

R6814 Blood RNA Kit

血液 RNA 提取 常见问题及排查方法

1. 从采样开始，血液中的 RNA 就开始降解，该过程是一直存在的，建议采用新鲜样品进行提取；如采样后需储存样品，建议储存到-80°C中减缓降解的速度，并尽快提取。
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醇类稀释。稀释错误或未稀释会导致 RNA 无法挂柱结合，致提取失败。
3. 观察加入 Buffer ERL 进行红细胞涨破后，离心是否得到肉眼可见的沉淀物。如不可见，建议增加血液量进行富集。
4. 如有肉眼明显可见细胞团，加入 100 μ l DEPC water 重悬时应尽量把所有沉淀团打散，以便在下一步加入 MRC Lysis Buffer 后，与样品充分接触裂解。如此步没有彻底打散将直接影响最终得率。
5. β -巯基乙醇与 MRC Lysis Buffer 的混合可进一步防止 RNA 在提取中发生降解。保证最终提取得率，如有条件建议加入。
6. 加入 MRC Lysis Buffer 后应用枪头多次吹打混匀，至肉眼无法看到细胞沉淀团；
7. 应使用 DEPC water 配制 70%乙醇，确保无 RNase 污染。
8. 将混合液转移到 HiBind™ RNA mini column 前，必须加入混合液等体积的 70%乙醇混匀，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。
9. 加入 70%乙醇后应注意是否出现白色絮状沉淀，如出现有白色絮状沉淀，应尽量吹打打散，以免其影响核酸的结合。
10. 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。
11. 在转移过柱时，所有裂解液是否顺利通过，如有堵柱情况发生，请加大离心速度或延长离心时间让液体全部通过柱子。
12. 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。
13. 为了确保浓度，向柱子中加入 30 μ l DEPC water，室温静置 1min，离心 1min，把洗脱产物重新吸回柱子中，室温静置 1min，再次离心洗脱。可在不增加洗脱体积的同时确保产物浓度。

14. 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 在最适温度下结合上柱。

如何排除是否由试剂原因引起问题?

1. 取健康人血液或其他哺乳动物血液 1mL (标准方案) /150µl (x-press 方案) ;
2. 跳过 DNase 消化步骤;
3. 使用 DEPC water 配置 80%乙醇, 替代 RNA Wash Buffer II, 重复实验;
4. 如取用 150µl 可尝试使用 X-press 方案进行低损耗提取;
5. 最后使用 30µl DEPC water 进行两次洗脱 (如上述第 9 步所述) 。

如何排除是否由检测方法引起问题?

1. 请使用试剂盒内自带 DEPC water 进行机器调零;
2. 尝试加大电泳上样量检测是否存在 RNA 条带, 可判断到底是浓度低还是没有被提取成功。

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的样品。请尽量使用新鲜或冻存时间短的样品。
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。

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。