

HiPure RNA Pure Micro Kits

RNA 产物纯化试剂盒

产品简介

本产品为 RNA 粗制产物，DNase 消化反应液、酶促反应液等样品的 RNA 片段回收纯化提供一条快速的解决方案。试剂盒采用硅胶柱纯化技术，适合于从 RNA 粗制产物、内切酶切体系、或其它酶促反应液中回收 >25nt RNA 片段，纯化的 RNA 可直接用于测序，连接，酶切，RT-PCR，标记等。

产品组份

Cat.No.	R2144-01	R2144-02	R2144-03
纯化次数	10 Preps	50 Preps	250 Preps
Buffer RP	5 ml	30 ml	120 ml
Buffer RW2*	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
RNase Free Water	1.8 ml	20 ml	60 ml
HiPure RNA Mini Columns I	10	50	250
2 ml Collection Tube	10	50	250

保存条件

本产品在室温下可以保存 18 个月。

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。吸附了核酸的滤膜经洗涤去除蛋白质和盐, 最后用低盐缓冲液(如 Buffer TE) 或水, 洗脱出核酸。

RNA 产物和高盐结合缓冲液 Buffer RP 混匀, 高浓度的胍盐离子会变性或灭活酶分子, 加入适量的无水乙醇, 转移至硅胶柱中吸附 RNA, 而引物, 单核苷酸(dNTP), 小片段的引物二聚体, 以及酶分子等其它杂质则从柱子流出, 不被吸附。柱子再经含乙醇的洗涤液脱盐, 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 (~13,000 x g)
- 1.5ml 离心管(RNase-Free)
- 无水乙醇

实验步骤

1. 短暂离心收集酶促反应液、DNase 消化液、粗制的 RNA 产物等样品。若样品体积不足 100 μ l 时，用 RNase Free Water 补足至 100 μ l。

若样品体积超过 100 μ l 时，按比例增加 Buffer RP 和无水乙醇的用量。

2. 加入 300 μ l Buffer RP 至样品中，涡旋混匀 5 秒，室温静置 5~10 分钟灭活酶分子。

若样品中含有大量蛋白质和酶物质，加入等倍体积的酚氯仿(C493)至样品中，涡旋混匀后，10,000 \times g 离心 10 分钟，转移上清液，再按第 3 步进行操作。

回收大于 200nt 时片段，因乙醇浓度比较低，一般情况下都不需要酚氯仿抽提。

回收小分子 RNA 或 miRNA 时，因需要加入更多的乙醇，用酚氯仿抽提去除蛋白质后，有利于提高回收率和 RNA 的纯度。

3. 加入 250 μ l 或 600 μ l 无水乙醇，涡旋混匀 5 秒。

若需回收小分子 RNA(<200nt)或 miRNA 时，加入 600 μ l 无水乙醇。

回收 mRNA 或大于 200nt 的 RNA 片段时，加入 250 μ l 无水乙醇。若需要更充分去除小于 200nt 的短片段 RNA 污染，加入 150 μ l 无水乙醇。

4. 将 HiPure RNA Mini Column I 套在收集管中。把混合液转移至柱子中。10,000 \times g 离心 30-60 秒。

混合液超过 750 μ l 时，一次最多转移 750 μ l 至柱子中，余下的混合液按第 5 步分次加入。

5. (可选：混合液>750 μ l) 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。把剩余的混合液转移至柱子中。10,000 \times g 离心 30-60 秒。

6. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。加入 700 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。

Buffer RW2 使用之前，按瓶子上的标签指示加入无水乙醇进行稀释。

7. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。加入 700 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。

8. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。13,000 \times g 离心 2 分钟。

9. 把柱子套在 1.5ml 离心管中，加入 15-50 μ l RNase Free Water 至柱子膜中央。放置

1 分钟。13,000 × g 离心 1 分钟。

若需要获得最高产量，建议重复第 9 步进行第二步洗脱。

10. 丢去柱子，把 RNA 保存于-20℃。

常见问题

1. 回收效率低

- **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 RVW2 没有加入乙醇稀释或体积不准确(乙醇浓度需控制在 80%)。
- **结合液加入体积不足：**Buffer RP 的体积是样品体积的 3 倍。

2. 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。
- **A260/230 低：**Buffer RW2 加至柱子后，静置 2 分钟后再离心。