



# Cell Total RNA Isolation Kit

Cat.No.RE-03111/03113

For total RNA purification from cultured cells  
 $10^4 \leq$  Cultured Cells  $\leq 10^6$  (96/24/12/6-well plates)

For research use only

Store at room temperature



## 目 录

产品介绍	3
产品特点	3
RNA 的应用	4
RNA 的储存	4
产品质量控制	4
试剂盒内容	5
产品信息	5
储存条件	5
试剂盒组分信息	6
RNA-Only Column 特性	6
DNA-Cleaning Column 特性	6
RNA 提取得率与纯度	7
RNA 完整性	7
RNA 的 RT-qPCR 图谱	8
注意事项	9
操作前准备事项	10
实验材料和设备	10
自备试剂	10
安全性	10
操作指南	11
材料取用说明	12
预防样本间交叉污染	12
RNA 污染预防	12
● 操作步骤	13
RNA 浓度及纯度检测	15
快速操作示意图	16
问题分析指南	17

## 产品介绍

该试剂盒采用本公司研制的离心柱和配方，可以高效率的从 96、24、12、6 孔板培养细胞中提取得到高纯度高质量的总 RNA。试剂盒提供高效的 DNA-Cleaning Column，能轻松的让上清液和细胞裂解物分离并吸附除去基因组 DNA，操作简便、省时；该 RNA-Only Column 能高效的结合 RNA，搭配独特的配方，可以同时处理大量样品。

全体系 RNase-Free，使得提取的 RNA 无降解；Buffer RW1、Buffer RW2 缓冲液洗涤体系，使得获得的 RNA 纯度极高。

## 产品特点

- ◆ 全程常温(15-25°C)操作，**无需冰浴和低温离心**。
- ◆ 整套试剂盒全 RNase-Free，无需担心 RNA 降解。
- ◆ DNA-Cleaning Column 特异结合 DNA，使得试剂盒无需额外添加 DNase 即可去除基因组 DNA 污染。
- ◆ RNA 得率高：RNA-Only Column 和独特配方搭配能高效的纯化 RNA。
- ◆ 速度快：操作简便，可在 11 分钟内完成
- ◆ 安全：无需有机试剂抽提。
- ◆ 质量高：提取得到的 RNA 纯度高，没有蛋白和其他杂质污染，能够满足后续各种实验。

## 试剂盒应用

适用于从 96、24、12、6 孔板培养细胞总 RNA 提取纯化。

## RNA 的应用

培养细胞总 RNA 提取试剂盒提取得到的总 RNA 可用于各种下游分子实验,例如:cDNA 合成, RT-PCR、Real Time PCR、Northern Blot、Dot Blot、体外翻译、芯片分析、PolyA 筛选、分子克隆和 RNase 保护分析等。

## RNA 的储存

建议使用 RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 洗脱 RNA, 即时用于下游实验或储存于-80°C。在-80°C 存储条件下, RNA 可保存一年。

## 产品质量控制

按照凡晶生物试剂盒质量检测体系标准(FOREGENE's Total Quality Management System), 每一批次的培养细胞总 RNA 提取试剂盒都严格进行多次测试, 确保每一批次试剂盒质量的可靠性和稳定性。

## 试剂盒内容

Cell Total RNA Isolation Kit 培养细胞总 RNA 提取试剂盒		
试剂盒组成	RE-03111	RE-03113
	50 T	200 T
Buffer cRL1*	25 mL	100 mL
Buffer cRL2	15 mL	60 mL
Buffer RW1*	25 mL	100 mL
Buffer RW2	24 mL	96 mL
RNase-Free ddH <sub>2</sub> O	10 mL	40 mL
RNA-only Column	50 套	200 套
DNA-Cleaning Column	50 套	200 套
说明书	1 份	1 份

\*: Buffer cRL1、Buffer RW1中含有具刺激性的离液盐，操作时请注意戴上手套和进行相关防护措施。

## 产品信息

型号	离心柱型	纯化组件	Foregene 离心柱、试剂
通量	1-24 个样品	制备时间	~11 min (24 个样品)
离心机	台式离心机	细胞裂解物分离	离心分离
纯化柱 RNA 承载量	60 µg	离心柱液体盛装量	800 µL
最小洗脱体积	20 µL	细胞样本处理量	10 <sup>4</sup> -10 <sup>6</sup> cells

## 储存条件

本试剂盒在常温(15–25°C)干燥条件下，可保存 24 个月；如需保存更长时间可置于 2–8°C。Buffer cRL1 在加入β-巯基乙醇(可选择不加)后可在 4°C放置 1 个月(建议现做现添加)。

