

3. 预防 RNase 污染, 在实际的操作中应遵循以下指南 (参见《分子克隆》)
 - * 全程佩戴一次性手套。皮肤经常带有细菌和霉菌, 可能污染RNA的抽提并成为 RNA 酶的来源。培养良好的微生物实验操作习惯预防微生物污染。
 - * 使用灭菌的、一次性的塑料器皿和自动吸管抽提RNA, 避免使用公共仪器所导致的RNA酶交叉污染。
 - * 使用无 RNA 酶的非一次性的玻璃器皿或塑料器皿。玻璃器皿可以在 150°C 的烘箱中烘烤 4 小时, 塑料器皿可以在 0.5 M NaOH 中浸泡 10 分钟, 用水彻底漂洗干净后高压灭菌备用。
4. 考虑到环保问题, 本试剂盒不含有实验室常用试剂氯仿, 用户使用前需要自备氯仿。
5. 常规的琼脂糖凝胶电泳和变性胶电泳均可以用来分析 RNA 的质量。好的 RNA 产物在电泳后应该可以看到明显的二条优势核糖体 RNA 带, 分别为~5Kb (28S), ~2Kb (18S), 条带亮度比值约为 2: 1。有时候也可以看到~0.1kb 和 0.3Kb(5S, tRNA)带。但有时候根据不同的物种如某些植物组织可以看到 4, 5 条带也属于正常现象, 如果 RNA 未成熟的前体或者不均一核 RNA、小核 RNA 提取出来也可能看到介于 7Kb 和 15Kb 之间的不连续的高分子量条带。
6. 检测 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 吸光度比值时, RNA 样品应该溶于 TE 后检测, 如果用水稀释后检测, 由于一般水离子强度和 PH 值低, 会使 OD₂₈₀ 升高, 从而使比值降低。
7. 加入裂解液 RL 匀浆后, 加氯仿前, 样品可在 -60°C-70°C 保存一个月以上。

五、操作步骤

* 第一次使用前请先在漂洗液 RW 瓶和 70%乙醇瓶中加入指定量乙醇!

1. 匀浆处理

a. 组织

用玻璃或强力匀浆器搅匀组织样品, 保存于液氮内样品需要用研钵磨碎, 每50~100mg 组织加1ml的裂解液RL后匀浆。组织样品容积不能超过RL容积的10%。

b. 单层生长的细胞

直接往直径3.5 cm的培养板中加入1ml的RL溶解细胞, 并用移液枪轻轻吹打混匀。依据培养板的面积而不是依据细胞的数量来决定所需的RL量 (每10cm²加1ml)。一般情况下, 普通大小的细胞培养瓶, 加入1ml的RL, 迅速轻摇使RL充分和瓶底所有细胞接触裂解细胞并灭活RNA酶, 轻轻用移液枪反复吹打混匀。当RL量不足时可导致抽提的RNA中污染有DNA。

c. 悬浮生长的细胞

通过离心来沉淀细胞。在RL试剂中用移液枪反复吹打来裂解细胞。每5~10×10⁶的动物细胞, 植物或酵母菌细胞或每1×10⁷细菌加1ml的RL。在加入RL前应避免洗涤细胞, 否则会增加mRNA降解的可能性。破裂某些酵母菌和细菌可能需要使用匀浆器。

2. 将匀浆样品剧烈震荡混匀, 在 15 -30°C 条件下孵育 5 分钟以使核蛋白体完全分解。

3. **可选步骤:** 4°C 的条件下 12, 000rpm 离心 10 分钟, 小心取上清转入一个新的 RNase free 的离心管中。

当样品富含蛋白质、脂肪、多糖或是细胞外物质例如肌肉。脂肪组织或植物的块茎部分时可能需要一额外的分离步骤。匀浆化后在 2~8°C 的条件下以 12,000rpm 离心 10 分钟, 移除匀浆中不溶解的物质, 余下的沉淀中包含有细胞外膜、多糖、以及高分子量 DNA, 而上层的超浮游物含有 RNA。

