

目 录

简 介	2
原 理	2
试剂盒组成	3
保质期	4
准备工作	5
方案 1:总 RNA 中量抽提离心方案	6
方案 2:总 RNA 中量抽提负压抽滤方案	8
方案 3:总 RNA 大量抽提离心方案	9
方案 4:总 RNA 大量抽提负压抽滤方案	11
方案 5:总 RNA 96 孔板离心方案	12
方案 6:总 RNA 96 孔板负压抽滤方案	14
常见问题回答	15

版本: 2015-01

简介

HiPure Universal RNA Kits 适合于从各种生物样品中提取高纯度总 RNA。试剂盒结合高效 Magzol Reagent 一步法抽提试剂和硅胶柱纯化技术，只需 40 分钟便可完成高纯度总 RNA 的提取工作。得到的 RNA 可直接用于 RT-PCR, Northern blot, poly-A+ 纯化，核酸保护和体外翻译等实验。该系列提取 4 种规格，以满足不同的需求。

试剂盒	Mini Kit	Midi Kit	Maxi Kit	96 Kit
编号	R4130	R4131	R4132	R4133
动物组织	50-100mg	200-400mg	1g	30-50mg
植物用量	100mg	400mg	1g	50mg
培养细胞	1 × 10 ⁷	1 × 10 ⁸	5 × 10 ⁸	5 × 10 ⁶
柱型	1.5 ml 柱	15 ml 柱	50 ml 柱	96 孔板
结合能力	200µg	1mg	5mg	100µg

原理

HiPure 硅胶柱以高结合力的玻璃纤维滤膜为基质。滤膜在高浓度离子化剂(如盐酸胍或异硫氰酸胍)条件下，可通过氢键和静电等物理化学作用吸附核酸，而蛋白质和其它杂质则不被吸附而去除。吸附了核酸的滤膜经洗涤去除残留的蛋白质和盐，最后可以用低盐缓冲液(如 Buffer TE)或水，洗脱出滤膜上吸附的核酸。

HiPure Universal RNA Kit 结合了 RNA 抽提技术两种最广泛技术：一步法抽提技术和硅胶柱纯化技术。样品经一步法抽提试剂 Magzol Reagent 裂解液匀浆裂解，RNA 释放到裂解液中。由于裂解液中含异硫氰酸胍和酚，内源性或外源性的 RNASE 变性而失活，RNA 被保护起来。加入氯仿抽提去除 DNA 和蛋白质，转移上清液并用乙醇调节结合条件，混合液转移至柱子中过滤，RNA 被吸附上柱子的膜上，而杂质不被吸附而去除。柱子经 Buffer RW1 洗涤蛋白质和其它杂质，经 Buffer RW2 洗涤去除盐分，最后 RNA 被 RNASE-Free Water 洗脱。洗脱的 RNA 可直接用于 RT-PCR, Northern blot, poly-A+ 纯化、核酸保护和体外翻译等实验。

组 成

HiPure Universal RNA Midi Kit

产品编号	R4131-01	R4131-02	R4131-03
纯化次数	2 次	10 次	50 次
HiPure RNA Midi Columns	2	10	50
1.5ml Collection Tubes	2	10	50
Magzol Reagent	15 ml	70 ml	350 ml
Buffer RW1	10 ml	50 ml	250 ml
Buffer RW2*	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
RNase Free Water	1.8 ml	10 ml	60 ml
说明书	1	1	1

HiPure Universal RNA Maxi Kit

产品编号	R4132-01	R4132-02	R4132-03
纯化次数	2 次	10 次	50 次
HiPure RNA Maxi Columns	2	10	50
50ml Collection Tubes	2	10	50
Magzol Reagent	50 ml	220 ml	2 x 550 ml
Buffer RW1	30 ml	120 ml	550 ml
Buffer RW2*	20 ml	50 ml	4 x 100 ml
RNase Free Water	10 ml	30 ml	100 ml
说明书	1	1	1

