

R6376 Poly-Gel RNA Extraction 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 RWB Wash Buffer 进行稀释，稀释后室温保存

货号	加入量
R6376-00	8mL
R6376-01	20mL
R6376-02	48mL

提取步骤：

变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

建议使用小型 mini 凝胶（如 BioRad Mini-Protean）凝胶纯化。小凝胶具有快速且易于制备（<45min），实验操作快（约 30min）且价格低廉等特点。

1. 按照以下方案制备 5% 丙烯酰胺/8M 尿素变性聚丙烯酰胺凝胶（配制 15mL，用于制备 13cm×15cm×0.75mm 厚的凝胶）。

混匀：7.2g 尿素

1.5mL 10×TBE

1.875mL 40% 丙烯酰胺（丙烯酰胺：双丙烯酰胺按照 19:1）

2. 向上述混合物中加入 dH₂O 至最终体积为 15mL，在室温下搅拌至不再溶解后，加入：120μl 10% 新鲜配制的过硫酸铵和 16μl TEMED

3. 混匀后将其倒入至制胶槽中，设置 30min；

4. 向样品中，加入等探针体积的上样缓冲液，如果探针沉淀在底部，则直接将上样缓冲液重悬。可在 95°C 中加热 3-5min 使其二级结构发生变性，后置于冰上防止其复性。

5. 将孔中的尿素冲洗掉，将探针点入到凝胶孔中，开始跑电泳，直至最快的蓝色染料前端到达凝胶底部（对于微凝胶，一般在 200mA 下需要跑 30min 左右）。

RNA 的显现

2.1 对于放射性同位素探针（³²P⁻、³³P⁻、或 ³⁵S）：将胶从玻璃板上取下，使其粘附到更大的玻璃板上。在凝胶上包裹一层保鲜膜。将凝胶转移到胶片盒中。如果玻璃和凝胶不能装入胶片盒，需将两块玻璃板小心取下，将凝胶完全用塑料包装包起来（以便于实验）

2.2 将凝胶（夹在玻璃和塑料包装之间）放在薄膜上，使薄膜与凝胶最接近，将薄膜与玻璃板的一个角对齐，玻璃板的角和侧面用永久性标记笔直接标记到薄膜上，另外，也可使用 adioactive 墨水进行定向。薄膜的一个角（如右下角）通常被剪断或折叠，使得玻璃和凝胶在显影后可与薄膜对齐。

2.3 将凝胶暴露在放射自显影胶片，对于高比活性 ^{32}P 标记的探针约需要 30s，对于低比活性 ^{32}P 标记的探针或高比活性 ^{35}S 标记的探针需要 10min。目的是曝光获得浅灰色的条带，以便可以从凝胶上切下薄的凝胶片段。将玻璃板和凝胶与显影的胶片重新对准（使用之前制作的引导标记），用无核酸酶的实验刀或刀片小心地将条带切下。将多余的凝胶片段去除得越少，实验提取产率越高，探测恢复得更快。可将凝胶重新曝光观察以确保凝胶和薄膜对齐且切下的片段中包含所需探针片段。

Note: 如果已知片段大小或作出标记，可帮助选择适当的波段；如果没有，则需使用溴酚（深蓝色）和二甲苯蓝（浅蓝色）染料作为参考。在变性的 5% 聚丙烯酰胺凝胶中，溴酚蓝在 35nt 下进行，二甲苯蓝在 130nt 条件下进行。

2.1 对于非同位素探针（未标记或生物素标记）：当玻璃阻挡到 UV 紫外光时，需要从两个玻璃板上将凝胶除去，因此可防止 UV 胶紫外照射或染色造成的显影。从玻璃板上取下凝胶，并用塑料包装起来以做好标记并做实验。取下顶部玻璃板后，在凝胶上铺一层保鲜膜，将凝胶和玻璃板翻转，小心将凝胶从底部玻璃板上剥离，用塑料包装将凝胶完全包裹起来

Note: 只需使用单层保鲜膜，并尽可能防止凝胶和塑料包装之间形成气泡。这些气泡会散射紫外线导致更难观察。

2.2 对于非同位素和未标记的探针，凝胶不能像放射性同位素探针一样直接暴露在胶片中。但是，它们通常能够合成更多的探针，并保持短波长手持式紫外光源和氟涂层 TLC 板进行 UV 胶紫外照射，或者用 EtBr 或吖啶橙染色使其保持不变，紫外透射仪可以显示探头在凝胶内的位置。

Note: 任何与凝胶表面接触的东西都应进行无 RNase 处理，以去除 RNase 污染。

UV 胶紫外照射

将凝胶放到涂有氟涂层的 TLC 板的暗白侧面上，并将凝胶顶部的塑料包装取下。在凝胶上保持手持短波长 (254nm) UV 光源。（长波紫外线不起作用）。如果存在核酸，凝胶下方的 TLC 板会发出明亮的紫色光，单个波段的灵敏度极限为 0.4 μg 。

