

R6734 DNA/RNA/Protein 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
R6734-00	8mL
R6734-01	48mL
R6734-02	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
R6734-00	20mL
R6734-01	80mL
R6734-02	160mL

提取方案：（从动物细胞/组织中提取 DNA/RNA/蛋白质）

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 1 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，并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。

1. 细胞：取 $< 1 \times 10^7$ 个细胞，加入 500 μ l Buffer GTC/ β -巯基乙醇（ 5×10^6 - 1×10^7 个细胞加 700 μ l Buffer GTC/ β -巯基乙醇），涡旋或枪头混匀；

组织：取 < 15 mg 的组织，加入 500 μ l Buffer GTC/ β -巯基乙醇（20-30mg 组织加入 700 μ l Buffer GTC/ β -巯基乙醇），匀浆，13,000xg 离心 5min，取上清；

2. 将 HiBind[®] DNA 结合柱套入到 2mL 离心管中，把裂解液转移到柱子中，13,000xg 离心 1min，柱子用于基因组 DNA 提取，滤液用于 RNA 提取；

3. 将 HiBind[®] DNA 结合柱套入新的 2mL 收集管中，暂时存放于室温中，用于后续 DNA 提取的实验。

RNA 提取:

4. 向步骤 2 中的滤液中加入 0.5 倍体积 (250 μ l 或 350 μ l) 的无水乙醇, 涡旋 15s 混匀, 根据实际情况调整无水乙醇的用量;
5. 将 HiBind[®] RNA 结合柱套入到 2mL 离心管中, 把步骤 4 中的混合液转移到柱子中 (柱子最大容量是 800 μ l), 在室温下 13,000xg 离心 1min, 收集滤液后面用于蛋白提取。
6. 将 HiBind[®] RNA 结合柱重新套回 2mL 收集管中, 重复步骤 5 直至将混合液全部转过柱;
7. 将 HiBind[®] RNA 结合柱套入新的 2mL 收集管中, 加入 500 μ l RWC Wash Buffer, 在室温下 13,000xg 离心 1min, 弃滤液;
8. 将 HiBind[®] RNA 结合柱重新套回 2mL 收集管中, 加入 500 μ l RNA Wash Buffer II, 在室温下 13,000xg 离心 1min, 弃滤液;

Note: RNA Wash Buffer II 在使用前必须按说明书用无水乙醇稀释

9. 重复步骤 8;
10. 将 HiBind[®] RNA 结合柱重新套回 2mL 收集管中, 以 13,000xg 空甩柱子 2min;
11. 将 HiBind[®] RNA 结合柱套入到新的 1.5mL 离心管中, 加入 30-70 μ l DEPC-treated water;
12. 在室温下 13,000xg 离心 1min, 洗脱得到 RNA。

Note: 如果样品中的 RNA 含量较高, 柱子能与其中的 80%RNA 结合; 用 DEPC-treated water 二次洗脱可提高产量; 在 70 $^{\circ}$ C 水浴加热 DEPC-treated water 后加入柱子孵育 5min 洗脱可提高产量

DNA 提取:

13. 向步骤 3 套在新的 2mL 收集管中的 HiBind[®] DNA 结合柱加入 500 μ l Buffer HB, 在室温下 13,000xg 离心 1min, 弃滤液;
14. 将 HiBind[®] DNA 结合柱重新套回 2mL 收集管中, 加入 700 μ l DNA Wash Buffer, 在室温下 13,000xg 离心 1min, 弃滤液;

Note: 浓缩的 DNA Wash Buffer 在使用之前必须按说明书用乙醇稀释。

15. 将 HiBind[®] DNA 结合柱重新套回 2mL 收集管中, 以 13,000xg 空甩柱子 2min;
16. 将 HiBind[®] DNA 结合柱套入到新的 1.5mL 离心管中, 加入 50-100 μ l Elution Buffer, 室温放置 2min, 13,000xg 离心 1min。

提取蛋白质:

17. 加入步骤 5 中滤液的 4 倍体积预冷的丙酮, 涡旋混匀。
18. 放置在-20°C下 30min;
19. 4°C, 最大速度离心 10min, 弃上清;
20. 用 1mL 预冷的无水乙醇洗涤沉淀;
21. 4°C, 最大速度离心 3min, 弃上清;
22. 风干;
23. 用缓冲液溶解蛋白质, 用于下游实验。

蛋白溶解方法建议: 如下游需要进行 western blot 实验, 建议用枪头把蛋白沉淀碾成细碎颗粒, 加入适量体积 (以刚浸没蛋白沉淀为宜) 的浓度为 5-10% SDS, 封口膜缠紧管口, 50°C加热 1~4 小时。待沉淀明显缩小后, 离心去掉沉淀, 取上清液产物。产物可直接用于 western blot, 无需再次纯化。

说明: 该溶解方法仅供参考, 请按照实验需求选择合适的蛋白溶解缓冲液

(选做) DNase I 消化

1. 按照标准方案的步骤 1-7 进行;
2. 对于每个 HiBind® RNA column, 按照以下方法配制 DNase I 消化反应混合液:

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

Note:

- a) 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。
 - b) OBI DNase I Digestion Buffer 配有 OBI RNase-free Dnase 装置。
 - c) 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柱子中, 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. 将柱子套入到新的 2mL 收集管中, 加入 400µl RWC Wash Buffer, 室温静置 2min, 13,000xg 离心 1min, 弃滤液;
 6. 将柱子套回到 2mL 收集管中, 加入 500µl RNA Wash Buffer II (已加无水乙醇稀释),

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. 重复步骤 6, 加入 500 μ l RNA Wash Buffer II 进行二次洗涤;

8. 将柱子套入到 2mL 收集管中, 最大速度空柱子离心 2min 干燥, 弃收集管;

9. 将柱子套入到新的 1.5mL 离心管中, 加入 30-70 μ l DEPC-treated water, 也可以用无菌水来洗脱 RNA, 室温静置 1min, 13,000xg 离心 2min 洗脱 RNA, 如有需要再次洗脱 RNA 产量可 > 30 μ g。

中文翻译仅供辅助阅读, 详情请以英文说明书为准