*: Buffer RW2 使用前须按瓶子标签指示加入无水乙醇进行稀释。

保 质 期

HiPure Universal RNA Kits 除 Magzol Reagent 外，其它组分可在室温下(15-25℃)干燥保存 18 个月。长期保存时需置于 2-8℃。Magzol Reagent 需保存于 2-8℃。因 RNase Free Water 中不含任何抑菌因子，室温放置或操作时可能会引入细菌或真菌污染。我们推荐分装 RNase Free Water 并保存于-20℃，以减少污染。若 RNase Free Water 被微生物污染，请另外订购或按以下方法重新配制。

组 成

HiPure Universal RNA 96 Kit

产品编号	R4133-01	R4133-02	R4133-03
纯化次数	1 x 96	4 x 96	20 x 96
HiPure RNA Plate	1	4	20
2ml Collection Plate	1	4	20
Magzol Reagent	90 ml	350 ml	6 x 270 ml
Buffer RW1	60 ml	250 ml	3 x 550 ml
Buffer RW2*	50 ml	3 x 50 ml	4 x 100 ml
RNase Free Water	30 ml	120 ml	250 ml
说明书	1	1	1

*: Buffer RW2 使用前须按瓶子标签指示加入无水乙醇进行稀释。

保 质 期

HiPure Universal RNA Kits 除 Magzol Reagent 外，其它组分可在室温下(15-25℃)干燥保存 12 个月。长期保存时需置于 2-8℃。Magzol Reagent 需保存于 2-8℃。因 RNase Free Water 中不含任何抑菌因子，室温放置或操作时可能会引入细菌或真菌污染。我们推荐分装 RNase Free Water 并保存于-20℃，以减少污染。若 RNase Free Water 被微生物污染，请另外订购或按以下方法重新配制。

需要准备材料和工具

- 70%乙醇(RNase Free Water 配制)
- 低温高速离心机(12,000xg)
- 室温桶状离心机(3,000-5,000xg)
- RNase-Free 的 15ml 离心管或 50ml 离心管
- RNase-Free 的高速 8-50ml 离心管
- RNase-Free 枪头
- 手套
- 氯仿
- 匀浆工具
- 按瓶子标签所示用无水乙醇稀释 Buffer RW2，并于室温保存。
- (可选) 真空抽滤装置

方案 1. 总 RNA 中量抽提离心方案(R4131)

该方案采用 RNA 中量结合柱和离心操作方案，适合于从小于 500mg 的生物样品中提取高达 1mg 总 RNA。

1. 按下列方法对样品进行匀浆和裂解:

- **动物组织:** 称取 200-500mg 动物组织到 5ml 高速离心管中，加入 6ml MagZol Reagent，立即用机器匀浆器进行充分匀浆。动物组织样品也可以用液氮进行研磨(参照植物处理方法)或其它匀浆方法进行匀浆。

注: 动物组织 RNA 含量差异较大，初次使用时推荐用量 300mg。得到理想结果后，再提高组织用量。处理 RNA 含量低的组织样品如皮肤，肌肉、脂肪和脑组织，组织用量可扩大至 600mg。

- **植物/真菌组织:** 用液氮将植物/真菌样品磨成细小的粉末。称取 500mg 粉末至装有 6ml MagZol Reagent 的 15ml 高速离心管中，立即于最高速度涡旋 30-60 秒打散样品。

- **贴壁细胞($<1 \times 10^8$):** 彻底去除培养液，加入 6ml MagZol Reagent 至培养瓶中。用移液枪吹打 5-10 次，让细胞充分裂解。把裂解液转移至 15ml 高速离心管中，再用注射器抽打 5-10 次或用机械匀浆器匀浆 30 秒。

- **悬浮细胞($<1 \times 10^8$):** 500xg 离心收集细胞，去除培养液。涡旋松散细胞团。加入 6ml MagZol Reagent，涡旋混匀。把裂解液转移至 15ml 高速离心管中，用注射器抽打 5-10 次或用机械匀浆器匀浆 30 秒。