Note: 紫外线阴影适合用于标记或未标记的 DNA 或 RNA，因此该技术在很多实验中都有应用。

染色

可以使用吖啶橙或 EtBr，因为该试剂使用 HiBind RNA column 纯化，可以除去这些染料。从塑料包装中取出凝胶，置于 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 吖啶橙溶液中 15min。

将凝胶转移到蒸馏水中浸泡 10min。将凝胶重新包裹在塑料包装中以便于实验，并

将凝胶放在 UV 透射仪上，可观察到探针。

使用无核酸酶的实验刀或刀片) 小心将可能包含 DNA 条带的凝胶片段切下 (对应于凝胶中的亮条带，尽可能取出多余的胶)。将越多多余的凝胶切除，最终的回收效率就越高 (即可更快地回收到更多的 DNA)，如果担心有非目的条带没有切除，可再次将凝胶转移到紫外光下进行观察。

RNA 探针的洗脱和纯化

1. 将凝胶片段转移到无核酸酶的显微镜载玻片上，用另一个载玻片 (或无核酸酶的剃刀) 将凝胶完全捣碎。小心将凝胶浆转移到无核酸酶的微量离心管中，加入 200 μ l Buffer RFE，该用量通常能浸没 2mm \times 5mm \times 0.75mm 的凝胶切片。对于较大的片段，可调整 Buffer RFE 的用量使其能够浸没凝胶。

2. 在 65 $^{\circ}$ C 孵育 1-2h，洗脱时间取决于凝胶片段的大小，RNA 大小和孵育的温度。在 65 $^{\circ}$ C 孵育 1h 左右能将大约 90% 400nt 的转录产物洗脱，对于较大的片段，则需要更长的时间才能洗脱。如果下游实验涉及到酶消化，则需继续步骤 3。

Note: 没有必要在杂交之前将所有探针洗脱，仅需要 (即每个 RNase 保护测定反应 5-10 \times 10⁴cpm 的高比活性探针，或 Northern 测定的约 1 \times 10⁷cpm)，可以在洗脱期间的任意时间取出等份的 Buffer RFE (含有一些探针) 并直接用于杂交反应。这允许在探针制备的同一天建立杂交反应。需注意，在 200 μ l Elution Buffer 中洗脱高比活性探针中产生约 2-5 \times 10⁴cpm/ μ l。

RNA 探针纯化

注意，只有当下游实验涉及酶促反应 (如 PCR) 时，才需要进行以下步骤。

3. 将 Poly-Gel filter unit 套入到灭菌的 1.5mL 离心管中，将凝胶和缓冲液转移到过滤柱中，室温下，10,000xg 离心 5min 过滤样品；

4. 向洗脱液中加入 800 μ l Buffer RB/ β -巯基乙醇，涡旋混匀。对于放射性同位素探针，可添加 5 μ g 的酵母 tRNA 作为载体，注意用量不宜超过 25 μ l；

5. 对于 > 200nt 的 RNA，加入 500 μ l 的无水乙醇，立即涡旋混匀 1min；对于 < 200nt 的 RNA，加入 1.5mL 的无水乙醇，立即涡旋混匀 1min。加入乙醇后可能会形成沉淀，这不会影响到 RNA 的纯化，可通过涡旋将其重悬，后进入下一步操作；

Note: 注意在使用前，每 1mL Buffer RB 中应加入 20 μ l β -巯基乙醇，混匀后可在室温条件下保存一周。

6. 将 HiBind[®] RNA Mini column 套入到 2mL 收集管中，转移 700 μ l 上步骤中的样品至柱子中，10,000xg (在大多数微型离心机上约 12,500rpm) 离心 20s，弃滤液；

7. 重复步骤 6，直至将所有样品液转移过柱；

8. 将 HiBind[®] RNA Mini column 套入到新的 2mL 收集管中, 加入 500 μ l RWB Wash Buffer 至柱子中, 按照前面离心条件离心;

Note: RWB Wash Buffer 在使用前必须按照说明书加入无水乙醇进行稀释。

9. 重复步骤 8, 再次加入 500 μ l RWB Wash Buffer 进行洗涤;

10. 将 HiBind[®] RNA Mini column 套回到 2mL 收集管中, 10,000xg 空柱子离心干燥柱子基质, 该步骤对于除去残留的乙醇至关重要, 否则可能会影响下游实验;

11. 将 HiBind[®] RNA Mini column 套入到新的 1.5mL 离心管中, 加入 30-50 μ l DEPC-treated water, 8,000xg 离心 (在大多数微型离心机上约 10,000rpm)。对于非同位素探针 (通常以 μ g 量级存在), 可以第二次加入 30-50 μ l DEPC-water 进行洗脱, 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