

总RNA 样本制备操作建议流程

如果客户准备自己提取RNA，请按照各种试剂的产品说明书中的方法进行实验。实验中使用TRIzol、或RNeasy midi kit 等方法进行总RNA 的提取，同样都可以得到高质量的RNA。

一、总RNA抽提 (TRIzol法)

- 1、组织样品，每100mg 组织加入1 ml Trizol，用液氮研磨或采用电动匀浆器充分打碎组织块)。细胞则根据其生长类型(贴壁、悬浮)加入相应量的Trizol。
- 2、每1ml 用于抽提的Trizol 加入200 μ l 的氯仿，上下颠倒充分混匀1 min左右，室温静置5 min。
- 3、4 $^{\circ}$ C，12,000 rpm 离心15 min。
- 4、小心取出上清液，避免触及中间层，将上清液转入新的1.5 ml 离心管，加入等体积的异丙醇，轻轻颠倒混匀，室温静置5 min。
- 5、4 $^{\circ}$ C，12000 rpm 离心10 min。
- 6、吸去上清，保留沉淀，并向沉淀中加入1ml 的70% 乙醇，4 $^{\circ}$ C，12000 rpm 离心15 min 洗涤沉淀。
- 7、吸弃上清，沉淀室温自然晾干后加入适量RNase-free 的水，用Tip 头吹吸，充分溶解沉淀。
- 8、取1-2 μ l 稀释，测定OD260 和OD280值，RNA浓度按以下公式计算： $A_{260} \times 40 \times \text{稀释倍数}$ (ng/ μ l)。RNA纯度用 A_{260}/A_{280} 的比值来判定(一般比值在1.8-2.1)。将溶解有RNA的离心管用封口膜封好，作好相关记录，-80 $^{\circ}$ C冰箱保存待用。

二、(optional)总RNA的纯化 (RNeasy Kit)

通常在使用TRIzol法抽提组织总RNA时，因为方法的限制，造成总RNA的纯度降低。所以建议使用QIAGEN RNeasy®Kit进一步的纯化。详细操作原理和方法见Rneasy Mini Protocol for RNACleanup。

- 1、取总RNA \leq 100 μ g 溶解于100 μ l RNase-free 的水中，再加入350 μ l Buffer RLT 并充分混匀。
- 2、加入250 μ l 无水乙醇，Tip 头充分混匀。

- 3、将共计700 μ l 含总RNA 的溶液转入套在2 ml 离心管内的RNeasy mini 柱子内, ≥ 8000 g 离心15—30sec, 弃去滤过液。
- 4、吸取500 μ l Buffer RPE 到RNeasy mini 柱子内, ≥ 8000 g 离心洗涤15—30sec, 弃去滤过液, 再用500 μ l Buffer RPE 在 ≥ 8000 g 离心洗涤2 min, 弃去滤过液和2 ml 的套管, 将RNeasy mini 柱子转入一新的1.5 ml Eppendorf 管中。
- 5、吸取40 μ l RNase free 的水, ≥ 8000 g 离心洗脱1 min。
- 6、重复步骤5 一次。
- 7、测定OD 值 (通常OD 数值在1.8—2.1 之间), 并做进一步的RNA质量检测。

三、总RNA 提取的注意事项

- 1、用于RNA 提取的试剂及其他物品必须为RNase-free 的, 并且在洁净、不通风的环境中进行实验。
- 2、客户应当选用TRIzol或RNeasy等自己熟悉的或公认可以得到良好实验结果的提取方法进行总RNA 的提取。
- 3、可以根据实际需要选择RNA 的保存方法: 需要长期保存的RNA 样本保存于75 %乙醇中; 无需长期保存的RNA 样本保存于RNase free 的双蒸水或Elution buffer 中。
- 4、建议客户送样时提供保存于RNase free的双蒸水或Elution buffer中的RNA 样本。
- 5、建议客户送样时提供RNA样本的电泳图谱以及相关OD 值等实验数据。
- 6、RNA 样本的保存介质请务必在样本信息登记单上加以说明。
- 7、RNA 样本完全干燥后很难溶于水, 因此不要提供干燥状态的RNA 样本。
- 8、样本到达本公司后, 技术服务平台将在规定的工作日内进行质检。
- 9、经质检证明RNA 样本无法继续实验时, 市场部将及时与客户联系, 协商进一步处理事宜。

由于中间环节中不确定因素的存在, RNA 样本的质量以我公司质检部检测得到的数据为准。

四、RNA样品准备注意事项

RNA酶 (Ribonuclease) 在生物体内广泛存在, 化学性质非常稳定, 无需辅助因

子的存在即可表现出酶活性。由于RNA酶极难被彻底灭活，因此微量RNA酶的污染即可导致RNA样品的降解。任何未经RNA酶灭活处理的实验器具都是潜在的污染源。

无菌操作是RNA实验中的基本原则，空气中的灰尘颗粒和手部往往带有细菌和真菌，成为最常见的RNA酶污染源。操作时应带手套，较长时间的操作过程手套应勤换保持清洁，盛放RNA的离心管除操作时保持密闭，低温操作。

一次性使用的塑料器具

市售的一次性的聚丙烯离心管和移液器枪头经过灭菌和RNA酶的灭活处理，可以不经处理直接使用，建议在RNA操作全程使用。

非一次性使用的塑料器具

重复使用的塑料器具在使用前需经过处理，保证去除RNA酶的污染。可用0.1M NaOH, 1mM EDTA浸洗，再用无RNA酶污染的水彻底冲净。能耐受有机溶剂的塑料器皿可用氯仿浸泡灭活RNA酶。

玻璃器皿

用于RNA操作的玻璃器皿需经RNA酶的灭活处理。首先用洗涤剂清洗，彻底冲净，240° C干烤4小时至过夜。普通的高压灭菌对于大多数的RNA酶是无效的。作为变通方法，可以将玻璃器皿充满0.1%DEPC水，37° C过夜，121° C高压灭菌去除DEPC。

无RNA酶水的制备

DEPC 是一种潜在的致癌剂，通过共价修饰灭活 RNA 酶。常用工作浓度为 0.1%，12 小时 37° C 孵育，121° C 15 分钟使 DEPC 分解为无害的乙醇和二氧化碳。