

目 录

| | |
|----------------------------------|----|
| 简 介----- | 2 |
| 原 理----- | 2 |
| 试剂盒组成----- | 3 |
| 保质期----- | 3 |
| 准备工作----- | 4 |
| 样品的匀浆及打散----- | 5 |
| 方案 1:细胞总 RNA、DNA 和蛋白质提取方案----- | 6 |
| 方案 2:动物组织总 RNA、DNA 和蛋白质提取方案----- | 9 |
| 方案 3:植物真菌总 RNA、DNA 和蛋白质提取方案----- | 10 |
| 方案 4:酵母总 RNA、DNA 和蛋白质提取方案----- | 11 |
| 方案 5:细菌总 RNA、DNA 和蛋白质提取方案----- | 12 |
| 常见问题回答----- | 13 |

版本: 2010-01

简介

AllPure DNA/RNA/Protein Kit 是从培养细胞、动物组织、植物真菌、酵母、细菌等样品中同时提取 DNA, RNA 和蛋白质最为快速和简单的方法。试剂盒采用硅胶柱纯化技术, 抽提过程中无需用到危险的酚氯仿抽提, 也无需用到耗时的醇类沉淀。试剂盒适合从小于 1×10^7 培养细胞、20mg 动物软组织, 100mg 植物真菌样品, 5×10^7 酵母细胞, 1×10^9 细菌样品中提取总 RNA, DNA 和蛋白质。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。得到的 DNA 可直接用于 PCR、Southern 杂交等。得到的 Protein 可直接用于 SDS-PAGE 电泳、Western 杂交等。

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。得到的核酸纯度高, 可直接用于各种下游实验。

AllPure DNA/RNA/Protein Kit 基于硅胶柱纯化方式。样品在含高浓度异硫氰酸胍裂解液中匀浆裂解, RNA 和 DNA 释放到裂解液中。由于裂解液中含有高浓度异硫氰酸胍, 内源性或外源性的核酸酶变性而失活, RNA 和 DNA 被保护起来。裂解液经离心去除不溶解的杂质, 转移至 DNA 结合柱吸附 DNA, 滤液加入乙醇调节结合条件, 转移至 RNA 柱子吸附 RNA。DNA 和 RNA 柱子经 Buffer DW1 和 Buffer RW1 洗涤蛋白质和其它杂质, 经 Buffer RW2 洗涤去除盐分, RNA 被 RNase-Free Water (DEPC 处理水)洗脱。DNA 被 Elution Buffer 洗脱。收集滤液, 加入丙醇沉淀回收蛋白质, 最后加入合适的缓冲液溶解蛋白质。

组成

AllPure DNA/RNA/Protein Kit

| 产品编号 | R5211-01 | R5211-02 | R5211-03 |
|----------------------------|----------|-----------|-----------|
| 纯化次数 | 10 次 | 50 次 | 250 次 |
| HiPure RNA Mini Columns | 10 | 50 | 250 |
| HiPure DNA Mini Columns II | 10 | 50 | 250 |
| 2ml Collection Tubes | 20 | 100 | 500 |
| Buffer RL | 10 ml | 50 ml | 250 ml |
| Buffer DW1 | 10 ml | 30 ml | 150 ml |
| Buffer RW1 | 10 ml | 50 ml | 250 ml |
| Buffer RW2* | 5 ml | 2 x 20 ml | 3 x 50 ml |
| RNase Free Water | 1.8 ml | 10 ml | 30 ml |
| Elution Buffer | 1.8 ml | 10 ml | 30 ml |
| DPS Solution (5% SDS) | 5 ml | 30 ml | 150 ml |
| 说明书 | 1 | 1 | 1 |

保质期

AllPure DNA/RNA/Protein Kit 可在室温下(15-25℃)干燥保存 18 个月。长期保存时需置于 2-8℃。低温下, Buffer RL 可能会有沉淀形成, 需 55℃水浴让沉淀完全溶解后使用。因 DEPC 处理水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 DEPC 处理水并保存于-20℃, 以减少污染。若 DEPC 处理水受到污染, 请重新配制。