注意：若低温保存，溶液容易产生沉淀。在使用前务必将试剂盒内的溶液在室温中放置一段时间，必要时可在 37°C水浴中预热 10 分钟，以溶解沉淀，混匀后再使用。

## 试剂盒组分信息

- ◆ Buffer cRL1: 提供细胞裂解所需的环境。
- ◆ Buffer cRL2: 提供 RNA 的特异上柱环境。
- ◆ Buffer RW1: 去除 RNA 中的蛋白质、DNA 等杂质。
- ◆ Buffer RW2: 去除 RNA 中残留的盐离子。
- ◆ RNase-Free ddH<sub>2</sub>O: 洗脱纯化柱膜上的总 RNA。
- ◆ DNA-Cleaning Column: 特异吸附细胞裂解产物中的 DNA, 并过滤除去裂解产物中的固体杂质。
- ◆ RNA-Only Column: 特异吸附上通过 DNA-Cleaning Column 滤液中的总 RNA。

## DNA-Cleaning Column 特性

原理( Mechanism)	特异吸附DNA
功能(Function)	去除DNA污染, 过滤分离裂解物
裂解物最大载量体积(Maximum loading volume)	800 $\mu$ L

## RNA-Only Column 特性

RNA最大结合能力(Maximum binding capacity)	60 $\mu$ g
上清最大载量体积(Maximum loading volume)	800 $\mu$ L
RNA片段大小分布(RNA size distribution)	RNA $\geq$ 200 nt
最小洗脱体积(Minimum elution volume) 1*	20 $\mu$ L
最佳样本选取(Selection of samples)	Cultured cell
样本最大初始量(Maximum amount of starting material) 2*	10 <sup>6</sup> cells

1\*: 20  $\mu$ L 的最小洗脱体系是在细胞量较少时, 兼顾 RNA 回收率及浓度给出的比较合理的建议体积。如果为了提高 RNA 的产量, 可以适当增加洗脱液体积, 比如采用 30-50  $\mu$ L 的洗脱体系, 以期得到更多量的 RNA。

2\*: 更大的样本量, 请使用动物组织/细胞总 RNA 提取试剂盒(Animal Total RNA Isolation Kit) 进行 RNA 纯化。

## RNA 提取得率与纯度

使用 Cell Total RNA Isolation Kit 纯化得到的 RNA，其产量与细胞初始量、新鲜程度、细胞保存时间以及操作相关。以下是使用该试剂盒提取 RNA，几种培养细胞 RNA 得率与纯度，实际操作中，可能与该数据有些许出入。

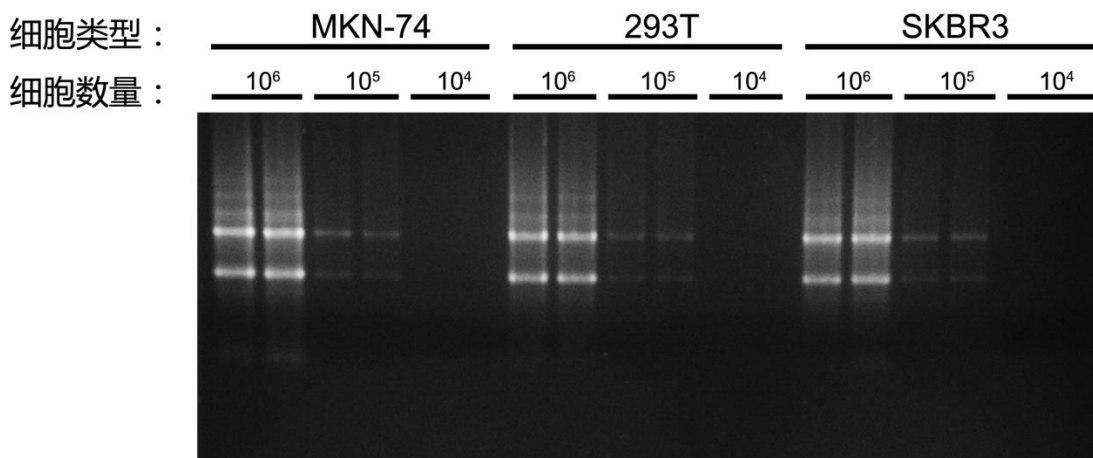
细胞类型	RNA 得率( $10^6$ )	OD260/280	OD260/230
MKN-74	15-20 $\mu$ g	1.8-2.1	1.8-2.1
293T	14-18 $\mu$ g	1.8-2.1	1.8-2.1
SKBR3	15-20 $\mu$ g	1.8-2.1	1.8-2.1