4. 每 1mlRL 加 0.2ml 氯仿。盖紧样品管盖, 剧烈振荡 15 秒并将其在室温下孵育 3 分钟。

5. 于4°C 12,000rpm 离心10分钟, 样品会分成三层: 下层有机相, 中间

层和上层无色的水相，RNA存在于水相中。水相层的容量大约为所加RL体积的60%，把水相转移到新管中，进行下一步操作。

- 加入 1 倍体积 70%乙醇（**请先检查是否已加入无水乙醇!**），颠倒混匀（此时可能会出现沉淀）。得到的溶液和可能沉淀一起转入吸附柱 RA 中（吸附柱套在收集管内）。
- 10,000rpm 离心 45 秒，弃掉废液，将吸附柱重新套回收集管。
- 加入 500 μ l 漂洗液 RW（**请先检查是否已加入无水乙醇!**），12,000 rpm 离心 60 秒，弃掉废液。
- 将吸附柱 RA 放回空收集管中，12,000 rpm 离心 2 分钟，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制酶消化反应。
- （**可选步骤**）加入已配置好的消化液 30 μ l 于**吸附膜的中间部位**，37 $^{\circ}$ C 保温 15-30 分钟。消化液的配置比例：RNase-Free DNase 2 μ l，DNase 10 \times Reaction Buffer 3 μ l，RNase-Free Water 25 μ l；RNase-Free DNase 的用量可根据 DNA 量多少来调节，1 μ lRNase-Free DNase 可以消化 1 μ g 的 RNA，10 \times Reaction Buffer 的量按照比例增减。
- 加入 500 μ l 去蛋白液 RE，室温放置 2 分钟，12,000rpm 离心 45 秒，弃掉废液。
- 加入 500 μ l 漂洗液 RW（**请先检查是否已加入无水乙醇!**），12,000 rpm 离心 60 秒，弃掉废液。
- 重复步骤 12。
- 将吸附柱 RA 放回空收集管中，12,000 rpm 离心 2 分钟，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
- 取出吸附柱 RA，放入一个 RNase-free 离心管中，根据预期 RNA 产量在**吸附膜的中间部位**加 50-80 μ l RNase-free water（事先在 65-70 $^{\circ}$ C 水浴中加热效果更好），室温放置 2 分钟，12,000 rpm 离心 1 分钟。如果需要较多 RNA，可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，离心 1 分钟，或者另外再加 30 μ l RNase-free water，离心 1 分钟，合并两次洗脱液。

二、原理简介

改进的异硫氰酸胍/酚一步法裂解细胞和灭活 RNA 酶，然后总 RNA 在高离序盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜，再通过一系列快速的漂洗—离心的步骤，去蛋白液和漂洗液将细胞代谢物、蛋白等杂质去除，最后低盐的 RNase free water 将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱。

三、试剂盒特点

- 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口世界著名公司特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。
- 结合了异硫氰酸胍/酚一步法试剂稳定性好，纯度高和离心柱方便快捷的优点，不需要异丙醇沉淀和乙醇洗涤过程，RNA 可以直接从离心柱上洗脱避免了过度干燥不易溶解问题。
- 独有的 RL 裂解液配方，可以有效的消除基因组污染。
- 多次漂洗去蛋白过程，提取 RNA 纯度更高。
- 有效的去除了无用的 5S 在总 RNA 中含量，提高了纯度。

四、注意事项（实验前必须首先阅读这部分!）

- 为防止RNA降解，所有离心步骤如未加说明，均在4 $^{\circ}$ C低温进行。使用转速可以达到13,000 rpm的传统台式离心机，如Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
- 裂解液 RL 和去蛋白液 RE 中含有刺激性有害化合物，操作时要戴乳胶手套，**避免沾染皮肤、眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或者生理盐水冲洗。**