DEPC 处理水的配制:

在试剂瓶中装入适量去离子水, 加入 0.1% DEPC, 磁力搅拌器搅拌过夜, 于 120℃灭菌 20-30 分钟。处理后, 分装保存于 2-8℃或-20℃。灭菌后 DEPC 处理水有乙醇气味, 属于正常现象。

需要准备材料和工具

- **14.3M β -巯基乙醇(β -ME)或1M DTT:** 使用前, 分装适量的Buffer RL, 每1ml Buffer RL 加入20 μ l β -巯基乙醇。Buffer RL/ β -ME混合液可室温稳定放置1个星期。 β -ME有较强的气味, 可用1 M DTT (Dithiothreitol)代替。用DEPC处理水或灭菌水配制1M DTT, 分装保存于-20 $^{\circ}$ C。按1ml Buffer RL加入20 μ l 1M DTT, 该混合液可于室温放置2天。
- 70%乙醇: 用DEPC处理水配制
- 无水乙醇(96-100%)
- 无 RNase 酶的 1.5ml 离心管
- 无 RNase 酶的枪头
- 手套
- 相应的匀浆工具
- (可选)DNase On Column Kit (R4911-01, 50Preps)
- (可选) Lyticase 或溶菌酶
- 按瓶子标签所示, 加入适量的无水乙醇稀释 **Buffer RW2**, 并于室温保存。

样品的打散和匀浆

样品的打散及匀浆是所有 RNA 提取所必需的步骤。样品的打散是让组织或细胞块快速分散、细胞壁和细胞质膜破裂，从而使核酸释放到裂解液中。匀浆是指用适当的方法打断高分子量的基因组 DNA 和细胞内高分子量的物质，以降低溶液的粘稠度。打散和匀浆不充分都可能会导致 RNA 产量和纯度下降，还有可能引起柱子的堵塞。

A: 液氮处理

在处理液氮的时候，请戴上手套并小心处理。切出适量的组织置于预冷的研钵中，迅速加入液氮，将组织研磨成粉末，然后将粉末倒入预冷的离心管中。（注意预先冷却离心管，否则样品倒入时，液氮沸腾而损失样品。）称重并加入适量的 Buffer RL/ β -ME，涡旋混匀。由于液氮研磨只能起到打散样品的作用，所以最好再用注射器或机械匀浆器进行匀浆，以减低裂解液的粘稠度。

B: 机械匀浆器匀浆

机械匀浆器能高效匀浆大部分的组织和细胞。把样品置于合适的玻璃管或离心管中，加入裂解液，把探头插入裂解液中，高速间断匀浆，每次为 15-20 秒直至样品完全匀浆。使用机械匀浆器时，一般组织都可以在一分钟内达到理想的匀浆效果。大部分的机械匀浆器都带有不同大小的探头，小体积的裂解液适合使用较小的探头。

C: 玻璃珠

玻璃珠高速涡旋也能有效地裂解样品。细胞可用 0.4-0.6mm 酸洗玻璃珠，细菌可用 0.1-0.2mm 酸洗玻璃珠。把样品转移至离心管中，加入适量的玻璃珠，再加入 Buffer RL，高速涡旋 5-10 分钟。最好采用珠磨器，如 Fastprep-24(MP)等。珠磨效果取决于样品的大小、细胞壁厚度以及珠磨器功率，详细的操作应根据仪器进行调整。

D: 玻璃匀浆器

玻璃匀浆器是常用的匀浆工具。能有效处理软组织如肝脏、脾脏、肾、脑等。把样品和适量的裂解液转移至玻璃匀浆器中，上下推磨直至组织块被充分打散。由于玻璃匀浆磨只能起到打散样品的作用，所以最好再用注射器匀浆几次，以减低裂解液的粘稠度。

