

R6874 Viral RNA Kit

病毒 RNA 提取 常见问题及排查方法

1. 实验前检查 QVL Lysis Buffer 是否有沉淀物析出, 久置或低温都可能会使 QVL 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, VHB 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。
3. 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。
4. 将混合液转移到 HiBind® RNA Mini Column 前, 必须加入混合液 0.5 倍体积的无水乙醇混匀, 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。
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. 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。
7. 不要随意缩小说明书中的洗脱体积, 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 65°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。
8. 通常情况病毒核酸含量非常低, 产物本身的量可能就是 pg 级别的, 但在下游实验依然能顺利进行。所以即使提取产量较低, 产物也可以不作废, 可尝试进行下游实验。
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。

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。