注：硅胶膜会吸附少量的液体，洗脱后所得的 RNA 产物体积会有所偏差。

## RNA 的完整性

RNA 的质量可以通过变性琼脂糖凝胶电泳，溴化乙锭染色之后在紫外光下分析。在凝胶上，核糖体 RNA 的带型应明显并清晰。如果任何泳道的核糖体 RNA 或者特定的样品条带显示不明显、不清晰，弥散成小片段 RNA 或者消失，则可能是样本在处理之前已经发生 RNA 降解或者在纯化过程中造成了 RNA 降解。

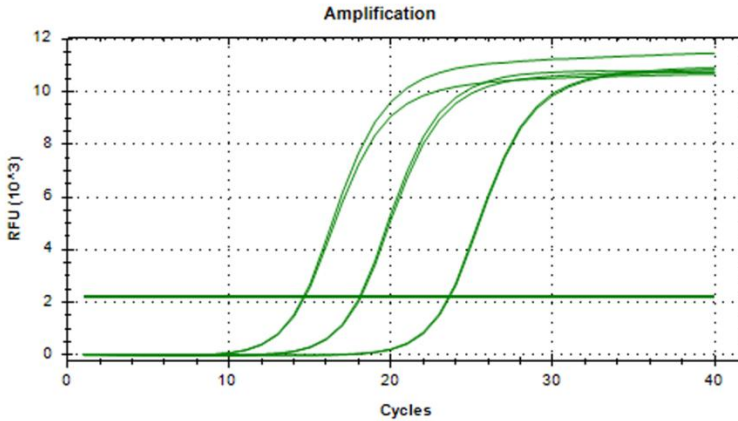
下图为凡晶生物培养细胞总 RNA 提取试剂盒处理不同数量的细胞样本，获得的 RNA 电泳图。



Cell Total RNA Isolation Kit处理上述不同数量的细胞，20 $\mu$ l体积洗脱，取2 $\mu$ l纯化的总RNA 1%琼脂糖凝胶电泳图谱

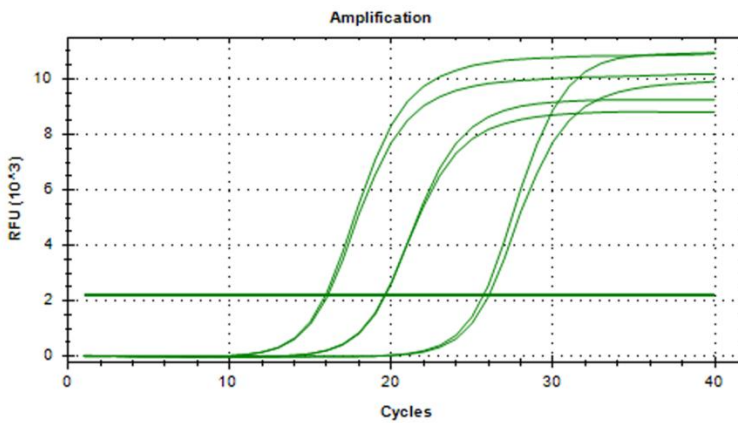
## RNA 的 RT-qPCR 图谱

培养细胞总 RNA 提取试剂盒提总 RNA 的质量及稳定性可以通过 RT-qPCR 分析。下图为凡晶生物培养细胞总 RNA 提取试剂盒提取不同细胞的总 RNA，反转录之后，检测基因 A 的 qPCR 图谱。