E: 注射器

处理培养细胞或小量动物柔软组织，如脑、胚胎等可用小型注射器(带 20#针头)进行抽打。此外，小型注射器还可以同时打断基因组 DNA 和其它高分子物质，起到降低裂解液的粘稠度的作用。注射器匀浆方式是处理细胞最常用的方法。

方案 1. 培养细胞总 RNA/DNA/Protein 提取

该方案适合于从 $<1 \times 10^7$ 个培养细胞中提取总 RNA, DNA 和蛋白质。以下离心都在室温下进行。

细胞用量

为得到理想的产量和纯度, 细胞用量必须合理。试剂盒的细胞量可低至 100 个细胞, 但最大用量取决于样品中 RNA/DNA 含量、柱子结合力和裂解液用量。不同细胞 RNA 的含量差异很大。例如:

- COS 细胞含有丰富的 RNA (1×10^6 细胞约有 $35\mu\text{g}$)。细胞用量 $\leq 2 \times 10^6$ 个。
- HeLa 细胞含有中丰度 RNA (1×10^6 细胞约有 $15\mu\text{g}$)。细胞用量 $\leq 6 \times 10^6$ 个。
- NIH/3T3 细胞含低丰度 RNA (1×10^6 细胞约有 $10\mu\text{g}$)。细胞用量 $\leq 1 \times 10^7$ 个。

若不知道细胞 RNA 含量, 推荐起始用量应为 5×10^6 个细胞。再根据得到的产量和纯度, 来调整下一次提取时细胞的用量。但不论何种情况, 细胞用量都不要超过 1×10^7 。

细胞的收集

- ◆ **悬浮细胞:** 计算细胞数量。400 x g 离心 5 分钟收集细胞。吸弃培养液, 按第 1 步操作。
- ◆ **贴壁细胞:** 贴壁细胞可在培养瓶/皿中直接裂解; 也可经胰酶消化后离心收集。
直接裂解: 计算细胞数量。彻底吸弃培养液, 按第 1 步进行操作。
胰酶消化: 计算细胞数量。吸弃培养液, 用 PBS 清洗细胞, 再加入含 0.1-0.25% 胰酶的 PBS。当细胞从壁上脱落后, 加入含血清的培养液(血清可抑制胰酶), 并转移至离心管中, 400 x g 离心 5 分钟。彻底吸弃溶液, 并按第 1 步进行操作。
注: 培养液须彻底去除, 残留的培养液会稀释裂解液而影响 RNA 完整性和产量。

细胞的裂解和匀浆

1. 加入适量的 Buffer RL/β -ME 至细胞样品中, 重悬打散细胞。

离心收集的细胞: 弹打或涡旋松散细胞, 根据细胞数量加入适量的 Buffer RL/β -ME。涡旋或吸打重悬细胞。

- $\leq 5 \times 10^6$ 细胞: 加入 $350\mu\text{l}$ Buffer RL/β -ME
- $\geq 5 \times 10^6$ 细胞: 加入 $600\mu\text{l}$ Buffer RL/β -ME

贴壁细胞: 彻底吸弃培养液, 向培养瓶或培养皿中加入适量的 Buffer RL/β -ME。用移液枪吹打使细胞从壁上脱落, 并转移至离心管中。

- 6 cm 直径的培养皿：加入 350 μ l Buffer RL/ β -ME
 - 6-10cm 直径的培养皿：加入 600 μ l Buffer RL/ β -ME。
2. 匀浆(任选一种方案)，然后按第 3 步进行操作。
 - 用带转头的机械匀浆器匀浆 30 秒；
 - 用一次性#20 号针头的注射器抽打裂解液 5 次以上。

过柱吸附 DNA

3. 把 HiPure DNA Mini Column II 装在 2ml 收集管中。**转移第 2 步的裂解液或上清液至 DNA 柱子中。**14,000 x g 离心 2 分钟。
4. 保留 HiPure DNA Mini Column II，按第 15-21 步进行 DNA 抽提。
注：处理某些组织时，裂解液可能会非常粘稠而引起柱子堵塞，此时可提高离心速度或延长离心时间至所有裂解液都完全流出。

