

RNAtrip 使用说明书 R1010

描述: RNAtrip 成功避开各种商业 RNA 提取试剂盒的种种弊端, 采用最新技术和工艺, 在提取过程中既能有效裂解组织细胞, 强烈抑制 RNA 酶活性, 保护 RNA 免受降解, 同时也能极为有效地分离去除 DNA 和蛋白质。RNAtrip 使 RNA 分离如同提取质粒 DNA 一样简单可靠, 可在 30-60 分钟内完成, 获得极高纯度的总 RNA 沉淀, 可用于 RT-PCR、Northern Blot、RNA 酶保护、Poly(A) mRNA 纯化、体外翻译等实验。

储存: 4 °C 密封避光保存两年以上有效。因疏忽或冰箱意外停电, RNAtrip 密封避光存放于 25 °C 室温数个月, 品质不受影响。

适用:

- (1) 固体组织 (100 mg/ml): 人、动物、植物的各种新鲜或冻存组织。
- (2) 培养细胞 (5~10×10⁶ 细胞/ml): 真核细胞, 细菌、酵母。
- (3) 液体标本(100 µl/ml): 全血、体液、尿液, 病毒样品等。

用户实验用品和操作准备

极微量的 RNA 酶都会导致 RNA 降解。分离 RNA 时, RNA 酶污染主要来自以下五个方面: (1) 来自实验人员的双手。(2) 来自器皿、吸头离心管、自备液体。(3) 组织细胞破碎不可避免地释放内源 RNA 酶。(4) RNA 未能完全与蛋白质分离。(5) RNA 沉淀和溶解时来自吸头离心管和溶液。我们的 Step by Step 质量监测表明, RNAtrip 可 100% 抑制 RNA 酶活性并在分离步骤完全清除 RNA 酶。因此在有 RNAtrip 存在的步骤中, 使用高压消毒 20 分钟的吸头离心管和溶液即可胜任 RNA 提取操作。然而在 RNA 溶解之后, 来自实验材料的 RNA 酶污染将会导致 RNA 降解, 应严格使用高压灭活 RNA 酶的用品。戴手套无疑是有益的, 但戴口罩和帽子则无必要。只要严格按照本指南进行准备和操作, 使用 RNAtrip 总是能获得高纯度 RNA。

1. 固体组织破碎设备。准备下列装置之一, 1)玻璃匀浆器。必要时泡酸清洁, 用高压灭菌蒸馏水洗涤数次。2)研钵。适用于液氮冻存组织的研磨, 清洗方法同玻璃匀浆器。3)组织细胞超声破碎仪器。探头插入装满蒸馏水的试管或烧杯中, 开启超声清洗探头 30 秒至 1 分钟。4)高速机械匀浆器(Polytron, Tekmar 或类似产品)。打开开关, 在蒸馏水中清洗分散器头数次。对这些装置的部分部件高压消毒 30 分钟是保险的措施, 但使用 RNAtrip 这种处理并不必要。
2. 高压蒸汽 30 分钟消毒一次性吸头离心管。RNA 沉淀和溶解之后, 应严格使用高压消毒的一次性用品。然而 RNAtrip 能在 RNA 酶污染环境下工作, 在裂解步骤可使用未高压但洁净的一次性吸头和离心管, 但仅推荐在紧急情况下这样做。比如由于不可预测的原因, 动物已经处死, 组织已取出, 细胞已收取, 而吸头和离心管尚未高压处理。这仅仅适用于 RNAtrip 试剂, 对其它来源 RNA 提取试剂无效。此时保险做法是使用普利莱基因技术公司的另一种产品——组织 RNA 保护液(Cat# R1030), 用户可把来不及处理的标本保存在 RNA 保护液中, 37 °C 保存 3 天, 25 °C 保存 2 周, 4 °C 保存 4 周, -20 °C 保存数月, 固体或液体标本中 RNA 不会降解。
3. DEPC 处理的双蒸水。加 DEPC 到水中至终浓度为 0.01% v/v, 室温过夜, 高压消毒 30 分钟。用于溶解 RNA, 配制 TE 缓冲液和 75% 乙醇。
4. 普通双蒸水, 高压消毒 30 分钟, 用于冲洗器皿, 配制琼脂糖凝胶和电泳用缓冲液。注意溶液配制后高压灭菌, 但琼脂糖不能高压处理。
5. 异丙醇, 氯仿, 纯乙醇, 分析纯。75% 乙醇用高压消毒蒸馏水配制。
6. 其他用品: 电泳槽, 双蒸水冲洗。离心机和加样器, 无需处理。
7. 冰盒和湿冰。在冰上进行操作有助于减少 RNA 降解。
8. 戴手套。注意某些实验如提取质粒 DNA 使用大量 RNA 酶, 为防污染须特别清洗实验器具和实验区域。