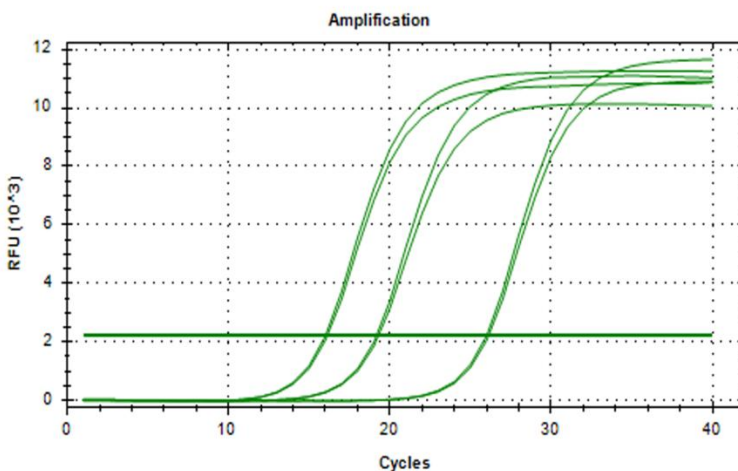
细胞类型：MKN-74

细胞数量：10<sup>6</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>4</sup>



细胞类型：293T

细胞数量：10<sup>6</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>4</sup>



细胞类型：SKBR3

细胞数量：10<sup>6</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>4</sup>



**注意事项：**（请务必在使用试剂盒前仔细阅读注意事项）

- ◆ 所有实验步骤均在常温(15-25°C)进行(包括离心)，**切勿使用冰浴和低温(4°C)离心。**
- ◆ 样品应避免反复冻融，否则会导致提取的 RNA 降解且提取量也会下降。
- ◆ 如提取的 RNA 用于克隆全长 cDNA，每 1 mL Buffer cRL1 加入 10  $\mu$ L  $\beta$ -巯基乙醇，**建议现配现用**，Buffer cRL1 在加入 $\beta$ -巯基乙醇后可在 4°C 放置 1 个月。如提取的 RNA 仅用于 qPCR 或测序分析等其他下游操作，可以选择不加 $\beta$ -巯基乙醇，不会影响提取效果。
- ◆ 试剂盒使用前，请在 Buffer cRL2 中添加无水乙醇，加入量请参照试剂瓶上标签。不同规格的试剂盒无水乙醇的添加量见下表：

产品规格	无水乙醇添加量
RE-03111	30 mL
RE-03113	120 mL

- ◆ 试剂盒使用前，请在 Buffer RW2 中添加无水乙醇，加入量请参照试剂瓶上标签。不同规格的试剂盒无水乙醇的添加量见下表：

产品规格	无水乙醇添加量
RE-03111	60 mL
RE-03113	240 mL

- ◆ RNA 产率和质量与细胞样本用量和洗脱体积有关，建议每 250  $\mu$ L Buffer cRL1 使用细胞的量不超过  $10^6$ 。
- ◆ 洗脱体积：洗脱液体积不应少于 20  $\mu$ L，否则会影响 RNA 回收效率。
- ◆ 请检查试剂盒中的 Buffer cRL1 和 Buffer RW1 是否有晶体析出现象，若低温存放后有晶体析出，可将 Buffer 放置于室温或 37°C 一段时间，将晶体溶解后混匀再使用。

## 操作前准备事项

使用本试剂盒前，请务必仔细阅读说明书。培养细胞总 RNA 提取试剂盒操作简单、方便、快速，说明书提供了整个试剂盒的正确使用方法。请在使用前准备好必要的实验材料和设备。

## 实验材料和设备

- ◆  $10^4$ - $10^6$  个培养动物细胞。
- ◆ 1.5 mL RNase-Free EP 管。
- ◆ 台式离心机( $\geq 13,400 \times g$ )、移液器等。

## 自备试剂

- ◆ 无水乙醇
- ◆  $\beta$ -巯基乙醇(选用)

## 安全性

- ◆ 本产品仅供科研使用，请勿用于医药、临床医疗、食品及化妆品等用途。
- ◆ 在使用该试剂盒时，请穿戴实验服、一次性乳胶手套、一次性口罩等以保护自身；并最大程度上避免人为引入的 RNase 污染。
- ◆ Buffer cRL1 含有离液盐：变性剂，刺激性。
- ◆ Buffer cRL2 含无水乙醇：易燃。
- ◆ Buffer RW1 含有离液盐：变性剂，刺激性。
- ◆ Buffer RW2 含无水乙醇：易燃。

## 操作指南

请根据自己的样本材料选择相应的裂解方式进行细胞裂解操作。**试剂盒全程常温(15-25°C)操作，切勿冰浴和低温离心。**

### 样本选取和保存

样本的选择及保存很大程度上决定着 RNA 的产量。应尽可能的采用新鲜细胞进行 RNA 提取。

当样本采集之后，RNA 很快会发生降解；如果采集的样本来不及提取 RNA，请尽快妥善保存。我们建议新采集的样本应立即放入液氮中速冻，之后长期保存于-80°C并避免样本的反复冻融；或者将样本立即浸泡在本试剂盒的 Buffer cRL1 溶液中，在室温条件下可保存约 24 h，在 4°C 中保存约 1 周，更长时间保存请存放于-80°C，使用时将溶液在室温或 37°C 溶解即可。为了避免 RNA 的降解，样本的采集与保存应尽可能迅速的进行。

### 样品在 Buffer cRL1 中保存

RNA 在 Buffer cRL1 不会受到 RNase 的降解，如果细胞加入 Buffer cRL1 裂解后如不即时使用，在室温条件下可保存约 24 h，在 4°C 中保存约 1 周，更长时间保存请存放于-80°C，使用时将溶液在室温或 37°C 溶解即可。

