

R6731 DNA/RNA Isolation Kit

简易中文步骤

√ 实验前请按说明书正确配制 RNA Wash Buffer II 和 DNA Wash Buffer

➤ 使用【无水乙醇】对 RNA Wash Buffer II 进行稀释，稀释后室温保存

货号	加入量
R6731-00	8mL
R6731-01	48mL
R6731-02	200mL

➤ 使用【无水乙醇】对 DNA Wash Buffer 进行稀释，稀释后室温保存

货号	加入量
R6731-00	20mL
R6731-01	80mL
R6731-02	160mL

提取方案：

A. 同时从动物细胞中提取 DNA 和 RNA

1. 收集细胞：

a) 对于悬浮细胞：确定细胞数量。通过 500xg 离心 5min 沉淀细胞，吸除上清液，并按照步骤 2 进行。

b) 对于单层生长中的细胞：在细胞培养皿中以单层生长的细胞可以直接在培养皿中裂解或加入胰蛋白酶消化在裂解前收集细胞沉淀。在细胞培养瓶中生长的细胞应进行胰蛋白酶消化并在裂解前收集细胞沉淀。

2. 用 Buffer GTC 裂解细胞（不超过 1×10^7 个细胞）

对于沉淀细胞，轻弹离心管使细胞沉淀彻底松散，按照以下表格加入适量 Buffer GTC。为了直接裂解培养皿中的细胞，可将 Buffer GTC 直接加入到培养皿中裂解。每 1mL Buffer GTC 加入 20 μ l β -巯基乙醇。

Buffer GTC 与细胞数量：

细胞数	Buffer GTC 加入量 (μ l)
$< 5 \times 10^6$	500
$5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$	700

3. 用自动匀浆器将样品彻底匀浆，或涡旋仪结合注射器（详见英文说明书第 4 页）将样品彻底匀浆（如无上述仪器，请必须充分吸打/涡旋充分再进行下一步操作）；

Note：如果样品不能彻底匀浆会导致产率降低和柱子堵柱，建议使用匀浆器将样品

匀浆，能帮助获得更好的产量。

4. 将 HiBind[®] DNA Column 套入到 2mL 收集管中，将匀浆液转移到柱子中， $\geq 13,000\times g$ 离心 1min，确保所有滤液通过柱子，如果需要可进行再次离心；
5. 将 HiBind[®] DNA Column 套入到新的 2mL 收集管中，放置室温，稍后按照步骤 13-16 进行 DNA 的提取。不要冻存 HiBind[®] DNA Column。

总 RNA 提取：

6. 加入 0.5 倍体积 (250 μ l 或 350 μ l) 的无水乙醇至步骤 4 中的滤液，最大速度涡旋混匀 15s，如果滤液在转移过程中有损失，则根据滤液的量调整无水乙醇的用量；
7. 将 HiBind[®] RNA spin column 套入到 2mL 收集管中，转移步骤 6 中混合液至 HiBind[®] RNA spin column，注意柱子的最大容量是 800 μ l (可多次转入)。加入乙醇后可能会形成沉淀，可先涡旋后再转移到柱子中。室温下 13,000 $\times g$ 离心 1min，弃滤液；
8. 将 HiBind[®] RNA spin column 套回到 2mL 收集管中，加入 500 μ l RNA Wash Buffer I，室温下 13,000 $\times g$ 离心 1min，弃滤液；
9. 将 HiBind[®] RNA spin column 套回到 2mL 收集管中，加入 500 μ l RNA Wash Buffer II，室温下 13,000 $\times g$ 离心 1min，弃滤液；

Note: RNA Wash Buffer II 在使用前必须按照说明书加入无水乙醇稀释。

10. 按照步骤 9，再次加入 500 μ l RNA Wash Buffer II 进行洗涤；
11. 将 HiBind[®] RNA spin column 套回到 2mL 收集管中，最大速度 ($\geq 13,000\times g$) 空柱子离心 2min，干燥柱子基质；
12. 将 HiBind[®] RNA spin column 套入到 1.5mL 离心管中，加入 30-70 μ l DEPC-treated water。确保将水加入到柱子中心基质，13,000 $\times g$ 离心 1min，如果预期产量 RNA > 30 μ g，则有必要进行二次洗脱。

