

# R6840 Fungal RNA Kit

## 真菌 RNA 提取 常见问题及排查方法

1. 真菌的细胞壁非常厚，提取时必须按照说明书使用石英砂、液氮研磨或自动匀浆仪破碎等较强的物理破碎手段辅助裂解，如直接在样品中混入裂解液 Buffer RB 进行实验，样品是无法得到有效裂解的，即造成 RNA 提取效率低下或提取失败。
2. 实验前检查 Buffer RB 是否有沉淀物析出，久置或低温都会让 Buffer RB 析出沉淀，如有沉淀析出，需按照说明书指示：在 37°C 水浴并轻轻摇动至沉淀完全溶解。
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. 注意在 Buffer RB 中加入 $\beta$ -巯基乙醇用于阻断 RNase 降解 RNA。
5. 对于核酸和多糖含量较高的样品，需减少样品用量，一般情况，可先从 50-100mg 进行提取；为避免 RNA 降解，注意不要延长涡旋重悬的时间。
6. 将混合液转移到 HiBind<sup>®</sup> RNA Mini Column 前，必须加入转移至上清的等体积的 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。注意：70%乙醇用 DEPC Water 配制。
7. 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。
8. 如出现堵柱子的情况，需注意以下几点：
  - (1) 注意样品用量：样品量不宜超过 100mg，过多的样品用量不仅不会增加产量，反而可能会导致裂解不充分或造成堵柱子；
  - (2) 注意在加入 Buffer RB/ $\beta$ -巯基乙醇前，需将真菌样品研磨成均匀的细粉末状，在加入 Buffer RB/ $\beta$ -巯基乙醇后需注意将样品彻底重悬打散，否则将导致样品裂解不充分，进而可能导致提取失败；
  - (3) 如有堵柱子的情况发生，可通过适当增大离心速度或延长离心时间至溶液全部通过柱子，并在下次提取时减少样品用量；
  - (4) 如果无法减少样品量，则需增加过柱前试剂 (Buffer RB/ $\beta$ -巯基乙醇、水饱和酚、NaAc、氯仿、70%乙醇等) 的用量，过柱后的试剂用量无需增加。
9. 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，可在下次提取中，提高离心机速度或延长空甩时间至 5~10min，可解决残留问题。

10. 如产物浓度偏低，建议减少最后一步加入 DEPC Water 的体积至 50 $\mu$ l，将 DEPC Water 预热至 70 $^{\circ}$ 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<sup>®</sup> RNA Mini Column，室温等待 2-3min，再次离心。

11. 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 $^{\circ}$ 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 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样品。请尽量使用新鲜或冻存时间短的样品。

2. 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。

3. 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。

4. 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。