

## 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 $\mu$ l 时，用 RNase Free Water 补足至 100 $\mu$ l。**

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

2. **加入 300 $\mu$ 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 $\mu$ l 或 600 $\mu$ 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 $\mu$ l 无水乙醇。

回收 mRNA 或大于 200nt 的 RNA 片段时，加入 250 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ l 时，一次最多转移 750 $\mu$ 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  $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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。