总 RNA 抽提

5. **加入等倍体积的 70%乙醇至滤液中。**用移液枪吸打 3-5 次。
注：操作过程中裂解液可能有损失，70%乙醇应按照裂解液的实际体积加入。处理肝脏样品时，用 50%乙醇代替 70%乙醇有利于提高产量。
6. 把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。**转移 \leq 700 μ l 混合液至 RNA 柱子中。**10,000 x g 离心 30-60 秒。收集滤液并转移至 2ml 离心管中。
7. (可选:混合液超过 700 μ l) 把柱子装在收集管中。**把剩余混合液转移至 RNA 柱子中。**10,000 x g 离心 30-60 秒。收集滤液并转移至同一个 2ml 离心管中。按第 22-34 步进行总蛋白质提取。
8. 把柱子装回收集管中。**加入 500 μ l Buffer RW1 至柱子中。**10,000 x g 离心 30-60 秒。
9. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。**加入 500 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释) 至柱子中。**10,000 x g 离心 30-60 秒。
注：Buffer RW2 在使用之前，必须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签或说明书进行稀释。
10. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。**加入 500 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至**

柱子中，10,000 × g 离心 30-60 秒。

11. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。10,000 × g 离心空柱 2 分钟甩干柱子。
12. 把柱子装在新的 1.5ml 离心管中。加入 30-50μl DEPC 水至柱子的膜中央。室温静置 2 分钟。10,000 × g 离心 1 分钟。
13. (可选)再加入 30-50μl DEPC 水至柱子的膜中央。室温静置 2 分钟。10,000 × g 离心 1 分钟。
注：HiPure RNA Mini Column 最小的洗脱体积是 30μl，小于 30μl 会导致 RNA 的洗脱效率下降。如果 RNA 产量超过 20μg，推荐再加入 30-50μl DEPC 水至柱子中，进行第二次洗脱。
14. 弃去 RNA 柱子，把 RNA 保存于-80°C。

DNA 抽提

15. 取 HiPure DNA Mini Column II(第 4 步)装在收集管中。加入 500μl Buffer DW1 至柱子中。10,000 × g 离心 30-60 秒。
16. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。加入 500μl Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。10,000 × g 离心 30-60 秒。
17. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。加入 500μl Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。10,000 × g 离心 30-60 秒。
18. 倒弃流出液，把柱子套回空的收集管中。10,000 × g 离心空柱 2 分钟，以甩干柱子的基质；
19. 将 DNA 柱子装在 1.5ml 离心管中。加入 50-100μl 预热至 65°C Elution Buffer 至柱子的膜中央。室温静置 3 分钟。10,000 × g 离心 1 分钟。
20. 再加入 50-100μl 预热至 65°C Elution Buffer 至柱子的膜中央。室温静置 3 分钟。10,000 × g 离心 1 分钟。
21. 弃去 DNA 柱，把 DNA 保存于-20°C。

蛋白质抽提

22. 取第 6-7 步获得的滤液，加入 4 倍体积冰冷的丙酮。涡旋混匀 30 秒。
23. 冰上放置 30 分钟沉淀蛋白质。
24. 室温下，12,000 × g 离心 10 分钟离心沉淀蛋白。
25. 小心倒弃上清液。加入 1ml 无水乙醇，涡旋混匀。
26. 室温下，12,000 × g 离心 3 分钟。小心倒弃上清液。
27. 短暂离心，彻底吸弃残留的乙醇。
28. 空气干燥 5-10 分钟。
29. **根据下游应用，加入 100-500μl Buffer PR2(5% SDS)或其它缓冲液至蛋白质沉淀。**

