

M5 DNase I 柱上消化试剂盒 (RNase free) 使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 DNase I 柱上消化试剂盒 (RNase free)	50T	MF611-01

【储存条件】

-20°C (按照各成份指示储存)

【产品简介】

DNase 直接在柱上消化残留 DNA, 再通过一系列快速的漂洗—离心的步骤, 去蛋白液和漂洗液将细胞代谢物, 蛋白等杂质去除, 最后低盐的 RNase free H₂O 将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱。DNase I 柱上消化, 得到的 RNA 不残留 DNase 消化, 可直接用于反转录荧光定量 PCR、二代测序、芯片、RACE 等实验。多次柱漂洗确保高纯度, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 典型的比值达 2.0~2.2, 无 DNA 残留, 可直接用于荧光定量 PCR、RT-PCR、芯片、二代测序、Northern-blot 等各种实验。

【产品组分】

试剂盒组成	保存	50 次
DNase Buffer	-20°C	1.25 ml x 2
RNase free DNase I	-20°C	0.25 ml
去蛋白液 RW1	室温	40 ml

注意: DNase Buffer 含 Mn²⁺, 可能有轻度发黄发黑, 甚至黑色沉淀为正常现象, 颠倒混匀后正常使用即可。

【注意事项】

- 所有的离心步骤均在室温完成, 使用转速可以达到 13,000 rpm 的传统台式离心机。
- 需要自备乙醇, 研钵(可选)。
- 裂解液 RPA 和去蛋白液 RW1 中含有刺激性化合物, 操作时戴乳胶手套, 避免沾染皮肤, 眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时, 要用大量清水或者生理盐水冲洗。

【操作流程】(参考聚合美 MF610 说明书)

提示:

⇒ **第一次使用前请先在漂洗液 RW 瓶加入指定量无水乙醇!**

1. 直接研磨法(推荐):

- 新鲜植物组织称重后取 100-200mg 迅速剪成小块放入研钵 (冰冻保存或者液氮保存样品可直接称重后取 100-200mg 放入研钵), 加入 **1 ml** 裂解液 RPA **室温下充分研磨成匀浆**, 注意应该迅速研磨让组织和裂解液 RPA 立刻充分接触以抑制 RNA 酶

活性。

- b. 将裂解物转入离心管，剧烈摇晃振荡 15 秒，13,000rpm 离心 5-10 分钟，沉淀不能裂解的碎片。
- c. 取 480 μ l 裂解物上清（在不超过 RNA 吸附柱能力的情况下可以取更多或者全部上清，这样可以提高产量）转到一个新离心管。加入上清体积一半的无水乙醇(0.5 体积)，此时可能出现沉淀，但是不影响提取过程，立即吹打混匀，不要离心。
- d. 立刻接**操作步骤**的步骤 3。

2. 液氮研磨法:

- a. 取 500 μ l 裂解液 RPA，转入 1.5ml 离心管中。
- b. 液氮中研磨适量植物组织成细粉后，取 50-100mg 细粉转入上述装有 RPA 的离心管，立即用手剧烈振荡 20 秒，充分裂解。
- c. 用吸头吹打混匀帮助裂解或者剧烈涡旋震荡直到得到满意匀浆结果(或者电动匀浆 30 秒)，可以剪切 DNA，降低粘稠度和提高产量。
- d. 将裂解物 13,000 rpm 离心 5-10 分钟，沉淀不能裂解的碎片。
- e. 取裂解物上清（在不超过 RNA 吸附柱能力的情况下可以取更多的上清，这样可以提高产量）转到一个新离心管。加入上清体积一半的无水乙醇(0.5 体积)，此时可能出现沉淀，但是不影响提取过程，立即吹打混匀，不要离心。
- f. 立刻接**操作步骤**的步骤 3。

注意：以上液氮研磨法用户可以根据需要加倍处理，可以提高产量。也就是使用 1ml 的裂解液 RPA 和 100-200mg 的样品。

- 3. 将混合物(每次小于 720 μ l，多可以分两次加入)加入一个吸附柱 RA 中，（吸附柱放入收集管中）13,000 rpm 离心 2 分钟，弃掉废液。

确保离心后液体全部滤过去，膜上没有残留，如有必要，可以加大离心力和离心时间。

- 4. 加 350 μ l 去蛋白液 RW1，室温放置 1 分钟，13,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。
- 5. DNase I 工作液配制：取 45 μ l DNase I buffer 和 5 μ l RNase free DNase I 在离心管轻轻吹打混匀成工作液（处理多个离心柱子要按照比例放大制备工作液）。
- 6. 向吸附柱 RA 中央加入 50 μ l 的 DNase I 工作液，室温（20-30 $^{\circ}$ C）放置 15 分钟。注意直接将工作液滴在膜中央上，不要让工作液滴在 O 型圈或是离心柱管壁上。
- 7. 向吸附柱 RA 中加入 350 μ l 去蛋白液 RW1，12,000 rpm 离心 30 秒，弃废液，将吸附柱放回收集管中。
- 8. 加入 500 μ l 漂洗液 RW（请先检查是否已加入无水乙醇!），13,000 rpm 离心 30 秒，弃掉废液。加入 500 μ l 漂洗液 RW，重复一遍。
- 9. 将吸附柱 RA 放回空收集管中，13,000 rpm 离心 2 分钟，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。

10. 取出吸附柱 RA，放入一个 RNase free 离心管中，根据预期 RNA 产量在吸附膜的中间部位加 30-50 μ l RNase free water（事先在 70-90 $^{\circ}$ C 水浴中加热可提高产量），室温放置 1 分钟，12,000 rpm 离心 1 分钟。
11. 如果预期 RNA 产量 > 30 μ g，加 30-50 μ l RNase free water 重复步骤 10，合并两次洗液，或者使用第一次的洗脱液加回到吸附柱重复步骤一遍(如果需要 RNA 浓度高)。

洗脱两遍的 RNA 洗脱液 RNA 浓度高,分两次洗脱合并洗脱液的 RNA 产量比前者高 15-30%，但是浓度要低，用户根据需要选择。

注意：如果不需要做荧光定量 PCR，仅仅做普通的反转录，克隆基因片段，可以省略 DNA 酶柱上消化的步骤，具体就是第 4 步骤的“加 350 μ l 去蛋白液 RW1”改成“加 700 μ l 去蛋白液 RW1”，同时省略步骤 5，6，7。



【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。