

Trizol 法提取 RNA

RNA 提取是生物实验室常规实验, 本 Protocol 参照 TaKaRa 的 RNAiso Plus 产品说明书
RNAiso Plus (Total RNA 提取试剂) Code No. 9108Q

准备 RNase-free 的试剂和器皿

1. 准备 10 cm 皿的细胞, 提前铺细胞进行扩增(10 cm 皿大约 10^6 个贴壁细胞, 可提出约 30 mg RNA)
2. 准备两个洗净的 100 mL 蓝盖瓶(至少一个需要是 Scott 进口瓶), 进口瓶上需要确定好 50 mL 刻度线位置, 以便之后配置 75% 的 DEPC 酒精
3. 准备一个干净的铁饭盒, 放入若干 1.5 mL EP 管、PCR 管、长柄圆头镊子, 准备蓝枪头、黄枪头、白枪头各 1 盒(用量较少的话可以直接泡进铁饭盒中), 标记好 RNase-free
4. 在锥形瓶中取 1L 去离子水, 通风橱中加入 1 mL DEPC, 配制成 0.1% DEPC 水, 混匀后倒到蓝盖瓶和贴饭盒中, 在蓝盖瓶和贴饭盒中摇晃混匀, 确保与容器壁的充分接触, 并在通风橱中静置过夜

！以下步骤戴口罩+PE 手套操作, 铁饭盒中的东西均用 DEPC 处理的镊子夹取

5. 打开一个小口, 将铁饭盒中的 DEPC 水倒掉, 两个蓝盖瓶盖包铝箔纸并拧松, 铁饭盒扎皮筋包报纸, 枪头盒贴胶带包报纸后, 所有东西做好标记, 放入灭菌锅中, 121°C 高压蒸汽灭菌 30 分钟
6. 灭菌后, 超净台中取出部分 1.5 mL 离心管用于 DEPC 水的分装, 取出后应立刻扣上管盖, 余下的铁饭盒和枪头盒放置于 55°C 烘箱中, 烘干至少 2 天

！DEPC 水处理后的所有容器都应在取用后立即扣盖, 防止空气中的 RNase 污染

7. 分装一瓶蓝盖瓶中的 DEPC 水到 1.5 mL 管中, 蓝盖瓶随开随关, 避免 RNase 污染, 分装后-20°C 保存

Total RNA 的提取

8. 提前配制 1% 琼脂糖凝胶, 准备预冷的 PBS、异丙醇, 预冷小的 4°C 离心机

！之后实验所使用的 EP 管、枪头, 均是 DEPC 水处理过的, 枪头盒随开随关

9. 倒出培养液, 用预冷的 PBS 洗一次, 向 10 cm 皿中加入 1 mL RNAiso Plus (红色液体, 4°C 保存), 轻微晃动, 确保使裂解液均匀分布于细胞表面, 取 **新的细胞刮刀** 剥离细胞, 并将裂解液收集到 1.5 mL 管中, 用移液枪反复吹吸直至裂解液中无明显沉淀

10. 室温(15-30°C)静置 5 分钟, 向匀浆液中加入 200 μ L 氯仿 (双锁柜中保存), 盖紧离心管盖, 颠倒混匀至溶液乳化呈乳白色(粉白色), 室温静置 5 min, 期间准备新的 1.5 mL 管和一个 1.2 mL 的离心配平管
11. 12000g, 4°C离心 15 分钟, 小心取出离心管, 此时匀浆液分为三层, 吸取上清液转移至新的离心管中(约 500 μ L, 不要贪多, 切勿吸出白色中间层)

从离心机中小心取出离心管, 此时匀浆液分为三层, 即: 无色的上清液(水层含 RNA)、中间的白色蛋白层(大部分为 DNA)及带有颜色的下层为红色的苯酚-氯仿层

12. 向上清中加入 0.5-1 mL 异丙醇, 上下颠倒离心管充分混匀后, 室温下静置 10 分钟
13. 12000g, 4°C离心 10 分钟, 离心后试管底部会出现白色的 RNA 沉淀, 小心弃去上清, 切勿触及沉淀, 残留少量异丙醇没有关系
14. 加入 1 mL 75% 乙醇, 轻轻上下颠倒洗涤离心管管壁, 7500 g, 4°C离心 5 min, 后小心弃去上清(黄枪头吸干), 切勿触及沉淀, 关闭 4°C离心机
15. 打开离心管盖, 室温下自然挥发 10 min, 一般呈半透明状即可, 后加入约 30 μ L DEPC 水, 短暂溶解沉淀
! 不能挥发太久, 若太干会不好溶; 挥发后不可以离心或加热干燥, 否则 RNA 将会很难溶解

RNA 质量评估

16. 取 2 μ L RNA, 加入到 78 μ L 水中稀释, 在 NonoDrop 上选择 RNA, 测量浓度(1/40×稀释倍数)
! RNA 样品其 A260/A280 的值一般在 1.8-2.2 之间, 一般 2.0 左右最好
17. 取 1 μ g total RNA 于 PCR 管中加入 Loading Buffer, 后 160V 琼脂糖凝胶电泳 20min

RNA 电泳有变性和不变性两种方式, 变性电泳是根据 RNA 的分子大小对其进行分离的电泳, 对实验体系有较高要求, 其有两种方式进行:

- 在含 2.2 mol/L 甲醛的琼脂糖凝胶中电泳;
- 在含 6.8 mol/L 尿素的聚丙烯酰胺凝胶中电泳;

而本次实验仅为检测 RNA 的提取质量, 可以使用一般的核酸电泳条件, 在该环境下, 大部分 RNA 被降解, 结果出现 2 条带(为 28S 和 18S rRNA), 条带亮度约为 2:1

- 如果核糖体 RNA 条带弥散, 说明可能 RNA 已降解
- 如果条带大小超过 28S, 可能存在基因组 DNA 污染