注：Buffer RL 含有高浓度的异硫氰酸胍，以灭活 DNase, Rnase 和 proteases。高浓度异硫氰酸胍会导致蛋白质的变性，而引起其溶解度下降。加入溶解液溶解时(如 PBS, TE 等)，需要涡旋较长的时间或用枪抽打打散沉淀的蛋白质。用 Buffer PR2 (5% SDS)或 8M Urea 可快速让蛋白质的溶解。沉淀中含有细胞碎片或其它杂质无法被完全溶解，可离心去除。蛋白质溶解于 5% SDS 后，可直接用 BCA(bicinchoninic acid)法定量分析。蛋白质溶解于 8M Urea，稀释至 3M 后，也可用 BCA 法进行定量。溶液的体积取决于样品的用量和蛋白质含量。
30. **用研磨棒和移液枪吸打匀浆打散蛋白质沉淀。**若蛋白质沉淀团较少，也可以用涡旋来打散沉淀团。

注：处理组织样品时，这一步得到的沉淀团会比较难于打散。建议把样品转移至 1.5ml 离心管中，然后用一次性研磨棒进行匀浆打散沉淀以提取产量。
31. **95°C 水浴 5 分钟溶解蛋白质。**
32. 室温静置让样品恢复至室温。
33. 室温下，12,000 × g 离心 5 分钟去除不溶解的物质。
34. 转移上清液至新的 1.5ml 离心管中。放置 4°C 或 -20°C，或用于 SDS-PAGE 电泳，或定量等。

方案 2. 动物组织总 RNA/DNA/Protein 提取

该方案适合于从 $\leq 30\text{mg}$ 动物软组织，如肝脏、脾脏、肾脏，脑等样品中提取高达总 RNA、DNA 和蛋白质。富含肌纤维的肌肉和皮肤组织不适合该方案进行抽提，建议采用 MagZol Reagent 进行抽提。

组织用量

正确的组织用量是获得理想 RNA 产量和纯度的关键。该试剂盒的组织用量可低至 0.1mg ，而最大的组织用量则取决于样品中 RNA/DNA 的含量、蛋白质和杂质的含量。

- 肝脏含有大量蛋白质，组织用量 $\leq 15\text{mg}$ ；
- 脾脏、胸腺组织含大量 DNA，裂解液非常粘稠，组织用量 $\leq 10\text{mg}$ ；

若处理的组织没有相关的信息，我们推荐第一次起始用量为 10mg ，根据获得的结果再调整组织用量。不管何种情况，组织用量都不应超过 30mg 。

1. 组织的裂解和匀浆：

- $\leq 10\text{mg}$ 组织：使用 $350\mu\text{l}$ Buffer RL/ β -ME；
- $10\text{-}30\text{mg}$ 组织：使用 $600\mu\text{l}$ Buffer RL/ β -ME；

选择合适的匀浆工具进行匀浆，详细参照第 5 页的‘样品的打散及匀浆’。

2. $14,000 \times g$ 离心 5 分钟。小心转移上清液至新的 1.5ml 离心管中。

注：处理某些样品，如脑组织，离心后溶液表面会飘浮一层脂类。转移上清时，尽量不要吸到这一层物质(脂类物质)。脂类会造成 RNA 产量下降，还可能会引起柱子堵塞。

3. 按方案 1 的第 3-34 步进行操作。

方案 3. 植物真菌总 RNA/DNA/Protein 提取

该方案适合于从 $\leq 100\text{mg}$ 次生代谢物质较少的植物/真菌样品中提取高纯度的总 RNA、DNA 和蛋白质。如水稻、玉米、黄豆、番茄、棉花、烟草等。富含多糖类植物样品，如蕃薯、香蕉、花生，以及富含多酚类的植物样品，如葡萄、菊科类、松针等，推荐订购 Buffer PRC1 来代替 Buffer RL，Buffer PRC2 代替 70% 的乙醇。Buffer PRC1 和 Buffer PRC2 是专门为多酚类和多糖类植物样品的设计的。以下离心均在室温下进行。

