

R6842 miRNA Isolation Kit

miRNA 提取 常见问题及排查方法

1. 实验前, RWB Wash Buffer 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。
2. 对于细胞, 尽可能用新鲜的样品, 如需储存, 需将裂解液加入到细胞样品中再储存缓解降解, 否则 RNA 很可能在储存过程中降解, 储存后的样品应尽快提取。
3. 确保在裂解液中加入正确体积的氯仿, 如果正确加入氯仿或氯仿不纯, 可能会导致不分层, 在加入氯仿后, 在离心前注意涡旋将样品充分混匀; 另外, 确保样品本身不含任何有机试剂 (如 DMSO 或碱性试剂)。
4. 将混合液转移过柱前, 必须按照说明书加入适当体积的无水乙醇, 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, 需注意以下几点:
 - (1) 注意样品用量: 细胞样品不宜超过 1×10^7 个, 动物组织不宜超过 50mg, 植物组织不宜超过 100mg, 过多的样品量不仅不会增加产量, 反而会因为裂解不充分, 导致堵柱子;
 - (2) 推荐使用液氮研磨组织样品, 在加入 RNA-Solv[®] Reagent 后应注意将样品和裂解液充分涡旋混匀;
 - (3) 若出现堵柱子的情况, 可适当延长离心的时间, 可帮助样品完全转移过柱; 在下次提取时必须减少样品用量。
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 40-50 μ l, 过低的洗脱体积会大幅降低洗脱效率。如产物浓度偏低, 将 DEPC Water 预热至 70 $^{\circ}$ 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 2-3min, 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 $^{\circ}$ C, 以此保证 RNA 在最适温度下结合上柱。

RNA 降解原因和排查方法

1. 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。
2. 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。
3. 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。

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。