- **细菌:** 离心收集 $<1 \times 10^{10}$ 细菌。倒弃培养液，用 0.5ml Buffer TE/lysozyme 重悬细菌，37°C 水浴 10-30 分钟。加入 6ml MagZol Reagent 至细菌重悬液中。用注射器抽打 5-10 次或用机械匀浆器匀浆 30 秒。

2. 室温放置 5-10 分钟充分裂解样品。

3. (可选) 4°C, 12,000 x g 离心 10 分钟。转移上清液至新的高速离心管中。

注: 处理培养细胞和细菌样品可以省略这一步。处理富含蛋白质组织、难裂解组织样本、富含脂肪类的样品以及植物真菌样品时，不能省略这一步。处理富含脂肪的样本，离心后还会在溶液表面存在一层油脂层，转移上清液时尽量不要吸取到油脂层。

4. 加入 1.2ml 氯仿至裂解液中盖紧盖子。用手剧烈振荡 20 秒，冰上放置 10 分钟。

注:用涡旋取代振荡会带来更多的基因组 DNA 污染。氯仿必须按比例加入(每 1ml MagZol Reagent 加入 200 μ l 氯仿)。过多的氯仿会迫使 DNA 和蛋白质回到水相中,导致 RNA 的纯度下降。由于氯仿挥发性强,毒性较大,可用 500 μ l BCP(1-Bromo-2 chloropropane)代替。

5. 4°C, 12,000 x g 离心 15 分钟。

注:离心后会形成三相体系。上层为水相层含有 RNA,而 DNA 和蛋白质位于有机层(下层)和中间层。中间层的多少取决于样本类型,有些样品的中间层非常少。

6. 转移上清液至新的离心管中。**加入等倍体积 70%乙醇,涡旋混匀 30 秒。**

注:转移上清液时,必须小心转移,不要吸到中间层。推荐只转移~80%的上清液。

以下离心条件均在室温下进行(15-25°C)!

7. 把 HiPure RNA Midi Column 装在 15ml 收集管中。**转移一半体积的混合液至柱子中。**5,000rpm 离心 3 分钟。

8. 倒弃滤液把柱子装回收集管。转移剩余混合液至柱子中。5,000rpm 离心 3 分钟。

9. 倒弃滤液把柱子装回收集管。**加入 3ml Buffer RW1 至柱子中。**5,000rpm 离心 3 分钟。

10. 倒弃滤液把柱子装回收集管。**加入 3ml Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。**5,000rpm 离心 3 分钟。

注:Buffer RW2 在使用之前,必须按说明书或瓶子标签所示用无水乙醇进行稀释。

11. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。**加入 3ml Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。**5,000rpm 离心 3 分钟。

12. 倒弃滤液把柱子装回收集管。5,000rpm 离心 15 分钟以甩干柱子的基质。

13. 将柱子转移至新的 15ml 离心管中。**加入 400-600 μ l RNase Free Water 至柱子的膜中央。**室温放置 3 分钟。5,000 rpm 离心 5 分钟。

14. **再加入 400-600 μ l RNase Free Water 至柱子的膜中央。**室温放置 3 分钟。5,000rpm 离心 5 分钟。

15. 丢弃 RNA 结合柱,把 RNA 保存于-80°C。

方案 2. 总 RNA 中量抽提负压抽滤方案(R4131)