1. 收集植物或真菌样品并尽快浸泡到液氮中以防止 RNA 的降解。使用研钵、研磨棒和液氮将植物或真菌样品研磨成尽量细小的粉末。RNA 的产量取决于样品类型和研磨效果。**快速称取 50-100mg 的研磨好的样品至 1.5ml 预冷的离心管中。**
注：在加入裂解液之前，不要让样品解冻。初次使用时，推荐先使用 50mg，待取得理想结果后，再酌情提高用量。
2. **立即加入 600 μl Buffer RL/ β -ME 混合液至样品中。**涡旋 30-60 秒打散样品，室温静置 3-5 分钟让样品充分裂解。
3. 14,000 x g 离心 10 分钟。小心转移上清液至新的 1.5ml 离心管中。
4. 按方案 1 的第 3-34 步进行操作。

方案 4. 酵母总 RNA/DNA/Protein 提取

该方案适合于从 2×10^6 - 5×10^7 酵母细胞中提取高纯度的总 RNA、DNA 和蛋白质。酵母培养细胞有很厚的细胞壁,对裂解带来极大的麻烦。该方案采用酶法去除, **Lyticase** 和 **Buffer SE** 需另外订购。

1. 用合适的条件培养酵母细胞。
2. 4°C , $1,000 \times \text{g}$ 离心 5 分钟收集酵母细胞($<5 \times 10^7$)。吸弃培养液。
3. 加入 **1ml 新配制的 Buffer SE 至样品中**。涡旋重悬酵母细胞。
注: Buffer SE: 1M Sorbitol, 0.1M EDTA, pH7.4。(可订购)
4. 加入 **Lyticase 至酵母重悬液中, 终浓度为 $50\text{U}/10^7$ 个酵母细胞**。轻轻振荡混匀。
 30°C 振荡水浴 10-30 分钟消化去除酵母细胞壁。
5. 4°C , $1000 \times \text{g}$ 离心 5 分钟收集酵母原生质体。吸弃消化液。
6. 立即加入 **$350\mu\text{l}$ Buffer RL/ β -ME 混合液至样品中**。涡旋混匀 30 秒。室温静置 5 分钟让细菌充分裂解。
7. 用一次性#20 号针头的注射器抽打裂解液 5-10 次打断基因组 DNA, 降低溶液粘稠度。
8. $14,000 \times \text{g}$ 离心 5 分钟。小心转移上清液至新的 1.5ml 离心管中。
9. 按方案 1 的第 3-34 步进行操作。

方案 5. 细菌总 RNA/DNA/Protein 提取

该方案适合于从 $<1 \times 10^9$ 细菌中提取总 RNA。

细菌的用量 ($<1 \times 10^9$)

细菌生长情况可以通过分光光度计进行测量。由于不同仪器之机的差别和各种生长条件的影响，我们很难给出 OD 值与细菌数量之间的精确可靠的关系。例如，每毫升含 1×10^9 个细菌的培养液，稀释 4 倍后，在 Beckman DU-40 测量时，OD600 为 0.125；在 DU-7400 测量时，OD600 为 0.25。因此我们建议使用平板计数法来较准仪器测量的 OD 值。测量 OD 值时，需对样品进行稀释或浓缩，以确保读数在 0.05-0.3 的可信区间内。不同的培养条件以及不同细菌的 RNA 含量差别很大，我们建议在初次提取时，细菌的用量为 2×10^8 ，然后再根据结果进行调整。