此外，可加入更多的水将 RNA 洗脱。多加入的水可以增加总 RNA 的产量，但是会导致浓度有所下降。第一次洗脱时能回收到 80% 以上的 RNA，将水预热至 70 $^{\circ}$ C 后再加入柱中，在室温下孵育 5min，离心洗脱可提高产量。

基因组 DNA 提取：

13. 向步骤 5 中的 HiBind[®] DNA column 中加入 500 μ l 的 Buffer HB，室温下 13,000 $\times g$ 离心 1min，弃滤液；
14. 将 HiBind[®] DNA column 套回到 2mL 收集管中，加入 700 μ l DNA Wash Buffer，室温下 13,000 $\times g$ 离心 1min，弃滤液；

Note: DNA Wash Buffer 在使用前必须按照说明书加入无水乙醇稀释。

15. 将 HiBind® DNA column 套回到 2mL 收集管中, 最大速度 ($\geq 13,000xg$) 空柱子离心 2min 干燥柱子基质;

16. 将 HiBind® DNA column 套入到新的 1.5mL 离心管中, 加入 50-100 μ l Elution Buffer, 确保将水加到柱子中心基质, 13,000xg 离心 1min, 如果预期产量 DNA > 30 μ g, 则有必要进行二次洗脱。

B. 同时从动物组织中提取 DNA 和 RNA

1. 按照英文说明书第 4 页的其中一个方法 (液氮研磨/手动匀浆/自动匀浆) 破碎组织, 并加入 Buffer GTC 将组织样品匀浆 (不超过 30mg 组织样品), 使用前, 每 1mL Buffer GTC 加入 20 μ l β -巯基乙醇。

Note: 样品不完全匀浆会导致产量降低和堵柱子。建议使用匀浆器进行匀浆, 可帮助提高产量。

Buffer GTC 加入量:

组织量 (mg)	Buffer GTC 加入量 (μ l)
≤ 15	500
20-30	700

2. 室温下, 13,000xg 离心 5min;

Note: 有些样品在离心后可能会形成脂肪上层, 在以下转移上清时注意不要转移到脂肪层和沉淀物, 否则可能会降低产量或堵塞柱子。

3. 将 HiBind® DNA Column 套入到 2mL 收集管中, 转移步骤 2 中上清液至柱子中, 室温下, 13,000xg 离心 1min, 确保所有滤液通过柱子, 如果需要可再次离心。

4. 将 HiBind® DNA Column 套入到新的 2mL 离心管中, 放置室温, 稍后按照步骤 12-15 进行 DNA 的提取。不要冻存 HiBind® DNA Column。

总 RNA 提取:

5. 加入 0.5 倍体积 (250 μ l 或 350 μ l) 的无水乙醇至步骤 4 中的滤液, 最大速度涡旋混匀 15s, 如果滤液在转移过程中有损失, 则根据滤液量调整无水乙醇的用量;

6. 将 HiBind® RNA spin column 套入到 2mL 收集管中, 转移步骤 5 中混合液至 HiBind® RNA spin column, 注意柱子的最大容量是 800 μ l (可多次转入)。加入乙醇后可能会形成沉淀, 可先涡旋后再转移到柱子中。室温下 13,000xg 离心 1min, 弃滤液;

7. 将 HiBind® RNA spin column 套回到 2mL 收集管中, 加入 500 μ l RNA Wash Buffer I, 室温下 13,000xg 离心 1min, 弃滤液;

8. 将 HiBind® RNA spin column 套回到 2mL 收集管中, 加入 500 μ l RNA Wash

Buffer II, 室温下 13,000xg 离心 1min, 弃滤液;