该方案采用 RNA 中量结合柱和负压抽滤方案，适合于从小于 500mg 的生物样品中提取高达 1mg 总 RNA。

1. 按方案 1 的第 1-6 步进行操作。
2. 连接好真空泵和抽滤盒，把 HiPure RNA Midi Column 插到抽滤盒的接口处。
3. **把第 6 步获得的混合液转移至柱子中。**打开真空泵进行抽滤，继续转移混合液至柱子中，直至所有的上清液都从柱子过滤完毕。
4. 当溶液过滤完毕后，**加入 3ml Buffer RW1 至柱子中。**
5. 当溶液过滤完毕后，**加入 3ml Buffer RW2 (已用无水乙醇稀释)至柱子中。**
注：在开始使用 Buffer RW2 之前，必须按瓶子标签所示用无水乙醇稀释。
6. 当溶液过滤完毕后，**加入 3ml Buffer RW2 (已用无水乙醇稀释)至柱子中。**
7. 当溶液过滤完毕后，不要关闭真空泵，继续以最大的压力抽滤 15 分钟以干燥柱子，去除乙醇。
8. 取下柱子并装到新的 15ml 离心管中(自备)。**加入 400-600 μ l RNase Free Water 至柱子的膜中央。**室温放置 5 分钟。5,000rpm 离心 3 分钟。
9. **再加入 400-600 μ l RNase Free Water 至柱子的膜中央。**室温放置 3 分钟。5,000rpm 离心 3 分钟。
10. 丢弃 RNA 结合柱，把 RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。

方案 3. 总 RNA 大量抽提离心方案(R4132)

该方案采用 RNA 大量结合柱和离心操作方案，适合于从小于 2g 的生物样品中提取高达 5mg 总 RNA。

1. 按下列方法对样品进行匀浆和裂解:

- **动物组织:** 称取 1-2g 动物组织到 50ml 高速离心管中,加入 20ml MagZol Reagent, 立即用机器匀浆器进行充分匀浆。动物组织样品也可以用液氮进行研磨(参照植物处理方法)或其它匀浆方法进行匀浆。
注:动物组织中 RNA 含量差异较大,初次使用时,推荐使用 1g 组织。得到理想结果后,再提高组织用量。处理 RNA 含量低的组织样品如皮肤,肌肉、脂肪和脑组织,组织用量可扩大至 2g。
- **植物/真菌组织:** 用液氮将植物/真菌样品磨成细小的粉末。称取 2g 粉末至装有 20ml MagZol Reagent 的 50ml 高速离心管中。立即于最高速度涡旋 1-2 分钟打散样品。
- **贴壁细胞($<5 \times 10^8$):** 彻底去除培养液,加入 20ml MagZol Reagent 至培养瓶中。用移液枪吹打 5-10 次,让细胞充分裂解。把裂解液转移至 50ml 高速离心管中,再用注射器抽打 10-15 次或用机械匀浆器匀浆 30 秒。
- **悬浮细胞($<5 \times 10^8$):** 500xg 离心收集细胞,去除培养液。涡旋松散细胞团。加入 20ml MagZol Reagent,涡旋混匀。把裂解液转移至 50ml 高速离心管中,用注射器抽打 10-15 次或用机械匀浆器匀浆 30 秒。
- **细菌:** 离心收集 5×10^{10} 细菌,倒弃培养液。用 2ml Buffer TE/lysozyme 重悬细菌。37°C 水浴 10-30 分钟。加入 20ml MagZol Reagent 至细菌重悬液中。用注射器抽打 10-15 次或用机械匀浆器匀浆 30 秒。

2. 室温放置 5-10 分钟充分裂解样品。

3. (可选) 4°C, 12,000 x g 离心 10 分钟。转移上清液至新的高速离心管中。

注:处理培养细胞和细菌样品可以省略这一步。处理富含蛋白质组织、难裂解组织样本、富含脂肪类的样品以及植物真菌样品时,不能省略这一步。处理富含脂肪的样本,离心后还会在溶液表面存在一层油脂层,转移上清液时尽量不要吸取到油脂层。

4. 加入 4ml 氯仿至裂解液中,盖紧盖子。用手剧烈振荡 20 秒,冰上放置 10 分钟。

注:用涡旋取代振荡会带来更多的基因组 DNA 污染。氯仿必须按比例加入(每 1ml MagZol Reagent 加入 200 μ l 氯仿)。过多的氯仿会迫使 DNA 和蛋白质回到水相中,导致 RNA 的纯度下降。由于氯仿挥发性强,毒性较大,可用 500 μ l BCP(1-Bromo-2 chloropropane)代替。

5. 4°C, 12,000 x g 离心 15 分钟。

注:离心后会形成三相体系。上层为水相层含有 RNA,而 DNA 和蛋白质位于有机层(下层)和中间层。中间层的多少取决于样本类型,有些样品的中间层非常少。

6. 转移上清液至新的离心管中。**加入等倍体积 70%乙醇,涡旋混匀 30 秒。**

注:转移上清液时,必须小心转移,不要吸到中间层。推荐只转移~80%的上清液。

以下离心条件均在室温下进行(15-25°C)!