### 样本初始用量

正确的样本的初始取用量对于 RNA 的最佳产量及纯度十分必要，样本的最大取用量与下面因素相关：

- ❖ 样本本身的类型以及样本 RNA 的丰度；
- ❖ Buffer cRL1 的用量决定了样本的有效裂解；
- ❖ RNA-Only Column 的 RNA 结合能力。

根据上述因素，参照  $10^6$  细胞样本 RNA 得率表，我们推荐细胞的初始用量不宜超过  $10^6$ 。如果样本用量过多，Buffer cRL1 对细胞裂解不完全，导致纯化获得的 RNA 纯度不高；同时可能会超过 RNA-Only Column 的最大承载量而浪费珍贵样本。

## 细胞裂解

在 Buffer cRL1 条件下，使用移液器反复吹打混匀细胞。样本破碎要彻底，直到见不到细胞团为止，以完全破坏细胞膜及细胞器以释放 RNA，否则将影响 RNA 的产量以及在下步进行裂解物分离操作(见操作步骤第二步骤)容易发生离心柱堵塞。

## 材料取用说明

培养细胞：单次处理，用量请勿超过  $10^6$ 。

## 预防样本间交叉污染

为了避免样本间交叉污染，每次取样后都需要将取样器材的刀口或与样本直接接触的部位浸入 2%次氯酸钠溶液中，反复洗刷数次进行清洗，然后用干净的纸巾擦干残余液体后再进行使用。为了试验方便，也可准备多个取样器材，在使用完后进行统一清洗，确保每一单独样本均使用的是无污染的取样器材。

## RNase 污染预防

- ◆ 人体接触是重要的 RNase 污染源，且部分试剂中可能带有刺激性气味，请在操作过程中经常更换手套，并佩戴一次性口罩。
- ◆ 请使用无 RNase 的枪头和其他塑料制品。
- ◆ RNA 在 Buffer cRL1 中时不会被 RNase 污染，但提取后继续处理过程中应使用不含 RNase 的塑料和玻璃器皿。玻璃器皿可在  $150^{\circ}\text{C}$  烘烤 4 小时，塑料制品可在 0.5 M NaOH 中浸泡 10 分钟，然后用水彻底清洗，高压灭菌，即可去除 RNase。
- ◆ 配制溶液应使用无 RNase 的水(将水加入处理过不含 RNase 的玻璃瓶中，加入 DEPC 至终浓度 0.01%(v/v)，混匀后放置过夜，高压灭菌)。

## 基因组 DNA 污染及清除

培养细胞总 RNA 提取试剂盒主要是为了从动物培养细胞中获得可观的 RNA，并且独特的 DNA-Cleaning Column 可有效的除去体系中大部分 DNA 污染，纯化获得的 RNA 通常无需使用 DNase 处理即可有用于下游操作。某些 RNA 分析实验对痕量 DNA 十分敏

感, 比如: 荧光定量 RT-PCR 分析低丰度基因, 这时可以选用合适的 DNase 进一步清除 DNA 污染。

## 操作步骤(全程常温(15-25°C)操作, 切勿冰浴和低温离心)

使用前请先在 Buffer cRL2 和 Buffer RW2 中加入无水乙醇, 加入体积请参照瓶上的标签。如提取的 RNA 用于克隆全长 cDNA, 每 1 mL Buffer cRL1 加入 10  $\mu$ L  $\beta$ -巯基乙醇。

### 1. 根据不同来源按以下说明进行细胞裂解。

- a 贴壁细胞: 将培养皿倾斜约 30°, 使用移液器或移液管缓慢吸去培养基, 务必彻底吸除干净, 然后加入 Buffer cRL1(加入量见下表)进行消化、裂解(将 Buffer cRL1 完全覆盖培养皿, 倾斜培养皿, 使用移液器将细胞全部吹打下来); 或者使用胰酶消化细胞, 离心收集细胞后参照下表加入 Buffer cRL1(加入量见下表), 用移液器反复吹打混匀(直到看不到细胞团为止)。

注意: 务必将细胞培养皿中的液体彻底吸干净, 否则会很大程度上影响 RNA 的得率和纯度。

- b 悬浮细胞: 直接离心收集细胞, 参照下表加入 Buffer cRL1(加入量见下表), 用移液器反复吹打混匀(直到看不到细胞团为止)。

注意: RNA 在 Buffer cRL1 不会受到 RNase 的污染, 如果细胞在加入 Buffer cRL1 裂解后不即时使用, 在室温条件下可保存约 24h, 在 4°C 中保存约 1 周, 更长时间保存请存放于 -80°C, 使用时将溶液在室温或 37°C 溶解即可。

