

RNA 纯化方案

转录获得的 RNA 可以选用 RNA Cleaner 磁珠进行纯化 (货号: 12602), 也可以采用酚/氯仿纯化法, 氯化锂沉淀法或柱纯化等, 以去除蛋白、游离的核苷酸。纯化后的 RNA 经电泳检测后可进行下游实验或存储于 -80°C 。

A. RNA Cleaner 磁珠纯化法

提前将 RNA clean beads 从 4°C 取出, 平衡至室温 (约 30 min), 并用 RNase-free H_2O 将转录产物稀释至 $50\mu\text{L}$ 。

(1) 颠倒或涡旋振荡使磁珠充分混匀, 吸取 $2\times$ 磁珠 ($100\mu\text{L}$) 加入 RNA 样品中 ($50\mu\text{L}$), 用移液器吹打 6 次充分混匀。室温孵育 5 min, 使 RNA 结合到磁珠上。

(注: 如果是小片段, 则可吸取 $3\times$ 磁珠 ($150\mu\text{L}$) 加入 RNA 样品中 ($50\mu\text{L}$), 以提高 RNA 回收率。)

(2) 将样品置于磁力架上 5 min, 待溶液澄清后, 小心移除上清。

(3) 保持样品置于磁力架上, 加入 $200\mu\text{L}$ 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠, 室温孵育 30s, 小心移除上清。重复此操作一次。(最后一次漂洗后, 应尽可能除尽上清)

(注: 漂洗时使用的 80%乙醇需要使用 RNase-free H_2O 新鲜配制, 以防止引入 RNase 导致 RNA 降解。)

(4) 保持样品始终处于磁力架上, 开盖空气干燥磁珠 5 min。

(注: 磁珠开盖晾干时要避免过分干燥, 如果磁珠出现龟裂, 则提示磁珠过分干燥, 此时 RNA 的洗脱效率会降低。)

(5) 将样品从磁力架上取出, 加入 $22\mu\text{L}$ RNase-free H_2O , 用移液器吹打 6 次以充分混匀, 室温静置 5 min。

(6) 将样品置于磁力架 5 min, 待溶液澄清后, 小心转移上清 $20\mu\text{L}$ 至一个新的 RNase-free PCR 管中。

(注: 建议转移上清时留 $2-3\mu\text{L}$ 液体, 以免吸到磁珠影响后续实验。得到的 RNA 极不稳定, 建议冰上放置并尽快进入下一步。若要保存, 请置于 -80°C 保存。)

B. 酚/氯仿纯化法

(1) 向 $20\mu\text{L}$ 反应混合物中, 加入 $115\mu\text{L}$ RNase-free H_2O 和 $15\mu\text{L}$ 3M 乙酸钠 (pH5.2),

混合均匀。

(2) 用等体积的酚/氯仿 (1:1) 抽提一次, 再用等体积的氯仿抽提 2 次, 收集上清, 并转移至新的 RNase-free EP 管中。

(3) 加入 2 倍体积的无水乙醇沉淀 RNA。混合均匀后置于-20°C至少 30min, 以最大转速, 4°C离心 15min, 收集沉淀。

(4) 加入 500 μ L 冰预冷的 70%乙醇洗涤 RNA 沉淀。

(5) 用 20 μ L RNase-free H₂O 溶解 RNA 沉淀。纯化后的 RNA 溶液于-80°C保存。

C. 氯化锂沉淀法

采用氯化锂沉淀法, RNA 长度要大于 300nt, 且浓度不能低于 100ng/ μ L。

(1) 向 20 μ L 反应混合物中, 加入 30 μ L RNase-free H₂O 和 30 μ L 7.5M 氯化锂。

(2) 混合均匀后, 置于-20°C至少 30min, 以最大转速, 4°C离心 15min, 收集沉淀。

(3) 加入 500 μ L 冰预冷的 70%乙醇洗涤 RNA 沉淀。

(4) 用 20 μ L RNase-free H₂O 溶解 RNA 沉淀。纯化后的 RNA 溶液于-80°C保存。

D. 柱纯化法

纯化前向 20 μ L 反应混合物加入 80 μ L RNase-free H₂O (即将产物稀释至 100 μ L), 再按柱纯化说明书进行纯化。



www.yeasen.com