

HiPure Gel Pure RNA Kit

琼脂糖凝胶 RNA 回收试剂盒

产品简介

本产品适合于从各种浓度的琼脂糖凝胶中回收大于 200nt RNA 片段，此外本产品也适合于从酶促反应液中，或由各种方法获得的粗制的 RNA 中回收纯化大于 20nt RNA。试剂盒采用硅胶柱纯化技术，可以在 10~15 分钟完成纯化工作。RNA 回收效率高达 80%，纯化的 RNA 可直接用于自动测序，连接，酶切，RT-PCR，标记等。

产品组份

产品编号	D2100-01	D2100-02	D2100-03
次数	10 Preps	50 Preps	250 Preps
Buffer GDP	15 ml	50 ml	250 ml
Buffer GEP	10 ml	20 ml	90 ml
Buffer RW2*	6 ml	20 ml	50 ml
RNase Free Buffer	1.8 ml	15 ml	60 ml
HiPure RNA Mini Columns I	10	50	250
2 ml Collection Tubes	10	50	250

版本号：202401

保存条件

本产品可以室温保存 18 个月。低温下, Buffer GDP 可能有沉淀出来, 使用时须加热至 55°C 使沉淀溶解。

纯化原理

HiPure 硅胶柱是采用高结合力的玻璃纤维滤膜为基质。滤膜在高浓度离子化剂(如盐酸胍或异硫氰酸胍)条件下, 可通过氢键和静电等物理因素吸附核酸, 而蛋白质或其它杂质不被吸附而去除。含 RNA 的琼脂糖凝胶和高浓度异硫氰酸胍溶液 Buffer GDP 混和, 升温让凝胶充分溶化, RNA 释放至溶液中, 加入乙醇调整结合条件, 转移至硅胶柱中吸附 RNA, 而凝胶或其它杂质则从柱子流出。柱子再经 Buffer GEP 清洗去除残留的凝胶和杂质, 然后经含乙醇的洗涤液 Buffer DW2 脱盐, 最后用 RNase Free Water 洗脱出 RNA。

准备事项

- 在 Buffer RW2 中, 加入 4 倍体积的无水乙醇, 并于室温保存。
- 小型高速离心机 (~12,000 × g)
- 水浴锅温度设至 50~55°C

实验步骤 1: 琼脂糖凝胶 RNA 回收

1. 配制合适浓度的琼脂糖凝胶, 电泳分离 RNA 片段。当 RNA 片段分离后, 把凝胶放置于紫外灯下, 快速切下含目的 RNA 片段的凝胶, 并尽量去除多余的凝胶。
2. 称取凝胶块的重量, 并尽量把凝胶处理成小碎片, 转移至 2 ml 离心管中。
3. 按 100mg 凝胶块相当 100 μ l 体积计算, 加入 3 倍体积 Buffer GDP, 37°C, 振荡温育 10~15 分钟让凝胶块完全溶解。
4. 加入 1.3 倍体积 (凝胶体积) 的异丙醇至溶胶液中, 立即颠倒或涡旋混匀 (不要放置, 否则中间层会析出比较多的凝胶)。
5. 将 HiPure RNA Mini Column 套在 2ml 离心管中。把 $\leq 700\mu$ l 溶胶液转移至柱子中。8,000 × g 离心 30~60 秒。
6. (可选: 溶胶液超过 700 μ l) 倒弃滤液, 把柱子套回 2ml 离心管中。把剩余的溶胶液转移至柱子中。8,000 × g 离心 30~60 秒。

7. 倒弃滤液，把柱子套回 2ml 离心管中。加入 300 μ l Buffer GEP 至柱子中。静置 2 分钟。8,000 \times g 离心 30~60 秒。
8. 倒弃滤液，把柱子套回 2ml 离心管中。加入 600 μ l Buffer RW2（已用无水乙醇稀释）至柱子中。8,000 \times g 离心 30~60 秒。
9. 倒弃滤液，把柱子套回 2ml 离心管中。加入 300 μ l Buffer RW2（已用无水乙醇稀释）至柱子中。10,000 \times g 离心 2 分钟。
取出柱子时，不让柱子的底部碰到液体。若碰到液体后，倒弃废液后再离心 1 分钟。
10. 把柱子套在 2 ml 离心管中，加入 20~40 μ l RNase Free Water 至柱子膜中央。放置 3 分钟。10,000 \times g 离心 1 分钟。丢去柱子，把 RNA 保存于 -20 $^{\circ}$ C。