7. 把 HiPure RNA Maxi Column 装在 50ml 收集管中。**转移一半体积的混合液至柱子中。**5,000rpm 离心 3 分钟。

8. 倒弃滤液把柱子装回收集管。把剩余的混合液转移至柱子中。5,000rpm 离心 3 分钟。

9. 倒弃滤液把柱子装回收集管。**加入 10ml Buffer RW1 至柱子中。**5,000rpm 离心 3 分钟。

10. 倒弃滤液把柱子装回收集管。**加入 15ml Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。**5,000rpm 离心 3 分钟。

注:Buffer RW2 在使用之前,必须按说明书或瓶子标签所示用无水乙醇进行稀释。

11. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。**加入 15ml Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。**5,000rpm 离心 3 分钟。

12. 倒弃滤液把柱子装回收集管。5,000rpm 离心 15 分钟以甩干柱子的基质。

13. 将柱子转移至新的 50ml 离心管(自备)中。**加入 1-2ml RNase Free Water 至柱子的膜中央。**室温放置 5 分钟。5,000 rpm 离心 5 分钟。

14. **再加入 1-2ml RNase Free Water 至柱子的膜中央。**室温放置 5 分钟。5,000rpm 离心 5 分钟。

15. 丢弃 RNA 结合柱,把 RNA 保存于-80°C。

方案 4: 总 RNA 大量抽提负压抽滤方案(R4132)

该方案采用负压抽滤方法。

1. 按方案 3 的第 1-6 步进行操作。
2. 连接好真空泵和抽滤盒, 把 HiPure RNA Maxi Column 插到抽滤盒的接口处。
3. **把第 6 步获得的混合液转移至柱子中。** 打开真空泵进行抽滤, 继续转移混合液至柱子中, 直至所有的上清液都从柱子过滤完毕。
4. 当溶液过滤完毕后, **加入 10ml Buffer RW1 至柱子中。**
5. 当溶液过滤完毕后, **加入 15ml Buffer RW2 (已用无水乙醇稀释)至柱子中。**
注: 在开始使用 Buffer RW2 之前, 必须按瓶子标签所示用无水乙醇稀释。
6. 当溶液过滤完毕后, **加入 15ml Buffer RW2 (已用无水乙醇稀释)至柱子中。**
7. 当溶液过滤完毕后, **加入 5ml 无水乙醇稀释至柱子中。**
8. 当溶液过滤完毕后, 不要关闭真空泵, 继续以最大的压力抽滤 15 分钟以干燥柱子, 去除乙醇。
9. 将柱子转移至新的 50ml 离心管中。**加入 1-2ml RNase Free Water 至柱子的膜中央。** 室温放置 5 分钟。5,000 rpm 离心 5 分钟。
10. **再加入 1-2ml RNase Free Water 至柱子的膜中央。** 室温放置 5 分钟。5,000rpm 离心 5 分钟。
11. 丢弃 RNA 结合柱, 把 RNA 保存于-80℃。

方案 5. 总 RNA 的 96 孔板离心方案(R4133)

