

操作步骤:

实验前需要准备的试剂和耗材:

氯仿、异丙醇、75%乙醇(用RNase-free水配制)、RNase-free的水、RNase-free的耗材(Tip头,离心管等)。

1. 匀浆处理 (Homogenization)

a. 组织中提取总RNA:

- 1) 植物组织: 植物叶片直接放入研钵中, 加入少量液氮, 迅速研磨成粉末, 每50-100mg植物叶片加入1ml RNA提取试剂。
- 2) 动物组织: 按10-30mg组织加入1ml RNA提取试剂, 用电动匀浆器或者一次性研磨杵充分匀浆。

b. 培养细胞中提取总RNA:

- 1) 贴壁细胞: 无须胰酶消化, 可直接用RNA提取试剂进行裂解, 每10cm²培养面积加1ml RNA提取试剂。
- 2) 悬浮细胞: 可直接离心收集、裂解, 每1ml RNA提取试剂可裂解5 × 10⁶动物或酵母细胞或10⁷细菌细胞。

c. 血液中提取总RNA:

直接取新鲜的血液, 加入3倍体积红细胞裂解液, 混匀后室温放置10分钟, 10,000 rpm离心1分钟。彻底吸弃上清, 收集白细胞沉淀。每100-200 μl血液收集的白细胞沉淀加入1ml RNA提取试剂。

2. 分层 (Phase Separation)

a. 样品加入RNA提取试剂后, 室温放置5min, 使样品充分裂解。

注: 如不进行下一步操作, 样品可放入-70℃长期保存。

可选步骤: 4℃ 12,000 rpm离心10分钟, 取上清。

如果样品中含有较多蛋白、脂肪、多糖、肌肉、植物结节部分等, 可离心去除。处理脂肪组织样品时, 上层是大量油脂, 应除去, 取澄清的匀浆溶液进行下一步操作。

b. 每1ml RNA提取试剂加入200 μl氯仿, 颠倒混匀后室温放置3-5 min使其自然分相。

注: 此步不能剧烈振荡, 否则易造成基因组DNA污染!

3. RNA沉淀 (RNA Precipitation)

a. 4℃ 12,000rpm离心10-15min。样品会分成三层: 红色的有机相, 中间层和无色的水相, RNA主要在水相中, 把水相(通常可吸取550 μl)转移到新管中。

注: 小心吸取水相, 千万不要吸取中间界面, 否则将导致RNA样品中有DNA污染。

b. 在上清中加入等体积冰冷的异丙醇, 室温放置10-20min。4℃ 12,000 rpm离心10min, 弃上清, RNA沉淀于管底。

注: 用冰冷的异丙醇能更迅速的沉降RNA。

4. RNA漂洗 (RNA Wash)

a. RNA沉淀中加入1ml 75%乙醇(用RNase-free水配制), 温和振荡离心管, 悬浮沉淀。每1ml RNA提取试剂加入1ml 75%乙醇。

b. 4℃ 5,000-8,000 rpm离心1-2min, 弃上清。

注: 转速不要高于8000rpm, 否则得到的RNA不易溶解。

c. 短暂快速离心, 用移液器小心吸弃上清, 注意不要吸弃沉淀。室温放置1-2分钟晾干沉淀。

注: RNA样品不要过于干燥, 否则很难溶解。

5. 溶解RNA (Redissolving the RNA)

根据需要, 沉淀中加入适量(一般可加50-100 μl) RNase-free水, 轻弹管壁, 以充分溶解RNA, -70℃保存。

友情提醒:

1. RNA在RNA提取试剂中不会被RNase污染, 但在氯仿分相后的上清中已经没有任何抑制RNase的物质, 所以分相后的所有操作要特别小心RNase的污染。
2. 到目前为止, 所有的RNA提取试剂均不能完全的去掉基因组DNA的污染。如果想要得到完全没有DNA的总RNA, 请使用DNase (RNase-free) 消化提取的总RNA。
3. 要想得到好的RNA, 切记一点: 材料用量宁少勿多! 如需大量提取RNA, 可按比例加大RNA提取试剂的用量。
4. 植物种类繁多, 许多植物中的次生代谢物质会影响RNA的提取质量。一般说来, 多酚和多糖含量高的植物(如棉花, 西红柿, 马铃薯)提取效果不好, 条件所限没能一一测试, 请客户根据自己植物材料的特点进行选择使用。然而, 在拟南芥、烟草、油菜等常规植物叶片RNA的提取中效果很好。

不同组织或细胞中RNA预期得率

植物叶片	100-200 μg/g 叶片
动物组织	200-400 μg/g 肝脏组织
动植物培养细胞	5-10 μg/10 ⁶ 细胞
革兰氏阴性细菌	2-10 μg/ml DH5α 过夜菌
血液	3-5 μg/ml 人全血

RNA纯度及浓度检测:

完整性 RNA可用普通琼脂糖凝胶电泳(电泳条件: 1.2%胶; 0.5 × TBE电泳缓冲液; 150v, 15-20分钟)检测完整性。由于细胞中70-80%的RNA为rRNA, 电泳后紫外灯下应能看到非常明显的rRNA条带。动物rRNA大小分别约为5kb和2kb, 分别相当于28S和18S rRNA; 植物叶片中由于含有大量的叶绿体RNA, 可见4条或更多rRNA; 细菌rRNA大小分别约为4kb和2kb, 分别相当于细菌23S和16S rRNA。理想情况下, RNA样品中最大rRNA亮度应为次大rRNA亮度的1.5-2.0倍, 否则表示RNA样品的降解, 出现弥散片状或条带消失表明样品严重降解。

纯度 OD₂₆₀/OD₂₈₀比值是衡量RNA样品中蛋白质污染程度的指标。高质量的RNA样品, OD₂₆₀/OD₂₈₀值(10mM Tris, pH7.5)在2.0左右。OD₂₆₀/OD₂₈₀读数受测定所用溶液的pH值影响, 在水溶液中所测读数则可能偏低。

浓度 取一定量的RNA提取物, 用RNase-free水稀释n倍, 用RNase-free水将分光光度计调零, 取稀释液进行OD₂₆₀测定, 按照以下公式进行RNA浓度的计算: 终浓度 (ng/μl) = OD₂₆₀ × n (稀释倍数) × 40