

体外转录反应纯化

本方案由 Promega 应用科学家开发，仅供研究使用。用户需自行确定该方案是否适用于其具体应用。如需更多信息，请参阅技术手册 TM508，所有技术文献的英文原版均可在 www.promega.com/protocols 获得。请访问该网址以确定您使用的说明书是否为最新版本。如果您在使用该试剂盒时有任何问题，请与 Promega 北京技术服务部联系。电子邮箱：chinatechserv@promega.com

使用 ProNex™ Size-Selective Purification 系统从体外转录 (IVT) 反应中纯化 RNA。

试剂盒： ProNex® Size-Selective Purification System (目录号 NG2001)

分析方法： 吸光度

样品类型： IVT 反应

样品输入量： 可变；本方案基于 50μl 的 IVT 反应

所需材料：

- ProNex® Size-Selective Purification System (目录号 NG2001)
- 2ml 管磁分离器 (例如, Invitrogen™ DynaMag™-2 Magnet, ThermoFisher, 目录号 12321D)
- 无核酸酶水 (目录号 MC1191)

操作步骤 (根据 AN336¹ 进行修改调整)：

1. 在开始纯化前，将 ProNex® Size-Selective Purification System 置于室温下平衡 30 分钟到 1 小时。
2. 确保 ProNex® Size-Selective Chemistry 瓶盖拧紧。通过剧烈涡旋 10 秒或更长时间重悬内容物。
3. 将 ProNex® Size-Selective Chemistry 以 3:1 体积比 (ProNex® Size-Selective Chemistry 体积: IVT 反应体积 = 3:1) 加入 IVT 反应中，通过移液器吹打 10 次混合。不要涡旋。
4. 在室温下孵育样品 10-20 分钟 (更长的孵育时间可能会增加产量)。
5. 将样本放在磁力架上静置 2 分钟。小心移除并丢弃上清液。
6. 确保已向洗涤缓冲液中添加乙醇。保持样品在磁力架上，加入 4 倍起始 IVT 反应体积的重组洗涤缓冲液，并孵育 30-60 秒。移除并丢弃洗涤缓冲液。
7. 重复步骤 6，总共洗涤 2 次。
8. 让样品在空气中干燥 10 分钟。(注：干燥时间最长可达 1 小时)。
9. 将样本从磁力架上取下。
10. 加入 1 倍起始样品体积的无核酸酶水，通过移液器吹打或在板式混合器上摇动来重新悬浮树脂。在室温下孵育样品 5 分钟以洗脱 RNA。

(注：可以使用更多或更少的洗脱缓冲液，但洗脱体积小于起始样品体积的 25% 可能难以操作，并可能导致由于树脂空隙体积导致的产率损失)。
11. 将样本放回磁力架上静置 1 分钟，然后小心地将洗脱的 RNA 转移到干净的试管或孔中。

结果:

IVT 反应产物可以使用 ProNex™ Size Selective Purification System 进行纯化。

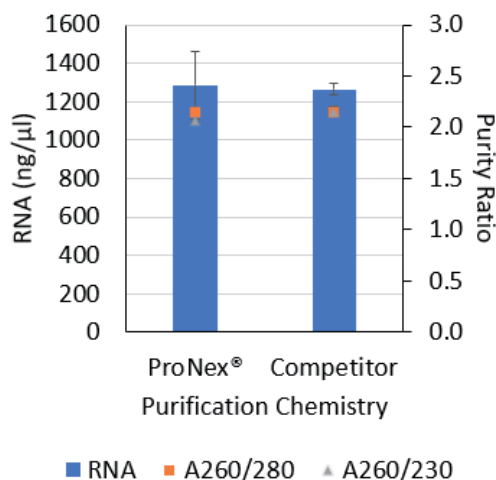


图 1. 使用 ProNex® Size-Selective Purification System 进行 RNA 纯化。

从重复的体外转录反应中汇集的 RNA 使用 ProNex® Size-Selective Purification System（如上所述，ProNex®）或竞争品牌的化学试剂（根据制造商的说明书）进行三次技术重复纯化，并在 120μl 无核酸酶水中洗脱。样品在 NanoDrop™ One 分光光度计上进行定量和纯度分析。图中显示了平均 RNA 洗脱液浓度（蓝色）和平均纯度比值（A260/A280，橙色方块；A260/A230，灰色三角形），误差线表示三次纯化重复的标准偏差。第二次洗脱步骤仅获得可忽略不计的 RNA 量（数据未显示），因此一次洗脱足以回收纯化的 RNA。

参考文献:

1. Applications Note: RNA Cleanup with the ProNex® Size-Selective Purification System. AN336. 12/18.

普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司

地址: 北京市东城区北三环东路 36 号
环球贸易中心 B 座 907-909
电话: 010-58256268
传真: 010-58256160

网址: www.promega.com
技术支持电话: 400 810 8133
技术支持邮箱: chinatechserv@promega.com
更新时间: 2025.03