该方案采用 96 孔 RNA 结合板和离心操作方案，可高通量从 <50mg 动物或植物组织中提取高达 100 μ g 总 RNA。

1. 组织用量

合适的组织用量是 RNA 产量和纯度的保证。试剂盒的组织用量可低至 0.01mg，但最大的组织用量却取决于样品中 RNA 的含量，蛋白质和杂质的含量。

- 动物脑组织，脂肪组织，RNA 含量较低，组织最大用量可达至 50mg；
- 动物肝脏，脾脏，肾脏，胸腺等含有丰富的 RNA，组织用量不要超过 20mg；
- 其它组织，如心脏，肌肉，皮肤含有中丰度的 RNA，组织用量不要超过 50mg；
- 植物样品中代谢物质含量差别很大，初次用量为 50mg。

2. 组织的裂解和匀浆[高通量匀浆]:

2.1 在 1.2ml 96 孔板或 1.5ml 离心管中，每孔加入 1 颗 5mm 钢珠。

2.2 (可选)把 96 孔板或离心管转移至干冰或液氮中预冷。转移至冰上放置。

2.3 把样品从保护剂或低温中取出，称取适量的样品至 96 孔板或离心管中。

2.4 加入 0.75ml Magzol Reagent 至样品。用盖子盖好 96 孔板或离心管。

2.5 转移至珠磨仪上匀浆样品。按珠磨仪说明进行操作。

2.6 室温放置 5-10 分钟让组织充分裂解。

2.7 短暂离心收集管盖上的液滴。

3. 打开管盖。加入 150 μ l 氯仿至裂解液中，盖紧盖子。用手剧烈振荡 20 秒，静置 3 分钟。

4. 4 $^{\circ}$ C, 5,000 \times g 离心 15 分钟；(处理小离心管中，离心速度设为 12,000 \times g。)

5. 小心转移上清液至 96 孔收集板中。

6. 加入等倍体积 70%乙醇至上清液中。吸打 5 次或振荡混匀 30 秒。

注：振荡混匀时，设定好振荡速度让样品充分混匀。

7. 把 HiPure RNA Plate 放在 2ml 收集板上。转移混合液至 RNA 结合板中。3,000 \times g 离心 3 分钟。

8. 倒弃滤液，把结合板放回收集板中。每孔加入 0.7ml Buffer RW1。3,000 \times g 离

心 3 分钟。

9. 倒弃滤液，把结合板放回收集板中。**每孔加入 0.7ml Buffer RW2(已用无水乙醇稀释)**。3,000 × g 离心 3 分钟。
注：Buffer RW2 在使用之前，必须按说明书或瓶子标签所示用无水乙醇进行稀释。
10. 倒弃滤液，把结合板放回收集板中。**每孔加入 0.7ml Buffer RW2(已用无水乙醇稀释)**。3,000 × g 离心 3 分钟。
11. 倒弃滤液，把结合板放回收集板中。3,000 × g 离心 15 分钟甩干 RNA 结合板。
12. 把结合板放在 1.2ml 收集板中。加入 75-100µl RNase Free Water 至每一个孔中膜中央。室温静置 3 分钟。3,000 × g 离心 3 分钟。
13. (可选) 再加入 50-75µl RNase Free Water 至每一个孔中膜中央。室温静置 3 分钟。3,000 × g 离心 3 分钟。
14. 弃去 RNA 结合板。用盖子盖好 96 孔板。把 RNA 保存于-80°C。

方案 6. 总 RNA 的 96 孔板负压抽滤方案(R4133)

