

组织和细胞 RNA 的制备

一、组织和细胞总 RNA 提取：

异硫氰酸胍法

(一) 试剂准备

1. CSB 缓冲液：42mM 柠檬酸钠；0.83% N-lauryl sarcosine(十二烷基，N 甲基甘氨酸钠)；0.2 mM β -巯基乙醇。
2. 变性液：异硫氰酸胍（终浓度 4 M）25g、CSB 缓冲液 33ml，混合直至完全溶解，可在 65℃助溶。4℃保存备用。
3. 2 M 乙酸钠：pH 4.0。
4. 异丙醇
5. 无水乙醇、70%乙醇
6. 酚：氯仿：异戊醇（25：24：1）
7. DEPC H₂O：100ml ddH₂O 中，加入 DEPC 0.1ml，弃分振荡，37℃孵育过夜。15 磅高压灭菌，4℃保存备用。

(二) 操作步骤

1. 样品处理：

(1) 培养细胞：收集细胞 $1-2 \times 10^7$ ，离心， $500g \times 5min$ 。对于贴壁培养细胞，用 0.25%胰蛋白酶-EDTA 消化后，PBS 重悬细胞并转移至 10ml 离心管中；悬浮培养细胞可直接转移离心管；离心： $500g \times 5min$ ；PBS 洗涤 2 次。弃上清，置冰浴。加预冷变性液 2 ml，充分摇动，使细胞裂解完全。以下操作均在冰浴中进行。

(2) 组织：取 1-2g 组织（新鲜或-70℃及液氮中保存的组织均可）置组织匀浆器中，加入预冷的变性液 12ml，在冰浴中充分匀浆。

2. 加 2 M 乙酸钠(pH 4.0)0.2ml，混合后将溶液转移至 5ml 离心管中。
3. 加酚：氯仿：异戊醇 2.2ml，颠倒混合用力振荡 10s，冰上放置 10min。
4. 4℃离心， $12000g \times 20min$ 。
5. 小心吸取上层含有 RNA 的水相，并转移至一新的 5ml 离心管中。避免吸取两相之间的蛋白物质。
6. 加等体积的异丙醇，置-20℃至少 30min，沉淀 RNA。
7. 4℃离心， $12000g \times 15min$ 。

8. 弃上清，再加变性液 2ml 重悬 RNA 沉淀物，振荡直至 RNA 完全溶解（必要时可 65℃ 水浴促溶）。
9. 加入等体积异丙醇，置 -20℃ 30min。
10. 4℃ 离心，12000g×15min。
11. 弃上清，加入 70%乙醇 4ml 洗涤 RNA 沉淀。4℃ 离心，8000g×5min。
12. 弃上清，将沉淀晾干。
13. 加入适量 DEPC H₂O 溶液解 RNA（65℃ 促溶 10-15min）。

（三）注意事项：

1. 所有实验过程均须避免 Rnase 的污染。
2. 要避免沉淀完全干燥，否则 RNA 难以溶解。

TRIzol 法

TRIzol RNA 提取试剂盒是由 GIBCO BRL 公司推出专供提取 RNA 的产品，其操作方便、快捷。

（一）试剂准备

1. TRIzol 试剂。
2. 氯仿
3. 异丙醇
4. 75%乙醇（DEPC H₂O 配制）
5. DEPC H₂O

（二）操作步骤

1. 样品处理：

（1）培养细胞：收获细胞 $1-5 \times 10^7$ ，移入 1.5ml 离心管中，加入 1ml Trizol，混匀，室温静置 5min。

（2）组织：取 50-100mg 组织（新鲜或 -70℃ 及液氮中保存的组织均可）置 1.5ml 离心管中，加入 1ml Trizol 充分匀浆，室温静置 5 min。

2. 加入 0.2ml 氯仿，振荡 15s，静置 2min。
3. 4℃ 离心，12000g×15min，取上清。
4. 加入 0.5ml 异丙醇，将管中液体轻轻混匀，室温静置 10min。
5. 4℃ 离心，12000g×10min，弃上清。

6. 加入 1ml 75%乙醇, 轻轻洗涤沉淀。4℃, 7500g×5min, 弃上清。

7. 晾干, 加入适量的 DEPC H₂O 溶解 (65℃促溶 10-15min)。

(三) 注意事项

1. 样品量和 Trizol 的加入量一定要按步骤 (1) 的比例, 不能随意增加样品量或减少 Trizol 量, 否则会使内源性 RNase 的抑制不完全, 导致 RNA 降解。

2. 实验过程必须严格防止 RNase 的污染。

二、总 RNA 定量

RNA 定量方法与 DNA 定量相似。RNA 在 260nm 波长处有最大的吸收峰。因此, 可以用 260nm 波长分光测定 RNA 浓度, OD 值为 1 相当于大约 40 μg/ml 的单链 RNA。如用 1cm 光径, 用 ddH₂O 稀释 DNA 样品 n 倍并以 ddH₂O 为空白对照, 根据此时读出的 OD₂₆₀ 值即可计算出样品稀释前的浓度:

$$\text{RNA (mg/ml)} = 40 \times \text{OD}_{260} \text{ 读数} \times \text{稀释倍数}(n) / 1000$$

RNA 纯品的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值为 2.0, 故根据 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值可以估计 RNA 的纯度。若比值较低, 说明有残余蛋白质存在; 比值太高, 则提示 RNA 有降解。