

R6875 Mollusc RNA Kit

简易中文步骤

√实验前请按说明书稀释和保存以下溶液

➢ 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
R6875-00	8mL
R6875-01	48mL
R6875-02	180mL

提取步骤：

节肢动物

1. 用研钵和研杵将不超过 50mg 的组织样品在液氮中磨碎，并将样品粉末转移到干净的 1.5mL 微量离心管中。如果没有陶瓷研钵和研杵，可使用一次性微管杵（货号：SSI-1014-39 和 SSI-1015-39）将微量离心管中的样品匀浆后。进行步骤 2；

软体动物（和其它软组织无脊椎动物）

1. 用研钵和研杵在液氮中研磨不超过 50mg 的组织样品，并将样品粉末转移到干净的 1.5mL 微量离心管中。如果没有陶瓷研钵和研杵，可使用一次性微管杵（货号：SSI-1014-39 和 SSI-1015-39）将微量离心管中的样品匀浆后。进行步骤 2；

样品的起始用量取决于样品类型，如果使用建议的 50mg 组织能获得良好的效果，则可增加初始样品量。为了便于做实验，可以按比例放大样品用量，并按比例增加所用缓冲液的体积。但对于每个 HiBind® spin-column 建议使用不超过 100mg 的组织，因为这可能会超过柱子 RNA 最大的结合能力（100µg）。同时，对于困难的组织可能需要从少于 30mg 的组织开始尝试，并将所有缓冲液体积加倍以确保充分的溶解。

2. 加入 1mL RNA-Solv Reagent 并剧烈涡旋确保将所有样品打散，不将组织样品打散将不利于 RNA 的提取。在室温下孵育 2-3min；

3. 每 1mL RNA-Solv Reagent 加入 0.2mL 氯仿，盖紧管盖，剧烈摇晃 15s，在室温下孵育 3min；

4. 在 4°C 下，12,000xg 离心 15min，管内分层为底层的苯酚-氯仿相、中间相和上层水相，RNA 完全保留在水相中；

5. 转移不超过 80% 的上层水相至新的离心管中，加入等体积的异丙醇，混匀沉淀 RNA，在室温下孵育 10min，在 4°C 下，12,000xg 离心 3min，在不会碰到底部 RNA 沉淀的条件下，尽可能多的将上清液弃除，将离心管倒置在吸水纸上 1min 使残留的液体流出，不必将 RNA 沉淀干燥；

6. 加入 100 μ l 无菌的 DEPC-treated water, 涡旋混匀重悬沉淀, 为有效溶解 RNA, 可将离心管置于 65 $^{\circ}$ C 进行短暂的孵育;

Note: 以下所有离心步骤均在室温条件进行。

7. 调整结合条件: 加入 350 μ l Buffer RB/ β -巯基乙醇, 加入 250 μ l 无水乙醇, 涡旋混匀; 如果步骤中需要用 Buffer RB 来溶解 RNA 沉淀, 则需加入 350 μ l 70%乙醇, 涡旋混匀;

Note: 该步骤建议使用 RB Buffer 以避免 RNA 降解, 加入前每 1mL Buffer RB 混入 20 μ l β -巯基乙醇, 混匀后能在室温下保存一周。

8. 将 HiBind[®] RNA column 套入到 2mL 收集管中, 转移步骤 7 中的混合物 (包括可能形成的沉淀) 至柱子中, 室温下 $\geq 10,000xg$ 离心 30s, 弃滤液;

9. 将 HiBind[®] RNA column 套回到 2mL 收集管中, 加入 500 μ l RNA Wash Buffer I, 10,000 xg 离心 30s, 弃滤液;

(可选) 膜上 DNase I 消化: 如需进行 DNase 消化, 可在该步开始。详见后文。

10. 将 HiBind[®] RNA column 套入到新的 2mL 收集管中, 加入 400 μ l RNA Wash Buffer II, 室温下 10,000 xg 离心 30s, 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。

11. 重复步骤 10, 再次加入 400 μ l RNA Wash Buffer II 进行洗涤;

12. 将 HiBind[®] RNA 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;

13. 将 HiBind[®] RNA column 套入到新的 1.5mL 离心管中, 加入 30-50 μ l DEPC-treated water, 确保将水加入到柱子基质中, 最大速度离心 1min。如果 RNA 的预期产量 $> 50\mu g$, 则需要进行第二次洗脱; 为了保持第一次洗脱液的高浓度, 可以将第一次的洗脱液重新吸回到柱子中进行第二次洗脱。

Note: 可加入更多的水将 RNA 洗脱, 多加入的水可洗脱更多的 RNA, 但会使浓度降低, 在第一次洗脱时, 回收效率达到 80%左右。

(选做) DNase 消化

在不进行 DNase 消化的情况下, HiBind® RNA column 能去除大部分的 DNA, 因此对于大多数下游实验来说, 没有必要进行 DNase 消化。但是, 对于某些敏感的 RNA 实验可能需要进一步去除 DNA, 以下是进行膜上 DNase I 消化的步骤(详细可见 DNase I 试剂盒说明书, 货号: E1091)

- 按照实验步骤 1-9 进行, 将所有样品转移过柱, 按照以下方案进行:
 - 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:

- 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。
 - b. 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;
 - c. 室温 (25°C-30°C) 孵育 15min;
2. 将 HiBind® RNA column 套入到新的 2mL 收集管中, 加入 500µl RNA Wash Buffer I (进行膜上 DNase 消化后, 需要至少放置 5min 再离心), 离心, 弃滤液;
 3. 将 HiBind® RNA column 套回到 2mL 收集管中, 加入 400µl RNA Wash Buffer II, 离心, 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。

4. 将 HiBind® RNA column 套回到 2mL 收集管中, 最大速度空柱子离心 1min 干燥柱子基质;
5. 将 HiBind® RNA column 套入到 1.5mL 离心管中, 加入 30-50µl DEPC-treated water, 确保将水加入到柱子基质中, 最大速度离心 1min。如果 RNA 的预期产量 > 50 µg, 则需要进行第二次洗脱; 也可加入更多的水将 RNA 洗脱, 多加入的水可洗脱更多的 RNA, 但会使浓度降低, 在第一次洗脱时, 回收效率达到 80%左右。可以将 DEPC water 预热至 70°C 再进行洗脱, 可提高产量。

中文翻译仅供辅助阅读, 详情请以英文说明书为准