

R6688 Tissue RNA Kit

组织 RNA 提取 常见问题及排除方法

1. 实验前检查试剂盒中的 TRK Lysis Buffer 是否有沉淀物析出, 久置或低温都会让 TRK Lysis Buffer 析出沉淀, 如有沉淀析出, 需按照说明书提示: 在 37°C 水浴至沉淀完全溶解。
2. 实验前, RNA Wash Buffer II 必须按照说明书加入【无水乙醇】稀释备用。请开盖闻气味确认是否已加入乙醇稀释。稀释错误或未稀释会导致 RNA 无法挂柱结合, 致提取失败。也可使用 DEPC Water 配制 80%乙醇替代 RNA Wash Buffer II 看看能否提取成功。
3. 注意在 TRK lysis Buffer 中加入 β -巯基乙醇用于阻断 RNase 降解 RNA, 注意该混合建议现配现用, 混入 β -巯基乙醇的 TRK lysis Buffer 可在室温下储存 1 周左右。
4. 将混合液转移到 HiBind[®] RNA Mini Column 前, 必须加入转移上清 0.5 倍体积的无水乙醇充分混匀, 正确调节 RNA 与柱子的结合条件。如没有加入乙醇, RNA 将被全部冲掉, 致提取失败。
5. 如下游需进行荧光定量实验或其他对 DNA 污染敏感的实验, 建议购买 DNase Set (货号 E1091) 在提取过程中进行快速膜上 DNA 消化, 产物无需灭活或再次纯化, 可直接应用于反转录及荧光定量实验检测。
6. 若出现堵柱子的情况, 应注意以下几点:
 - (1) 注意样品用量: 组织样品不建议超过 30mg, 过多的样品量不但不会增加产量, 反而可能会导致堵柱子;
 - (2) 注意在加入 TRK lysis Buffer 后需将样品研磨充分, 否则可能造成裂解不充分或导致堵柱子, 进而影响提取效果;
 - (3) 在加入 OB Protease Solution 后, 可适当延长 55°C 孵育的时间 (最长不超过 3hrs), 孵育期间应每隔 20~30min 取出涡旋颠倒一次, 可帮助充分裂解;
 - (4) 裂解不充分: 如不宜减少样品用量, 则需增加过柱前试剂 (TRK lysis Buffer、无菌水、OB Protease、无水乙醇等) 的用量, 确保样品得到充分裂解。
7. 注意不要省略空柱子离心步骤, 该步骤能除去柱子中残留的乙醇, 否则可能会影响下游实验。如产物点电泳时无法正常沉降, 绝大部分情况下由于空甩不完全, 乙醇残留所致, 在下次提取中, 提高离心机速度或延长空甩时间至 5~10min, 可解决残留问题。
8. 不要随意缩小说明书中的洗脱体积至小于 30 μ l, 过低的洗脱体积会大幅降低洗脱效率; 将 DEPC Water 预热至 70°C 对提高产量有帮助; 另外, 可进行二次洗脱, 确保绝大部分 RNA 被完全洗脱。洗脱方法: 将第一次洗脱的 DEPC Water 重新吸回 HiBind[®] RNA Mini Column, 室温等待 5min, 再次离心。

9. 除说明书注明离心温度的情况下才使用温控, 请勿在未注明离心温度或注明常温条件时使用低温温控离心, 如室温过低请把离心机调整至 15~25°C, 以此保证 RNA 在最适合温度下结合上柱。

RNA 降解原因和排查方法

1. RNA 在样品冻存过程中会逐渐发生降解, 如提取的为冻存样品, 最后产物降解的可能性会远大于新鲜培养样品。请尽量使用新鲜或冻存时间短的样品。
2. RNA 样品研磨后需在液氮完全挥发前马上混入裂解液, 延缓 RNA 的降解。如单次手工操作多个样品的研磨, 可在离心管内先分装好裂解液, 液氮研磨后马上转入离心管震荡混匀再进行下一个样品的研磨。
3. 特别需要注意的是: 电泳槽如果是跟 DNA 混用, 跑胶过程中的降解也是非常常见的。因为 DNA 提取时经常需要使用 RNase, RNase 很难完全失活, 如果 DNA 和 RNA 电泳槽混用, 跑胶时容易被 RNase 污染导致 RNA 产物降解。注意电泳槽 DNA 和 RNA 不要混用。
4. 除了样品以外, 也应注意在提取过程中配制溶液用的水是否除酶, 枪头, 离心管是否无酶。这些都是引起 RNA 降解的原因。注意使用无酶耗材(可购买或使用 DEPC Water 处理后灭菌), 单纯的高压灭菌不足以去除 RNase。

电泳槽清理办法:

用 1%SDS 把电泳槽, 制胶梳子, 卡槽浸泡过夜, 第二天用大量清水洗干净, 后更换新的电泳液进行电泳。如实在没有条件, 也需要把电泳的梳子, 制胶槽清洗干净, 将电泳液换新。Loading Buffer 务必不能与 DNA 混用, 否则 RNA 极易在电泳过程中降解。

如按照上述步骤仍无法排查问题, 请提供单位名称及试剂盒条形码(即盒外标签 Lot 开头数字字母组合) 核验正品货源, 添加技术支持 QQ: 800848200 获取更多信息。