细菌的裂解

1. 按合适的条件培养细菌。
2. 4°C ， $5,000 \times g$ 离心 5 分钟收集细菌。倒弃培养液。
3. 加入 $50\mu\text{l}$ Buffer TE 和 $10\mu\text{l}$ Lyszyme(50mg/ml)至细胞沉淀团中。涡旋重悬细菌。处理葡萄球菌时，还需要加入 $1\mu\text{l}$ Lysostaphin (20mg/ml)。
4. $30-37^\circ\text{C}$ 水浴 10 分钟。
5. 立即加入 $550\mu\text{l}$ Buffer RL/ β -ME 混合液至样品中。涡旋混匀 30 秒。室温静置 5 分钟让细菌充分裂解。
6. 用一次性#20 号针头的注射器抽打裂解液 5-10 次打断基因组 DNA，降低溶液粘稠度。
7. $14,000 \times g$ 离心 5 分钟。小心转移上清液至新的 1.5ml 离心管中。
8. 按方案 1 的第 3-34 步进行操作

常见问题回答

该列表可能有利于解决提取过程所碰到的问题。Magen 的技术人员也可以随时为您提供服务，若您对试剂盒存在问题或建议，或您在分子生物学上碰到问题，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 |
|------------------|---|
| 柱子堵塞 | |
| 样品匀浆不充分 | 参照“样品的打散及匀浆”部分，提高样品的裂解效果；减少样品用量或增加裂解液 RTL 的用量和延长匀浆时间； |
| 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先决条件；过多的组织或细胞用量反而会造成产量和纯度的下降。 |
| 裂解液加入乙醇之前没有离心 | 处理动物组织，加入乙醇之前需离心去除杂质。沉淀中含有细胞碎片会引起柱子的堵塞。处理某些组织样品时，离心后裂解液表面还可能有一层脂类层，转移上清液尽量不要吸到这些物质。 |
| 组织富含肌纤维和高分子量的蛋白等 | 动物组织如肌肉，心脏，皮肤，以及一些低等小型生物，因组织富含肌纤维或其它高分子量的蛋白质，会引起柱子堵塞。建议使用方案 6。 |
| 组织样品中富含脂类物质 | 动物组织如脑组织，脂肪富含脂类物质，加入乙醇必须离心，转移上清液时尽量不要吸到溶液表面漂浮的物质。处理脂类含量丰富的样品时，推荐使用方案 6。 |
| 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℃）。上柱前，把裂解液和乙醇混合液放置于 37℃水浴有利于减少堵塞现象。 |
| RNA 产量低 | |
| 样品匀浆不充分 | 参照上面 |
| 样品起始用量太多 | 参照上面 |

RNA 的洗脱效率低 DEPC 水需直接加到膜上，并静置几分钟后，再离心洗脱；
DEPC 水 pH 值太低，重新配制；
加入 DEPC 水太少。建议进行第二次或第三次洗脱

培养液没彻底去除 从细胞中提取 RNA 时，要把培养液彻底吸弃。

细胞壁没彻底去除 从酵母或细菌中提取 RNA，某些菌株可能带有很厚的细胞壁，很难消化去除。提高酶量和延长消化时间。

70%乙醇体积不正确 测量裂解液体积，加入等倍体积的 70%乙醇

Buffer RW2 没有加入乙醇稀释 Buffer RW2 使用前，必须加入无水乙醇进行稀释

RNA 降解

样品用量太多 减少样品用量。正确样品用量是获得理想结果的先决条件；

RNA 酶污染 操作过程引入 RNA 酶的污染或溶液污染

样品中 RNA 已降解 样品的不正确贮藏引起 RNA 的降解

DNA 污染

样品用量太多 减少组织用量。

样品匀浆不充分 提高匀浆效果打断高分子量基因组 DNA，降解裂解液的粘稠度。

DNase I 消化不彻底 延长 DNase I 消化时间

DNase 没有接触到膜 把 DNase 反应液加到柱子的膜中央。

下游实验结果不理想

盐类污染 加入 Buffer RW2 后，静置 5 分钟再离心

乙醇污染 确保空柱离心时速度 12,000xg，离心时间为 2 分钟。

膜材料脱落 硅胶膜在离心过程中可能会发生脱落。脱落的颗粒是不溶解的，可通过 12,000xg 离心 2 分钟去除。