表: 细胞数量与试剂使用量关系列表

培养器皿	细胞数量	试剂添加量	
		Buffer cRL1	Buffer cRL2
96/48/24/12 孔板	<10 <sup>6</sup>	250 $\mu$ L	400 $\mu$ L
6 孔板/3.5 cm 板	~10 <sup>6</sup>	500 $\mu$ L	800 $\mu$ L
6 cm 或更大的细胞培养板	>10 <sup>6</sup>	建议使用 Animal Total RNA Isolation Kit(RE-03011)或取不超过 10 <sup>6</sup> 细胞使用 Cell Total RNA Isolation Kit (RE-03111)	
细胞培养瓶			

2. 将裂解好的细胞混合液转移至 DNA-Cleaning Column 中(DNA-Cleaning Column 放入收集管中), 12,000 rpm (~13,400  $\times$ g)离心 2 min。移除 DNA-Cleaning Column, 保留收集管内上清液。

注意：如果 DNA-Cleaning Column 收集管底部有沉淀产生，请将上清液转移至干净离心管中再进行步骤 3，切勿将其吸入上清液中。

3. 向上述上清液中加入 **1.6 倍体积 Buffer cRL2**(加入量见上表)(使用前请确认已按照说明加入无水乙醇)，轻柔混匀。

注意：Buffer cRL2 加入量请按照实际操作过程中上清液的体积进行比例换算加入。例如：250  $\mu\text{L}$  上清液中加入 400  $\mu\text{L}$  Buffer cRL2(已加入无水乙醇)。如果混合液出现浑浊或絮状沉淀，请直接进行步骤 4 即可。

4. 将混合液全部转移至 RNA-Only Column 中(纯化柱放入收集管中)，12,000 rpm (~13,400  $\times g$ )离心 1 min，弃掉收集管中的废液。

注意：如果混合液中出现絮状沉淀，请将沉淀一并转移至纯化柱中。若细胞数量为 6 孔板或 3.5 cm 板，请分两次将混合液全部过柱。

5. 向纯化柱中加入 **500  $\mu\text{L}$  Buffer RW1**，12,000 rpm (~13,400  $\times g$ )离心 1 min，弃掉收集管中的废液。

6. 向纯化柱中加入 **700  $\mu\text{L}$  Buffer RW2**(使用前请确认已按照说明加入无水乙醇)，12,000 rpm (~13,400  $\times g$ )离心 1 min，弃掉收集管中的废液。

7. 重复步骤 6。

8. 将纯化柱放回收集管中，12,000 rpm (~13,400  $\times g$ )空管离心 2 min，去掉离心柱中残余的 Buffer RW2。

9. 将纯化柱转移至新的 RNA 收集管中，向纯化柱的膜中央滴加 **20-50  $\mu\text{L}$  已于 65°C 预热的 RNase-Free ddH<sub>2</sub>O**(切勿将洗脱液添加到压圈上，否则会损失较大体积的洗脱液)，室温放置 2 min。12,000 rpm (~13,400  $\times g$ )离心 1 min 收集 RNA 溶液。

注意：硅胶膜会吸附少量的液体，洗脱后所得的 RNA 产物体积会有所偏差。增加洗脱体积可提高 RNA 产量，RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 加入体积不应低于 20  $\mu\text{L}$ ，体积过小会影响洗脱效率。得到的 RNA 溶液可直接用于下游实验或置于 -80°C 保存。由于本试剂盒对 RNA 二级结构保护较好，建议凝胶电泳之前，先将得到的 RNA 溶液置于 72°C 变性处理 5-10 min。

