

# R6734 Total DNA/RNA/Protein Kit

## 总 DNA/RNA/蛋白质提取 常见问题及排查方法

1. 实验前检查 Buffer GTC 是否有沉淀物析出，久置或低温都会让 Buffer GTC 析出沉淀，如有沉淀析出，需按照说明书，在 37°C 水浴至沉淀完全溶解后再使用。
2. 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。
3. 实验前，DNA Wash 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醇类稀释。稀释错误或未稀释会导致 DNA 无法挂柱结合，致提取失败。
4. 若出现堵柱子的情况，应注意以下几点：
  - (1) 注意样品用量：细胞样品量不宜超过  $1 \times 10^7$  个，组织样品不建议超过 15mg，过多的样品量不但不会增加产量，反而可能会导致堵柱子；
  - (2) 注意在加入 Buffer GTC 后，需将样品研磨充分，否则可能造成裂解不充分或导致堵柱子，进而影响提取效果；
  - (3) 若出现堵柱子的情况，可适当延长离心的时间，可帮助样品完全转移过柱，并在下次提取时必须减少样品用量；
  - (4) 裂解不充分：如不宜减少样品用量，则需增加过柱前试剂的用量，确保样品得到充分裂解。
5. 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 DNA 或 RNA 在最适温度下结合上柱。

### RNA 提取：

6. 匀浆裂解液过 DNA 柱后，将滤液转移到 HiBind® RNA Column 前，必须加入 0.5 倍滤液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。
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. 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。

9. 不要随意缩小说明书中的洗脱体积至小于 30-70 $\mu$ l, 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 $^{\circ}$ 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 Column，室温等待 2-3min，再次离心。

### **DNA 提取：**

10. 不要随意缩小说明书中的洗脱体积至小于 50 $\mu$ l, 过低的洗脱体积会大幅降低洗脱效率。如产物浓度偏低，建议先将 Elution Buffer 在 70 $^{\circ}$ C 预热后再加入柱子中，孵育 5min 后再离心洗脱，且建议进行第二次洗脱。洗脱方法：将第一次洗脱的 Elution Buffer 重新吸回 HiBind<sup>®</sup> DNA Column，室温等待 2-3min，再次离心。

11. 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。

### **蛋白质提取：**

12. 注意将滤液转移到 HiBind<sup>®</sup> RNA Column 后，离心所得滤液中含有所需蛋白质，用于后续蛋白提取，不要将此步骤得到的滤液倒弃。

13. 该试剂盒提取得到的蛋白已是高度变性的，无需再煮沸变性，可根据需求选择合适的蛋白溶解缓冲液溶解蛋白，推荐使用 5~10% SDS 溶液溶解，RIPA 裂解强度不够，不建议使用。溶解后可直接用于 western blot，无需再次纯化。

14. 蛋白溶解方法建议：如下游需要进行 western blot 实验，建议用枪头把蛋白沉淀碾成细碎颗粒，加入适量体积（以刚浸没蛋白沉淀为宜）的浓度为 5-10% SDS，封口膜缠紧管口，50 $^{\circ}$ C 加热 1-4 小时。待沉淀明显缩小后，离心去掉沉淀，取上清液产物。

## **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。Loading Buffer 不能与 DNA 混用。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。