

## HiPure Poly Gel RNA Kit

PAGE胶RNA回收试剂盒

### 产品组份

Cat.No.	R2114-01	R2114-02	R2114-03
包装次数	10 Preps	50 Preps	250 Preps
Buffer GRS	5 ml	30 ml	60 ml
Buffer RP	5 ml	30 ml	120 ml
Buffer RW2*	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
RNase Free Water	1.8 ml	10 ml	30 ml
HiPure RNA Mini Column I	10	50	250
Poly-Gel Filter Column	10	50	250
2 ml Collection Tube	20	100	500

版本号: 202401

### 保存条件

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

## 产品简介

聚丙烯酰胺凝胶电泳常用于核酸的高分辨率的电泳分析。DNA或RNA经聚丙烯酰胺凝胶电泳后，常常需要从凝胶中切出所需要DNA或RNA片段，然后再进行回收。HiPure Poly Gel RNA Kit适合于从各种浓度的变性或非变性的聚丙烯酰胺凝胶中回收RNA片段。RNA回收效率可高达60-80%，纯化的RNA可直接用RT-PCR，标记等应用。

## 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，最后可以用低盐缓冲液(如Buffer TE)或水，洗脱出滤膜上吸附的核酸。得到的核酸纯度高，可直接用于各种下游实验。

## 准备事项

- 小型高速离心机 (~12,000 × g)
- 水浴锅温度设至 50℃
- 小型高速离心机 (~12,000 × g)
- 灭菌的1.5ml或2.0ml 离心管
- 无水乙醇
- 干净的刀片
- 水浴锅温度设至45℃
- Buffer RW2使用前加入4倍体积的无水乙醇进行稀释，于室温保存。

## 实验步骤: RNA 回收

1. 配制合适浓度的聚丙烯酰胺凝胶, 电泳分离出RNA片段, 用干净的刀片切下含目的RNA片段的凝胶块, 放置在载玻片上称重。

本产品也适于从琼脂糖凝胶中回收RNA片段, 配制合适的浓度的琼脂糖凝胶电泳分离后, 切下含RNA片段的凝胶块, 放置于载玻片上称重。

2. 用另一块载玻片将凝胶块压成小的碎片, 把全部碎片转移至1.5ml离心管中。

聚丙烯酰胺凝胶熔点高, 凝胶不能熔解。RNA主要通过扩散方式从凝胶中游离出来, 尽量把PAGE胶研磨成小碎片, 有利于提高RNA的回收效率。

Buffer GRS是低盐溶液, 也不会溶解琼脂糖凝胶, RNA也是靠扩散方式从凝胶中游离出来, 把凝胶块处理小碎片, 有利于RNA扩散至液体中, 提高回收率。

3. 按100mg凝胶100 $\mu$ l为转换关系, 加入1.5倍体积Buffer GRS/DTT, 37 $^{\circ}$ C振荡温育30分钟让RNA充分扩散到溶液中。

使用前, 按1ml Buffer GRS加入20  $\mu$ l 2M DTT。例, 100mg的凝胶, 则需加入150 $\mu$ l Buffer GRS/DTT。

4. 取一个Poly-Gel Filter Column装在收集管中。把第3步获得的混合液和全部凝胶碎片转移至柱子中, 13,000  $\times$  g 离心1分钟。

转移混合液/凝胶块时, 用剪刀或刀片切去移液枪头的一部分, 防止枪头堵塞。

5. 丢去过滤柱, 测量滤液的体积, 加入1倍体积Buffer RP和2倍体积异丙醇至滤液中, 用移液器吸打混匀3-5次。

例, 滤液的体积为250 $\mu$ l, 则需加入250 $\mu$ l Buffer RP和500 $\mu$ l异丙醇。

6. 将HiPure RNA Mini Column I套在收集管中, 把混合液(第5步获得的)转移至柱子中。

10,000  $\times$  g 离心30-60秒。

RNA柱一次最多装700 $\mu$ l溶液, 混合液超过700 $\mu$ l时, 按第7步分次加入。

7. (可选: 混合液>700  $\mu$ 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。

8. 倒弃滤液, 把柱子套回收集管中。加入500 $\mu$ 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使用前，按瓶子上的标签所示，加入4倍体积的无水乙醇进行稀释。

9. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。加入500 $\mu$ l Buffer RW2（已用无水乙醇稀释）至柱子中。10,000  $\times$  g离心30-60秒。
10. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。12,000  $\times$  g离心3分钟。
11. 把柱子套在1.5ml离心管中，加入15~30 $\mu$ l RNase Free Water至柱子膜中央。放置2分钟。12,000  $\times$  g离心1分钟。丢去柱子，把RNA保存于-20 $^{\circ}$ C。

## 常见问题回答

该列表可能有利于解决提取过程所碰到的问题。此外，HiPure的技术人员也可以随时为您提供服务，若您对试剂盒存在问题或建议，或您在分子生物学碰到问题，都请您联系我们。我们将竭尽能力为您排忧解难。

现象	原因及解决方法
<b>回收效率低</b>	
凝胶没有压碎	聚丙烯酰胺凝胶在低温不会凝解。尽量压碎凝胶有利于提高回收效率。
洗脱液体积大小	加入洗脱液体积不能太少。
Buffer RW2没有加乙醇	Buffer RW2使用前必须用无水乙醇进行稀释。
<b>下游应用不理想</b>	
盐污染	加入Buffer RW2至柱子后，静置5分钟后再离心。
乙醇污染	Buffer RW2最后一步洗涤时，离心时间不能减少。取出柱子必须确保柱子的底部不会接触到滤液。若不小心接触到滤液，倒弃收集管的滤液，把柱子放回收集管中，空柱离心2分钟以彻底干燥柱子。
紫外曝光时间太长	RNA在紫外灯下曝光时间不要超过20秒。

若以上的解答还是无法解决您的问题，请您联系我们。