ml
DNase I	10 $\mu$ l	3000 $\mu$ l

- 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。
- 每孔加入 0.5ml Buffer RW1/RWT, 静置 3 分钟。3,000  $\times$  g 离心 3 分钟。
- 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。
- 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。
- 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;
- 将柱子转移至新的收集板。加入 70-100 $\mu$ 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。
- 弃去 RNA 结合板。把 RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。