RNA 提取程序

1. 组织细胞破碎与裂解

冰上操作。立即并快速破碎组织至关重要。组织细胞过量不仅使 RNA 得率下降, 还将导致 DNA 和蛋白质污染。在紧急情况下, 如动物已处死, 组织已取出, 细胞已收取, 异地取送标本, 用户尚未做好实验准备时, 推荐用户把组织细胞储存在 RNA 保护液(Cat# R1020)中, 保证标本中的 RNA 不被降解。

(1) 固体组织。按比例每 50-100 mg 组织加 1 ml RNAtrip 试剂。用研钵研磨(仅适用于液氮冻存组织): 组织放在研钵中研成粉末, 加 1 ml RNAtrip 试剂, 继续研磨至组织完全裂解。用玻璃匀浆器匀浆: 加入 RNAtrip 上下手动匀浆组织 10-15 次。用高速机械匀浆器: 将组织放入塑料试管内, 试管置冰浴烧杯中, 加入 RNAtrip 试剂, 将分散器头垂直插入管内与组织块接触, 转速 12,000-20,000 rpm, 上下移动试管 10-20 次, 直到组织完全打散, 无肉眼可见大块。用超声仪: 需根据机器型号进行预试验, 选取有效破碎组织的功率和时间。

注意: (1)通常用 50-100 mg 组织可获得足量的 RNA, 对绝大多数实验目的绰绰有余。加入过量组织或过少 RNAtrip 容易导致提取失败。(2)少量难以打碎的组织碎片不影响后续 RNA 提取。(3)用研钵和玻璃匀浆器匀浆破碎组织时, 应略微多加一些裂解液, 以补充裂解产物粘在容器壁上造成的体积丢失。

(2) 培养细胞。贴壁细胞: 弃培养基, 用 PBS 缓冲液冲洗细胞一次。每 5-10×10⁶ 个细胞加 1 ml RNAtrip 试剂, 但 RNAtrip 加入量必须有效地覆盖瓶皿的细胞表面。一个 75 cm² 瓶皿的细胞通常需要 2 ml 提取液, 一个 35 cm² 瓶皿的细胞需要 1 ml 提取液, 更小的培养瓶皿可使用更少的提取液, 但后续操作会因体积过小而极为不便。晃动或用吸头吹打使提取液流过并裂解所有细胞。置冰上 5 分钟, 倾斜瓶皿使粘稠的裂解物聚于一处以便取出。悬浮细胞: 低速离心收集细胞, 将细胞快速重悬于 50-100µl

的 PBS 或去离子水中, 每 $5-10 \times 10^6$ 细胞加 1 ml RNAtrip 裂解。注意直接裂解未重悬的细胞沉淀, 裂解物将十分粘稠而难以分散。细菌酵母: 离心收集沉淀, 加入 50-100 μ l 去离子水重悬细胞。每 10^7 细胞加入 1-2 ml RNAtrip 直接裂解。某些细菌和酵母细胞可能需要匀浆破碎。

(3) 液体标本: 如体液、尿液、全血。每 100 μ l 液体样品加 1 ml RNAtrip, 置冰上 1-3 分钟。未抗凝的凝固血液按固体组织处理。RNAtrip Liq (Cat# R1020) 产品专门用于液体标本 RNA 提取。

2. 将组织细胞裂解物转移到 1.5 ml 离心管, 置冰上 10 分钟。优化步骤: 如果组织裂解物含较多的碎片, 或提取植物组织, 12,000g 4°C 离心 10 分钟, 取上层裂解液, 弃管底碎片和粘稠 DNA。如果提取脂肪组织, 12,000g 4°C 离心 10 分钟, 小心吸掉最上面的油层, 弃去。再取裂解液, 弃管底碎片和粘稠 DNA。取出的裂解液如带少量油滴不影响提取。

3. 加入 0.2 体积的氯仿(0.2ml), 充分颠倒混匀, 冰浴 5 分钟, 溶液分相。有时分相不明显, 不影响提取。

4. $12,000 \times g$ 4°C 离心 10 分钟, 溶液分为两相。RNA 在上层水相, 下层为有机相, 两相界面是一层薄膜其厚度与组织细胞类型和多少有关。小心吸出 0.5ml 上层水相转移到新离心管。注意: 取上清液时应保留 0.5-1 mm 厚的水相, 以免扰动和吸入下面的碎片和有机相。如果吸入, 应将所取的上清液放回管中并重新离心 10 分钟, 再次吸取水相。这一点至关重要, 违背此原则容易导致 RNA 降解和 DNA 污染。如需同时提取 DNA 或蛋白质, 则保留中间相和下层有机相, 向公司索要操作方法。