Note: RNA Wash Buffer II 在使用前必须按照说明书加入无水乙醇稀释。

9. 按照步骤 8, 再次加入 500 μ l RNA Wash Buffer II 进行洗涤;

10. 将 HiBind[®] RNA spin column 套回到 2mL 收集管中, 最大速度 ($\geq 13,000xg$) 空柱子离心 2min, 干燥柱子基质;

11. 将 HiBind[®] RNA spin column 套入到 1.5mL 离心管中, 加入 30-70 μ l DEPC-treated water。确保将水加入到柱子中心基质, 13,000xg 离心 1min, 如果预期产量 RNA $> 30\mu$ g, 则有必要进行二次洗脱。

此外, 可加入更多的水将 RNA 洗脱。多加入的水可以增加总 RNA 的产量, 但是会导致浓度有所下降。第一次洗脱时能回收到 80%以上的 RNA, 将水预热至 70°C后再加入柱中, 在室温下孵育 5min, 离心洗脱可提高产量。

基因组 DNA 提取:

12. 向步骤 4 中的 HiBind[®] DNA column 中加入 500 μ l 的 Buffer HB, 室温下 13,000xg 离心 1min, 弃滤液;

13. 将 HiBind[®] DNA column 套回到 2mL 收集管中, 加入 700 μ l DNA Wash Buffer, 室温下 13,000xg 离心 1min, 弃滤液;

Note: DNA Wash Buffer 在使用前必须按照说明书加入无水乙醇稀释。

14. 将 HiBind[®] DNA column 套回到 2mL 收集管中, 最大速度 ($\geq 13,000xg$) 空柱子离心 2min 干燥柱子基质;

15. 将 HiBind[®] DNA column 套入到新的 1.5mL 离心管中, 加入 50-100 μ l Elution Buffer, 确保将水加到柱子中心基质, 13,000xg 离心 1min, 如果预期产量 DNA $> 30\mu$ g, 则有必要进行二次洗脱。

C. 同时从纤维组织中提取 DNA 和 RNA

1. 按照英文说明书第 4 页的方法之一将样品在 350 μ l Buffer GTC 中匀浆裂解 (不超过 15mg 的纤维组织)。使用前, 每 1mL Buffer GTC 加入 20 μ l β -巯基乙醇。

Note: 样品不完全匀浆会导致产量降低和堵柱子。建议使用匀浆器进行匀浆, 可帮助提高产量。

2. 加入 590 μ l DEPC-Water 和 10 μ l RNase-Free Proteinase K (用户自备, 20mg/ml), 彻底涡旋混匀, 在 55°C 孵育 10min, 孵育期间取出震荡混匀 1 次;

3. $\geq 13,000xg$ 离心 5min, 将 HiBind[®] DNA column 套入到 2mL 收集管中, 转移上清液至柱子中, $\geq 10,000xg$ 离心 1min, 确保所有上清液通过柱子, 如果需要可再次离心。

Note: 有些样品在离心后可能会形成脂肪上层, 在以下转移上清时注意不要转移到脂肪层和沉淀物, 否则可能会降低产量或堵塞柱子。

4. 将 HiBind® DNA Column 套入到新的 2mL 离心管中, 放置室温, 稍后按照步骤 12-15 进行 DNA 的提取。不要冻存 HiBind® DNA Column。

总 RNA 提取:

5. 加入 0.5 倍体积 (250 μ l 或 350 μ l) 的无水乙醇至步骤 4 中的滤液, 最大速度涡旋混匀 15s;

6. 将 HiBind® RNA spin column 套入到 2mL 收集管中, 转移步骤 5 中混合液至 HiBind® RNA spin column, 注意柱子的最大容量是 800 μ l (可多次转入)。加入乙醇后可能会形成沉淀, 可先涡旋后再转移到柱子中。室温下 13,000xg 离心 1min, 弃滤液;

7. 将 HiBind® RNA spin column 套回到 2mL 收集管中, 加入 500 μ l RNA Wash Buffer I, 室温下 13,000xg 离心 1min, 弃滤液;