实验步骤 2：从酶促反应液中纯化 RNA

该方案适合于从酶促反应液，DNase 消化液或粗制的 RNA 中回收纯化 RNA。该方案可高效地去除各种核苷酸，引物，引物二聚体，盐分子，酶等杂质。RNA 回收效率可高达 80~90%。以下离心都必须在室温下进行。

1. **短暂离心酶促反应液，DNase 消化液或粗制 RNA 产物**，用移液枪测量其体积，并转移至灭菌的 1.5 或 2ml 离心管中。
若样品体积小于 100 μ l，用 RNase Free Water 调整至 100 μ l。
2. **加入 2 倍体积的 Buffer GDP，颠倒或涡旋混匀，室温放置 5~10 分钟灭活反应液的酶物质。**
3. **加入 0.5 倍或 1.5 体积的无水乙醇至样品中，颠倒或涡旋混匀。**
回收大于 200nt 的 RNA 产物时，加入 0.5 倍体积的无水乙醇。如 100 μ l RNA 产物，中入 200 μ l Buffer GDP，混匀，然后再加入 150 μ l 水乙醇，混匀。
回收 20~200nt 的小 RNA 产物时，加入 1.5 倍体积的无水乙醇。如 100 μ l RNA 产物，中入 200 μ l Buffer GDP，混匀，然后再加入 450 μ l 水乙醇，混匀。
4. **将 HiPure RNA 柱子套在收集管中。把混合液转移至 RNA 柱子中。** 10,000 \times g 离心 30~60 秒。

5. 倒弃滤液，把柱子套回 2ml 离心管中。加入 600 μ l Buffer RW2（已用无水乙醇稀释）至柱子中。10,000 \times g 离心 30~60 秒。
6. 倒弃滤液，把柱子套回 2ml 离心管中。加入 300 μ l Buffer RW2（已用无水乙醇稀释）至柱子中。10,000 \times g 离心 2 分钟。
取出柱子时，不让柱子的底部碰到液体。若碰到液体后，倒弃废液后再离心 1 分钟。
11. 把柱子套在 2 ml 离心管中，加入 15~40 μ l RNase Free Water 至柱子膜中央。放置 1 分钟。10,000 \times g 离心 1 分钟。
12. 丢去柱子，把 RNA 保存于-20 $^{\circ}$ C。

常见问题

1. 回收效率低

- **凝胶用量过多：**过量的凝胶会降低回收率，切胶时尽量去除多余的凝胶。
- **溶胶液不足：**Buffer GDP 加入量不能低于凝胶重量的 3 倍。
- **洗脱不充分：**建议用洗脱液洗脱两次，以获得最高的回收率。洗脱液必须加入柱子的膜中央。洗脱效率取决于洗脱体积和次数。
- **试剂准备有误：**Buffer RW2 没有加入乙醇稀释或体积不准确(乙醇浓度需控制在 80%)。

2. 盐污染

- **A260/230 太低：**Buffer GDP 溶液中的异硫氰酸胍在 A230 中有较高的吸收峰。使用该产品，A260/230 通常小于 1.0。实验表明，该产品得到的 DNA 不会影响下游的运用，包括测序，连接，定量 PCR，PCR，酶切等。

3. 连接不理想

- **乙醇污染：**洗脱 RNA 前，打开柱子的盖子，空气干燥 10~15 分钟以彻底去除乙醇。
- **核酸变性：**降低溶胶温度至 37~50 $^{\circ}$ C。降低温度，可延长溶胶时间至 20~40 分钟让凝胶充分溶解。降低温度能有效减少核酸的脱嘌呤和变性的影响。