

cDNA 文库组标准流程一(Total RNA 的提取)

1.试剂配制

准备工作:

1、研钵、5ml/10ml/ 25ml 移液管、100ml/250ml 量筒、250ml/100ml 容量瓶、药匙、试剂瓶等玻璃制品均用锡纸包裹口部，置于烤箱内,180℃，烤 6 小时。

2、50ml/1.5ml 离心管、枪头等塑料制品用 0.1%DEPC 水浸泡过夜后，121℃ 20mins 高压灭菌。

3、电泳槽及电泳托、梳子用 3%双氧水处理。

4、常用试剂及其配方:

▲DEPC 水: 在 1000ml 去离子水中加入 100ul DEPC, 静置过夜后高压灭菌。

▲0.78M 柠檬酸钠: PH=4~5

三水合柠檬酸钠 22.94g

加 DEPC 水定容至 100ml, 室温放置备用。

▲10%肌氨酸钠:

肌氨酸钠 10g

加 DEPC 水定容至 100ml, 室温放置备用。

▲变性裂解液:

0.78M 柠檬酸钠 8.25ml

10%肌氨酸钠 12.375ml

异硫氰酸胍 118.05g

加 DEPC 水定容至 250ml, 室温放置备用

临用前加 β -巯基乙醇使其终浓度为 1% (v/v)

▲ 2M 醋酸钠 PH=4.5

NaAc·3H₂O 13.6g

加 DEPC 水定容至 50ml,高压灭菌, 室温放置备用

▲3M 醋酸钠 PH=5NaAc·3H₂O 20.4g

加 DEPC 水定容至 50ml,高压灭菌, 室温放置备用

▲ 4M LiCL:

LiCL 24.164g

加 DEPC 水定容至 100ml,高压灭菌, 室温放置备用

▲0.5M EDTA PH=8.0

EDTA 18.61g

用 NaOH 调 PH 值至 8.0, 定容到 100ml, 高压灭菌, 室温放置备用

▲10X MOPS (3-(N-吗啉代) 丙磺酸):

MOPS 41.86g

NaAC·3H₂O 4.10g

0.5MEDTA (PH 8.0) 20ml

用 NaOH 调 PH 值 6.5 ,DEPC 水定容到 1L, 室温避光放置备用。

▲ 1x MOPS:

10x MOPS 30ml

加 DEPC 水 270ml, 用时现配。

▲4x RNA Loading buffer:

10x MOPS 400ul

甘油 (高压过) 200UL

溴酚兰 10ul

甲醛(37%) 72ul

去离子甲酰胺 310ul

EDTA(0.5M PH 8.0) 8ul

ErBr(10mg/ml in DEPCH₂O) 70ul

在 4℃ 可保持 3 个月

▲ 10x PBS

pH=7.4

NaCl 80g

KCl 2g

Na₂HPO₄ 14.4g

KH₂PO₄ 2.4g

定容至 1000ml

▲变性电泳胶:

称取 0.5g 琼脂糖, 加入 47.5ml 1x MOPs, 加热至琼脂糖熔化后, 冷却至 50℃左右, 加入 2.5ml 甲醛, 轻轻混匀后倒入电泳托上。

▲变性电泳缓冲液:

在 250ml 容量瓶内加入 5ml 甲醛, 用 1x MOPS 定容至 250ml

2.动物组织 total RNA 的提取

1. 根据表 1 选择适当的组织量和相应的变性裂解液量, 将变性裂解液分装到 RNase-free 的 50ml 无菌离心管中, 冰浴 5 分钟。
2. 将组织样品放入变性裂解液中, 在高速下匀浆 15-30 秒/次, 直到看不见组织和细胞碎片。
3. 根据表 1 加入适量 2M 的乙酸钠 (pH4.0), 反复颠倒混匀 4-5 次。
4. 根据表 1 加入适量酚/氯仿, 加盖颠倒混合 4-5 次, 再摇动 10 秒钟。
5. 冰浴 10 分钟。
6. 4℃, 12000g 离心 20 分钟。
7. 小心转移上层水相于另一个 RNase-free 的无菌离心管中, 内含所需的 RNA。蛋白质和 DNA 分别留在了有机相和中间层。
8. 加入等体积的异丙醇, -20℃ 沉淀 30 分钟以上。
9. 4℃, 12000g 离心 20 分钟。
10. 根据表 1 加入适量的变性裂解液重新溶解 RNA。
11. 加等体积的氯仿, 加盖颠倒混合 4-5 次, 再摇动 10 秒钟。
12. 4℃, 12000g 离心 20 分钟。
13. 小心转移上层水相于另一个 RNase-free 的无菌离心管中, 加入等体积的异丙醇, -20℃ 沉淀至少 30 分钟。

