

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: 202401

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 (RNase Free Water)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
Buffer AOL (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 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 受到污染, 请重新配制。

RNase Free Water 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

- 提升裂解液的变性能力：使用前分装适量的 Buffer RL，按每 1ml Buffer RL 加入 20 μ l β -巯基乙醇、1M DTT 或 1M TCEP，混合液室温可保存 1 周。TCEP，中文名为三(2-羧乙基)膦盐酸盐，是一种高效、无异味、不含硫醇基还原剂，可高效灭活核酸酶和防止多酚氧化，可代替 2-巯基乙醇，提高 RNA 的完整性和得率。
- 70%乙醇：用 RNase Free Water 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。由于玻璃匀浆器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

处理培养细胞或小鼠动物柔软组织，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, 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 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, 涡旋或吸打重悬细胞。

- $\leq 5 \times 10^6$ 细胞: 加入 350 μl Buffer RL
- $\geq 5 \times 10^6$ 细胞: 加入 700 μl Buffer RL

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, 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 μl Buffer RL

- 6-10cm 直径的培养皿：加入 700 μ l Buffer RL
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或电动研磨器匀浆 10~30 秒进一步匀浆样品。
 - 用一次性 1ml 注射器(ZS100)抽提 5~10 次进一步匀浆样品降解粘稠度。
 - 若细胞数量小于 1×10^6 ，用移液器吸打混匀 5-10 次。
 - 若细胞数量小于 1×10^5 ，涡旋混匀 1 分钟。
 3. 把 HiPure DNA Mini Column II 装在 2ml 收集管中，转移第 2 步的裂解液至 DNA 柱子中，14,000 \times g 离心 2 分钟。
 4. 保留 HiPure DNA Mini Column II，按第 13~19 步进行 DNA 抽提。

总 RNA 抽提

5. 加入等倍体积的 70%乙醇至滤液中，用移液枪吸打混匀 3-5 次。
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。
6. 把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中，转移 \leq 750 μ l 混合液至 RNA 柱子中。10,000 \times 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 \times g 离心 30-60 秒。收集滤液并转移至同一个 2ml 离心管中。按第 20-27 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 \times 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 \times g 离心 30-60 秒。
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 \times g 离心 30-60 秒。
11. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。10,000 \times 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 30-100 μ l RNase Free Water 至柱子的膜中央，室温静置 2 分钟。10,000 \times g 离心 1 分钟，弃去 RNA 柱子，把 RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。

DNA 抽提

13. 取 HiPure DNA Mini Column III(第 4 步)装在 2ml 收集管中, 加入 500 μ l Buffer DW1 至柱子中。10,000 \times g 离心 30-60 秒。
14. 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 \times g 离心 30-60 秒。
15. 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 \times g 离心 30-60 秒。
16. 倒弃滤液, 把柱子套回收集管中, 10,000 \times g 离心空柱 2 分钟甩干柱子的基质。
17. 将 DNA 柱子装在 1.5ml 离心管中, 加入 50-100 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Elution Buffer 至柱子的膜中央。室温静置 3 分钟, 10,000 \times g 离心 1 分钟。
18. 再加入 50-100 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Elution Buffer 至柱子的膜中央。室温静置 3 分钟, 10,000 \times g 离心 1 分钟。
19. 弃去 DNA 柱, 把 DNA 保存于-20 $^{\circ}$ C。

蛋白质抽提

20. 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 15 秒, 冰上放置 30 分钟沉淀蛋白质。室温下, 12,000 \times g 离心 10 分钟沉淀蛋白, 小心倒弃上清液。
21. 加入 1ml 无水乙醇, 涡旋混匀 5 秒。室温下, 12,000 \times g 离心 3 分钟。
22. 小心倒弃上清液。短暂离心, 彻底吸弃残留的乙醇, 空气干燥 5-10 分钟。
23. 根据下游应用, 加入 100-500 μ l Buffer PR2(5% SDS)或其它缓冲液至蛋白质沉淀。

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。

24. 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。

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。

25. 95°C 水浴 5 分钟溶解蛋白质，室温静置让样品恢复至室温。室温下，12,000 × g 离心 5 分钟去除不溶解的物质。
26. 转移上清液至新的 1.5ml 离心管中，然后保存于 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。

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。
- $10\text{-}30\text{mg}$ 组织：使用 $600\mu\text{l}$ Buffer RL。

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。

处理某些样品，如脑组织，离心后溶液表面会漂浮一层脂类。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. 用液氮将植物或真菌样品研磨成细小粉末。
2. 称取 50~300mg 粉末至 1.5~2.0ml 预冷的离心管中，立即加入 600 μl Buffer RL 至样品中，高速涡旋 15~30 秒打散样品。
研磨好的样品在称量、转移、存放或加入 RL 之前都不能解冻，否则 RNA 会降解。初次使用推荐样品量为 50~100mg，根据结果再调整用量。易提取样品，如玉米叶片、拟南芥叶片、水稻叶片等，样品用量可高达 300mg。
3. 14,000 \times g 离心 5 分钟。
4. 小心转移上清液至新的 1.5ml 离心管中，按方案 1 的第 3 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 ， $1,000 \times g$ 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。
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 ， $1000 \times g$ 离心 5 分钟收集酵母原生质体。吸弃消化液。
6. **立即加入 350 μl 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. $14,000 \times g$ 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 μl Buffer TE 和/10 μl Lysozyme(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 μl LysoStaphin (20mg/ml)。
4. $30-37^\circ\text{C}$ 水浴 10 分钟。
5. **立即加入 550 μl 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。