10. 将离心得到的 RNA 溶液重新加至纯化柱中，重复步骤 9(如对 RNA 得率要求不高，可忽略此步骤)。

## RNA 浓度及纯度检测

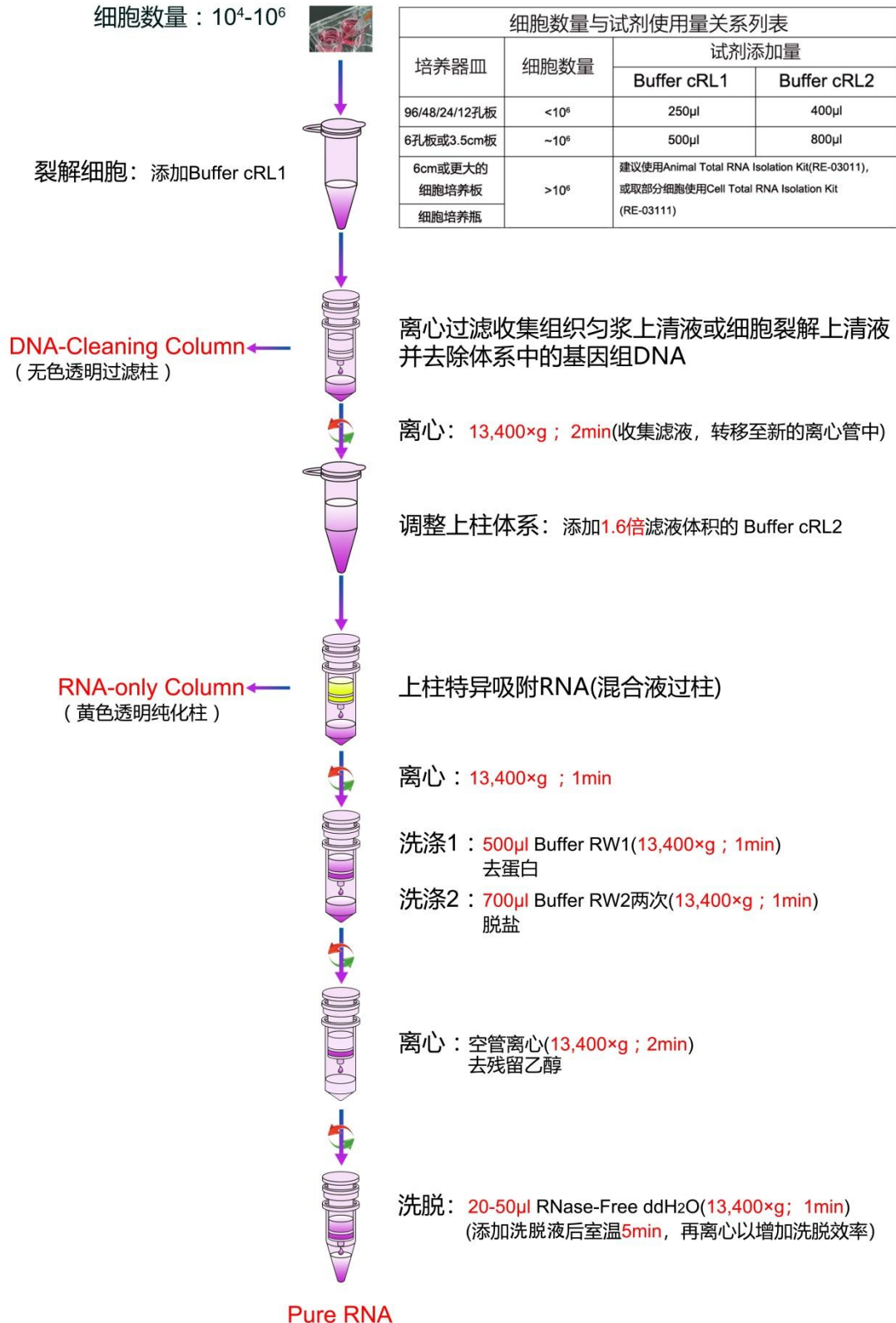
- ◆ 得到的 RNA 的质量与操作过程中的多种因素有关。RNA 可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测浓度与纯度。由于本试剂盒对 RNA 二级结构保护较好，建议凝胶电泳之前，先将得到的 RNA 溶液置于 72°C 变性处理 5-10 min。
- ◆ 用分光光度计测定 RNA 浓度，OD260 值为 1 相当于大约 40 µg/mL 的 RNA。
- ◆ RNA 的 OD260/280 比值通常用作核酸纯度的衡量指标，一般情况下，纯 RNA 的 OD260/280 比值在 1.8-2.1。OD260/280 比值会受测定所用溶液的 pH 值的影响，例如，纯化 RNA 在 pH 7.5 的 10 mM Tris 缓冲液中 OD260/280 读数在 1.9-2.1 之间，而在中性的水溶液中比值会变低，可能只有 1.8-2.0，这并不意味着 RNA 的质量变差。

## DNA 污染及检测

- ◆ 目前没有有效的纯化方法能保证纯化得到的 RNA 中完全没有 DNA 的污染，即便在凝胶电泳时检测不到 DNA 条带，也可能存在微量的 DNA。而 RNA 提取试剂盒能除去 RNA 中的绝大部分 DNA，然而微量的 DNA 依然可能存在于样品中，它的存在量与样本的用量及其本身性质有关。
- ◆ 对于纯化得到的 RNA 中的微量 DNA 的检测，可以通过不经逆转录进行实时荧光定量 PCR 检测。我们建议，可以设计引物，其退火匹配区域位于基因组 DNA 的内含子中。如果 RNA 中不含有任何基因组 DNA，基于这对引物的 PCR 是不会扩增出相应的 PCR 产物。