5. 加入等体积异丙醇(0.5ml)于上清液充分混匀。冰上孵育 10 分钟沉淀 RNA。用更低的温度和更长的时间进行沉淀并不必要。如果起始组织细胞的量很少, -20°C 放置一至数小时可沉淀几乎所有的 RNA。

注意: 从富含多糖的植物组织或富含糖原的动物肝脏组织提取 RNA 时, 按以下步骤进行: 以每 1 ml RNAtrip 裂解组织, 加氯仿后离心得到约 0.5 ml 上清液计算, 分别加入上清液一半体积即 0.25 ml 的高盐溶液(0.8 M 柠檬酸钠和 1.2 M NaCl)和 0.25 ml 异丙醇, 混匀。执行下面的离心沉淀步骤 6。离心后可有效沉淀 RNA, 但多糖或糖原存留在上清可被弃去。从富含多糖的植物和动物肝脏组织提取 RNA 时, 推荐使用植物 RNA 分离试剂 Plant RNAtrip 或 Plant RNA Extraction Kit。

6. $12,000 \times g$, 4°C 离心 10 分钟。管底可见少许 RNA 沉淀。注意: 如初始组织细胞量少, RNA 将附着在管壁, 用肉眼几乎难辨沉淀, 但不影响实验。如 RNA 沉淀量很多并呈胶冻状, 通常表明有蛋白污染。应仔细检查操作步骤。

7. 弃上清。立即加入 1 ml 用 DEPC 水配制的 75%乙醇, 颠倒混匀数次洗涤沉淀。 $12,000 \times g$ 离心 5 分钟。弃上清, 尽量完全吸去管壁上的液体。注意: 乙醇洗涤后 RNA 沉淀容易漂浮, 勿倒掉或吸走 RNA 沉淀。RNA 沉淀在 75%乙醇中可在 4°C 保存一周或在 -20°C 保存一年。

8. 敞开口空气干燥 5-10 分钟使残留液体挥发, 略微干燥 RNA 沉淀即可。用 50-100 μ l 自备的 DEPC 处理的高压消毒纯水或 TE 溶解沉淀。RNA 溶液可保存于 -70°C 或液氮中。注意: 过分干燥将使 RNA 难以溶解。 55°C 加热或反复冻融数次可以助溶。RNA 溶液加 3 倍体积乙醇冻存于 -20°C , 用时离心沉淀。

说明

- 每 100 mg 组织 RNA 预期得率为: 肝脾 60-100 μ g, 肾 50 μ g, 脑组织 10-15 μ g, 胎盘 20-40 μ g, 脂肪 50 μ g。 1×10^7 个细胞通常得 50-100 μ g。
- 测定 OD 值, 根据 OD260 计算 RNA 浓度。OD260/280 比值可初步判断 RNA 质量, 比值在 1.6-2.0 之间均属正常。起始组织量过大, 或吸取了有机相或碎片, 将使 RNA 样品中蛋白和杂质含量高, RNA 沉淀乙醇洗涤不充分(步骤 7), 均可导致 OD260/280 比值降低。但切记 OD260/280 比值还受很多非质量因素的影响。例如, RNA 用水溶解或 pH 偏酸 OD260/280 偏低, 用 TE 或离子强度较高的溶液溶解时较高, 但均不影响 RNA 后续使用。切记即便是已降解的 RNA, OD260/280 比值也能达到看似完美的 2.0 左右, 因此该比值并非判断 RNA 降解与否最佳的指标。判断 RNA 质量的最佳途径是进行普通 RNA 琼脂糖电泳检查 RNA 完整性。
- 检查 RNA 完整性。取 1 μ g RNA 样品进行 1%普通琼脂糖凝胶电泳。溴化乙锭染色, 紫外灯观察。28S RNA~5 kb 亮度应该约为 18S RNA~2 kb 的两倍, 有时可见 0.1-0.3 kb 的 5S RNA。
- 调整 RNA 溶液的体积或重沉淀 RNA。(1) 加入适量 DEPC 处理过的高压消毒纯水或 TE 缓冲液, 于 RNA 溶液中, 使溶液体积补齐到约 400 μ l; (2) 加入 0.1 体积的 3M 醋酸钠 pH 5.2, 混匀; (3) 加入 2.5 体积的纯乙醇, 混匀; (4) 冰上孵育 10 分钟; (5) 执行上述 RNA 提取程序的步骤 6-8。
- RNAtrip 勿直接接触皮肤和吸入。如接触皮肤, 立即用大量水清洗。