该方案采用 96 孔 RNA 结合板和负压抽滤方案，可高通量从<50mg 动物或植物组织中提取高达 100 μ g 总 RNA。

1. 按方案 5 的第 1-6 步进行操作；
2. 把废液盒放在 96 孔板抽滤盒的底部的内槽中。
3. 盖上抽滤盒的上盖，把 HiPure RNA Plate 放在上盖的内槽中。连接好真空泵和抽滤盒。
4. **把第 6 步获得的混合液转移至 RNA 结合板中。**打开真空泵，抽滤 3 分钟。
5. 关闭真空泵，当压力降至零度时。**每孔中加入 700 μ l Buffer RW1。**打开真空泵，抽滤 3 分钟。
6. 关闭真空泵，当压力降至零度时。**每孔中加入 700 μ l Buffer RW2(已用无水乙醇稀释)。**打开真空泵，抽滤 3 分钟。
7. 关闭真空泵，当压力降至零度时。**每孔中加入 700 μ l Buffer RW2(已用无水乙醇稀释)。**打开真空泵，抽滤 3 分钟。
8. 关闭真空泵，当压力降至零度时。**每孔中加入 500 μ l 无水乙醇。**打开真空泵，抽滤 3 分钟。
9. 关闭真空泵，当压力降至零度时，取下 RNA 结合板，在一叠吸水纸上用力垂直拍打 5-10 次。
10. 把结合板放回抽滤盒中。打开真空泵，最大压力抽滤 15 分钟干燥结合板。
11. 关闭真空泵。取下抽滤盒上盖。把废液槽的废液倒弃。把 1.2ml 收集板放在抽滤盒中。盖好上盖。调整结合板的位置，使其底部的出口插到 1.2ml 收集板中。
12. 加入 100 μ l DEPC 处理水至 RNA 结合板的膜中央。室温静置 5 分钟。打开真空泵抽滤 3 分钟。
13. 弃去 RNA 结合板。用盖子盖好 96 孔板。把 RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。

常见问题回答

该列表可能有利于解决您在提取过程中所碰到的问题。Magen 的技术人员也可以随时为您提供咨询服务，若您对试剂盒存在疑问或有良好的建议，又或者您在分子生物学实验中碰到问题，都请您联系我们。我们将竭尽所能为您排忧解难。

现象	原因及解决方法
离心后分层现象不明显	
没有加入氯仿或氯仿不纯	确保加入的氯仿，使用的氯仿不要含有异戊醇或其它添加成分。
加入氯仿后混匀效果不好	加入氯仿后，一定要剧烈振荡混匀 15 秒。不充分的混匀会导致分离不明显或大量的 DNA 污染。如果离心后分离不明显，重复振荡和静置，然后再离心。
样品中含有机溶剂	若样品含有有机溶剂如 DMSO，乙醇，强碱试剂，会影响分层。
柱子堵塞	
样品起始用量太多	减少样品用量。正确的样品用量是获得理想结果的必要条件；
低温离心	试剂盒中除特别指明，所有的离心操作都必须在室温（20-25℃）。离心条件低于 20℃ 时，可能会导致沉淀的形成而引起柱子堵塞。设定离心机的温度为（20-25℃）。
RNA 产量低	
样品不充分匀浆	处理培养细胞时，用注射器抽打裂解液 3-5 次进行匀浆。 处理动物组织时，推荐使用机器匀浆器匀浆。
样品起始用量太多	参照上面
RNA 的洗脱效率低	RNase Free Water 没有加到膜上，或洗脱体积不够。再加入 30-50 μ l RNase Free Water 到膜上，室温静置 2 分钟，然后离心洗脱 RNA。
培养液没有彻底去除	从细胞中提取 RNA 时，要把培养液彻底吸弃。
RNA 降解	
组织/细胞用量太多	减少样品用量。正确的样品用量是获得理想结果的必要条件。
RNA 酶污染	操作过程引入 RNA 酶的污染
DNA 污染	

没有进行 DNase I 消化

不要省略 DNASE I 膜上消化步骤,确保 DNase I 消化液全部加到膜中央。

氯仿抽提振荡不够

加入氯仿后,盖紧盖子。然后用手剧烈上下振荡 15 秒。不要用涡旋或颠倒混匀。

下游实验结果不理想

盐分污染

加入 Buffer RW2 后,静置 5 分钟后,再离心

乙醇污染

确保空柱离心速度和离心时间均严格按照说明书中所示。如仍然有乙醇残留,可能是室温较低所致,可延长离心时间。

膜材料脱落

硅胶膜在离心过程中可能会发生脱落。脱落到质粒中硅胶膜是不溶解的,可能过 12,000xg 离心 2 分钟去除。

若以上的解答还是无法解决您的问题,请您联系我们。