血液总 RNA 提取试剂 R1040

描述：血液总 RNA 提取试剂特别加强了对液体标本如全血等 RNA 的提取能力。直接将液体标本与血液总 RNA 提取试剂混合即可，极大简化了样品的提取前处理过程。并且其提取能力强大，甚至可以从已经凝固的血液块中提取出高纯度的 RNA。使用方法与 RNAtrip 和 TRIzol 相似，可在 30－60 分钟内完成。获得的高纯度总 RNA 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 密封避光保存一年以上有效。

适用：液体标本(200 µl/ml): 全血、体液、尿液，悬浮细胞、病毒微生物样品等。

操作准备：

极微量的 RNA 酶都会导致 RNA 降解。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 LS 试剂可 100％抑制内源性和实验用品引入的外源 RNA 酶污染，并在随后的分离步骤极为有效地清除蛋白包括 RNA 酶。因此在有 RNAtrip LS 存在的情况下高压消毒 30 分钟的吸头离心管和溶液，可以胜任 RNA 提取操作。然而，一旦离开 RNAtrip LS 试剂的保护，如在沉淀和溶解步骤，来自吸头离心管和液体的 RNA 酶污染可能导致 RNA 降解。因此在这些步骤应严格使用高压消毒用品。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 LS 试剂总是能获得完整的高纯度总 RNA。这里描述的仅是**针对血液总 RNA 提取试剂的实验准备方案，对其它来源 RNA 提取试剂未做全面检查**。

1. 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 LS 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。由于不可预测的原因，如动物已经处死，组织已取出，细胞已收取，而吸头和离心管尚未高压处理。这仅适用于 RNAtrip LS 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公司的组织 RNA 保护液(Cat# R1030)，把来不及处理的标本保存在 RNA 保护液中，25 ºC 保存 2 周，4 ºC 保存 4 周，－20 ºC 保存数月，标本中 RNA 不会降解。
2. 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。
3. 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。
4. 冰盒和湿冰。在冰上进行操作有助于减少 RNA 降解。
5. 异丙醇，氯仿，纯乙醇，分析纯。75％乙醇用高压消毒的蒸馏水配制。
6. 其它用品：电泳槽，双蒸水冲洗。离心机和加样器，无需处理。
7. 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

液体标本：全血、体液、尿液，悬浮细胞、病毒微生物样品等。每 200µl 液体样品加 1 ml RNAtrip LS，置冰上。未抗凝的凝固血液按固体组织处理。

1. 将裂解物转移到 1.5 ml 离心管，置冰上 10 分钟。如需暂停操作，裂解物可冻存于－70 ºC 至少一个月。
2. 加入 0.2 体积的氯仿(0.2ml)，充分颠倒混匀，冰上孵育 1－5 分钟，溶液开始分相。有时分相不明显，不影响提取。

离心 12,000g 4 °C 10 分钟，溶液分为两相。RNA 保留于上层无色透明水相约 0.6ml，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。小心吸出上层水相转移到新离心管，但应留 0.5－1 mm 厚水相，以免扰动和吸入下面的碎片和无机相。*如吸入无机相和碎片，应将所取水相放回管中并重新离心 10 分钟，再吸取水相。这一点至关重要，违背此原则容易导致 RNA 降解和 DNA 污染。*

3. 加入等体积异丙醇(0.5ml)于含有上清的新离心管中，充分混匀。冰上孵育 10 分钟绰绰有余。但－20 °C 放置一至数小时，可回收几乎所有的 RNA。如需尽可能多的 RNA，或起始组织细胞的量很少，或用户需要暂停操作时，可以这样做。用更低的温度和更长的时间进行沉淀并不必要。
4. 离心, 12,000g，4 °C，10 分钟。小心弃上清，管底可见少许黄白色 RNA 沉淀。如初始组织细胞量少，RNA 沉淀用肉眼几乎难辨，但不影响实验。
5. 洗涤沉淀。立即加入 1 ml 75%乙醇，颠倒混匀数次，12,000g 5 分钟。弃上清，尽量吸去管壁上的液体。乙醇洗涤后 RNA 沉淀容易漂浮，勿倒掉 RNA 沉淀。此时可将 RNA 沉淀保存在 75%乙醇中，4 °C 一周或－20 °C 一年。
6. 敞开管口空气干燥 5-10 分钟，RNA 沉淀干燥至胶冻状即可。过分干燥将使 RNA 难以溶解。用 50-100 µl DEPC 处理的高压消毒纯水或 TE 溶解沉淀。如 RNA 难溶，可 55 °C 加热 10 分钟，或反复冻融数次助溶。RNA 溶液可保存于－70 °C 或液氮中；或加 3 倍体积乙醇－20 °C 冻存，用时离心沉淀。
7. 测定 OD 值。计算 RNA 浓度和 OD260/280 比值。RNAtrip LS 提取的 RNA 绝少蛋白污染，比值通常在 1.6－2.0 之间均属正常。*OD260/280 比值受很多因素影响。起始组织量过大或 RNAtrip LS 试剂过少，或吸取了有机相或碎片，将使 OD260/280 比值降低，应预以避免；RNA 用水溶解或 pH 偏酸 OD260/280 偏低，而用 TE 或离子强度较高的溶液溶解时该比值较高，但均不影响 RNA 使用。用户应该知道，即便是已降解的 RNA，该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 降解与否的指标。可进行 RNA 琼脂糖电泳检查 RNA 完整性(见说明 2)。*

说明：

1. 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 8)，均可导致 OD260/280 比值降低。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。
2. 检查 RNA 完整性。取 1 µg RNA 样品进行 1－1.5%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。
3. 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 µl；(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) 12,000g 4 °C 离心 10 分钟，弃上清；(6) 执行上述 RNA 提取程序的步骤 6－8。
4. RNAtrip LS 勿直接接触皮肤和吸入。如接触皮肤，立即用大量水清洗。
5. 可连续提取蛋白质和基因组 DNA，可向普利莱基因公司索要说明书。