14. 4°C, 12000g 离心 20 分钟。
15. 弃上清, 加 1ml75%的乙醇漂洗 RNA 沉淀。4°C, 12000g 离心 10 分钟。
16. 弃上清, 空气中干燥 RNA 沉淀, 直至没有乙醇气味。用适量 DEPC 水充分溶解 RNA 沉淀。
17. 取少量 RNA 用于测定 OD 值及电泳, 其余置-80°C 冰箱中保存。

表 1

Mg# of tissue	500	800	1000
变性裂解液(ml)	5	8	10
2M NaOAc pH 4 (ml)	0.5	0.8	1
水饱和酚 (mL)	5	8	10
氯仿 (mL)	1	1.6	2
异丙醇(mL)	4	6	8
变性裂解液 (mL)	0.5	0.8	1
异丙醇(mL)	0.5	0.8	1
75% 乙醇(mL)	1	1	1
DEPC-treated H ₂ O (mL)	0.5	0.8	1

3.植物组织 total RNA 的提取

1. 先将研钵于-80°C冰箱中预冷, 然后将 1g 样品在液氮中研磨成粉末状。
2. 将粉末倒入盛有 3ml 变性裂解液的 50ml 离心管中, 充分匀浆。(1g 样品加入 3ml 变性裂解液)。
3. 加入 0.3ml (1/10 体积) 2M 的 NaAc (ph4-5) 颠倒混匀。
4. 加入 3ml (等体积) 的水饱和酚, 充分振荡, 再加入 1ml (1/3) 的氯仿, 振荡。
5. 冰浴 10min。4°C, 12000g 离心 10min
6. 小心转移上清于另一离心管中, 加入 2 倍体积的无水乙醇, -70°C 沉淀至少 1 小时。
7. 4°C, 12000g 离心 20min。

8. 去上清，取沉淀。加 1ml 4M 的 LiCl 溶解沉淀 (1mlLiCl/g 组织)，并转入 1.5ml 离心管中。
9. 4℃，13000rpm 离心 15min。
10. 用 0.4ml DEPC 水溶解沉淀，加 1/2 体积的水饱和酚，1/2 体积的氯仿，颠倒混匀。
11. 4℃，13000rpm 离心 10min。
12. 取上清，加 1/10 体积的 3MNaAc (ph5) 和 2 倍体积的无水乙醇，-70℃沉淀 30min 以上。
13. 4℃，13000rpm 离心 15min。
14. 弃上清，用 1ml 75%的乙醇洗涤沉淀，4℃，13000rpm 离心 10min。
15. 弃上清，取沉淀，空气中干燥 RNA 沉淀，直至无乙醇味。
16. 用 40-60ul DEPC 水溶解(300-500ug/g)RNA 沉淀。
17. 取少量 RNA 用于测定 OD 值及电泳，其余置-80℃冰箱中保存。

4. TRIzol Reagent 提取 total RNA(GIBCO)

1. 查表 2 根据样品量选择适当的 TRIzol Reagent 体积装入 50ml RNase-free 离心管中，注意样品体积不能超过 TRIzol Reagent 体积的 10%。
2. 将组织样品放入 TRIzol Reagent 中，高速下匀浆 15-30 秒/次，直至看不见组织和细胞碎片。
3. 室温温育 10 分钟。
4. 据表 2 加入适量体积的氯仿，剧烈震荡 15 秒钟，然后室温下温育 3 分钟。
5. 4℃，12000g 离心 15 分钟，形成淡红色的苯酚/氯仿有机相，中间相和上层水相，水相约占 TRIzol 体积的 60%。
6. 转移上清于另一个 Rnase-free 的 50ml 离心管中。根据表 2 加入适量异丙醇，-20℃沉淀 1 小时以上。
7. 4℃,12000g 离心 10 分钟。
8. 去上清，据表 2 加入适量体积的 75%的乙醇混匀。
9. 4℃，7500g 离心 5 分钟。
10. 去上清，空气中干燥或真空抽干 RNA 沉淀，但不要干。加入适量体积的 DEPC-WATER,溶解沉淀。

11. 取少量 RNA 用于测定其 OD 值和电泳，其余置-80°C 冰箱中保存。

表 2

组织量	TRIzol Reagent	氯仿	异丙醇	75%乙醇
50~100mg	1ml	0.2ml	1ml	1ml