8. 将 HiBind® RNA spin column 套回到 2mL 收集管中, 加入 500 μ l RNA Wash Buffer II, 室温下 13,000xg 离心 1min, 弃滤液;

Note: RNA Wash Buffer II 在使用前必须按照说明书加入无水乙醇稀释。

9. 按照步骤 8, 再次加入 500 μ l RNA Wash Buffer II 进行洗涤;

10. 将 HiBind® RNA spin column 套回到 2mL 收集管中, 最大速度 ($\geq 13,000xg$) 空柱子离心 2min, 干燥柱子基质;

11. 将 HiBind® RNA spin column 套入到 1.5mL 离心管中, 加入 30-70 μ l DEPC-treated water。确保将水加入到柱子中心基质, 13,000xg 离心 1min, 如果预期产量 RNA $> 30\mu$ g, 则有必要进行二次洗脱。

此外, 可加入更多的水将 RNA 洗脱。多加入的水可以增加总 RNA 的产量, 但是会导致浓度有所下降。第一次洗脱时能回收到 80%以上的 RNA, 将水预热至 70°C 后再加入柱中, 在室温下孵育 5min, 离心洗脱可提高产量。

基因组 DNA 提取:

12. 按照方案 “B. 同时从动物组织中提取 DNA” 中的 “基因组 DNA 提取” 步骤进行。

D. (选做) DNase I 消化

HiBind® RNA spin column 在没有 DNase 处理的情况下能除去大部分的 DNA, 因此, 对于大多数的下游实验来说, 没有必要进行 DNase 消化步骤。但是, 某些敏感的 RNA 应用可能需要进一步除去 DNA, 以下是对膜上 DNA 进行消化的步骤 (详情请参考 DNase I 货号: E1091)

1. 按照标准方案, 直至样品完全通过 HiBind® RNA spin column (步骤 1-7), 继续以下步骤:
2. 对每个 HiBind® RNA spin column, 准备 DNase I 消化反应混合液如下:

组分	加入量
OBI DNase I Digestion Buffer	73.5µl
RNase-free DNase I (20 kunitz unites/µl)	1.5µl
总体积	75µl

Note:

- 1) DNase I 对物理变性非常敏感, 因此不要涡旋 DNase I 混合液。可以通过倒置管轻轻混合。在 RNA 分离之前准备新鲜的 DNase I 消化混合液。
 - 2) OBI DNase I Digestion Buffer 配有 OBI RNase-free Dnase 装置。
 - 3) 标准 DNase Buffer 与膜上 DNase 消化不相容。
3. 将 75µl DNase I 消化反应混合液直接转移到 HiBind® RNA spin column 中, 确保将 DNase I 消化混合液直接加入到柱子膜上, 如果混合液加到柱子壁上或 O 形环上, DNase I 的消化将无法完成;
 4. 室温 (25°C-30°C) 孵育 15min;
 5. 将 HiBind® RNA spin column 套入到新的 2mL 离心管中, 加入 400µl RNA Wash Buffer I, 室温孵育 2min, 13,000xg 离心 1min, 弃滤液;
 6. 将 HiBind® RNA spin column 套回到 2mL 收集管中, 加入 500µl RNA Wash Buffer II, 13,000xg 离心 1min, 弃滤液;

Note: RNA Wash Buffer II 在使用前必须按照说明书加入无水乙醇稀释。

7. 按照步骤 6, 再次加入 500µl RNA Wash Buffer II 进行洗涤;
8. 将 HiBind® RNA spin column 套回到 2mL 收集管中, 最大速度空柱子离心 2min, 干燥柱子基质;
9. 将 HiBind® RNA spin colum 套入到 1.5mL 离心管中, 加入 30-70µl DEPC-treated water。确保将水加入到柱子中心基质, 13,000xg 离心 1min, 如果预期产量 RNA > 30µg, 则有必要进行二次洗脱。

中文翻译仅供辅助阅读, 详情请以英文说明书为准