## 快速操作示意图

96-well/24-well/12-well/6-well





## 问题分析指南

以下针对细胞 RNA 提取中可能遇到的问题进行分析，希望能对您的实验有所帮助。另外，对于在操作说明和问题分析以外的其他实验或技术上的问题，我们设有专门的技术支持帮助您。如有任何需要可联系我们：028-83361257 或 E-mail:

Tech@foregene.com。

### 提取不到 RNA 或者 RNA 产量低

通常会有多种因素影响回收效率，比如：样本 RNA 含量、操作方法、洗脱体积等。

1. 操作过程中进行了冰浴或低温(4°C)离心。

建议：全程常温(15-25°C)操作，切勿冰浴和低温离心。

2. 样本保存不当或样本保存时间过久。

建议：样本保存于-80°C或冻存于液氮中，并避免反复冻融使用；尽量采用新鲜培养的细胞进行 RNA 提取操作。

3. 样本裂解不充分。

建议：在细胞裂解时，请保证细胞完全裂解。

4. 洗脱液添加不正确。

建议：确认 RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 滴加到了纯化柱膜中间位置。

5. Buffer cRL2 或 Buffer RW2 中没有添加正确体积的无水乙醇。

建议：请按照说明书，在试剂盒使用前，Buffer cRL2 和 Buffer RW2 中添加正确体积的无水乙醇并混匀。

6. 细胞样本用量不合适。

建议：每 250 μL Buffer cRL1 最多使用 10<sup>6</sup> 个细胞，细胞量过多会导致 RNA 提取得率及纯度降低。

7. 洗脱体积不合适或洗脱不彻底。

建议：纯化柱的洗脱液体积为 20-50 μL；若洗脱效果并不理想，建议在加入预热的 RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 后，延长室温放置的时间，例如放置 5-10 min。

8. 纯化柱在 Buffer RW2 洗涤之后有乙醇残留。

建议：如果在 Buffer RW2 洗涤，空管离心 1 min 后还有乙醇残留，可以将空管离心操作的时间增加至 2 min，或将纯化柱置于室温 5 min，以充分除去残留乙醇。

## 纯化获得的 RNA 有降解

纯化得到的 RNA 的质量和样本的保存、RNase 污染、操作等因素有关。

### 1. 细胞样本没有及时保存。

建议：细胞在收集后若不及时使用，请立即低温保存于-80℃或者液氮中。提取 RNA 请尽量使用新近采取的细胞样本。

### 2. 细胞样本反复冻融。

建议：样本保存时，最好分成小份保存，使用时取出其中一份即可，避免样本的反复冻融导致 RNA 的降解。

### 3. 操作间有 RNase 引入或没有佩戴一次性手套、口罩等。

建议：RNA 提取实验最好在单独的 RNA 操作间进行，并在实验前清理好实验桌，实验时佩戴一次性手套、口罩，最大程度上避免 RNase 引入导致的 RNA 降解。

### 4. 试剂在使用过程中被 RNase 污染。

建议：更换新的 Cell Total RNA Isolation Kit 进行相关实验。

### 5. RNA 操作时所用的离心管、枪头等有 RNase 污染。

建议：确认 RNA 提取时所用到的离心管、枪头、移液器等都是 RNase-Free。

## 纯化获得的 RNA 影响下游实验

经纯化柱纯化的 RNA，如果盐离子、蛋白质含量过多会影响下游实验，比如：逆转录、Northern Blot 等。

### 1. 洗脱后的 RNA 有盐离子残留。

建议：确认 Buffer RW2 中添加了正确体积的乙醇，并按操作说明的离心转速进行 2 次纯化柱洗涤；如果还有盐离子残留，可在纯化柱加入 Buffer RW2 后，室温放置 5 min，再进行离心操作，以最大程度上去除盐离子污染。

### 2. 洗脱后的 RNA 有乙醇残留。

建议：确认 Buffer RW2 洗涤后，按操作说明的离心转速进行空管离心操作；如果还有乙醇残留，可以将空管离心操作的时间增加至 2 min，或者在空管离心后在室温放置 5 min，以最大程度上去除乙醇残留。

中国·凡晶      World's Foregene

成都凡晶生物技术有限公司

电话：028-83360257, 028-83361257

E-mail: [info@foregene.com](mailto:info@foregene.com)

[Http://www.foregene.com](http://www.foregene.com)

