

# 利用 Trizol 抽提 RNA 制备 cDNA

## RNA 抽提

### 一、准备工作

氯仿、异丙醇、75%乙醇、无 RNase 的水或者 0.5%SDS(溶液均需用 1%DEPC 处理过的水配制)

### 二、操作步骤:

1. 匀浆处理:
  - a) 将组织在液氮中磨碎，每 50-100mg 组织加入 1ml TRIzol，用匀浆仪匀浆处理（样品体积不应超过 TRIzol 体积 10%）；
  - b) 单层培养细胞直接在培养板中加入 TRIzol 裂解细胞，每 10cm<sup>2</sup> 面积（即 3.5cm 直径的培养板）加 1ml，用移液器吸打几次（TRIzol 的用量应根据培养板面积而定，不取决于细胞数；TRIzol 加量不足可能引起提出取得的 RNA 有 DNA 污染）；
  - c) 细胞悬液离心细胞，每 5-10×10<sup>6</sup> 动物、植物、酵母细胞或者 1×10<sup>7</sup> 细菌细胞加入 1ml TRIzol，反复吸打。加 TRIzol 之前不要洗涤细胞以免 mRNA 降解。一些酵母和细菌细胞需用匀浆仪处理
2. 将匀浆样品在室温（15-30℃）放置 5min，使核酸蛋白复合物完全分离（**可选步骤：**如样品中含有较多卵白质，脂肪，多糖或者胞外物质（肌肉，植物结节部分等）可于 2-8℃10000×g 离心 10min，取上清。离心得到的沉淀中包孕细胞外膜，多糖，高分子量 DNA，上清中含有 RNA。处理脂肪组织时，上层有大量油脂应去除。取澄清的匀浆液举行下一步操作。）
3. 每使用 1ml TRIzol 则加入 0.2ml 氯仿，剧烈振动 15s，室温放置 3min；
4. 2-8℃10000×g 离心 15min。样品分为三层：底层为黄色有机相，上层为无色水相和一个中间层。RNA 主要在水相中。实验步骤中，水相体积约为所用 TRIzol 试剂的 60%；
5. 把水相转移到新管中，（如要分离 DNA 和蛋白质可保留有机相，进一步

操作见后), 用异丙醇沉淀水相中的 RNA, (异丙醇的量应根据吸出的上清的量来决定, 等体积加入), 室温放置 10min;

6. 2-8°C10000×g 离心 10min, 离心前看不出 RNA 沉淀, 离心后在管侧和管底出现胶状沉淀, 移去上清;
7. 用 75%乙醇洗涤 RNA 沉淀。每使用 1ml TRIzol 至少加 1ml 75%乙醇。2-8°C不超过 7500×g 离心, 5min, 弃上清;
8. 室温放置干燥或者真空抽干 RNA 沉淀, 室温放置大约晾 5-10min 即可。不要真空离心干燥, 过于干燥会引起 RNA 的溶解性大大减低。加入 25-200μl 无 RNase 的水或者 0.5%SDS, 用枪头吸打几次, 55-60°C放置 10min 使 RNA 溶解。如 RNA 用于酶切反应, 勿使用 SDS 溶液。RNA 也可用 100%的去离子甲酰胺溶解, -70°C保存。

**注意:**

- 1) 从少量样品 (1-10mg 组织或者  $10^2$ - $10^4$  细胞) 中提出取得 RNA 时可加入少许糖原以促进 RNA 沉淀。例如加 800 ul TRIzol 匀浆样品, 沉淀 RNA 前加 5-10μg RNase-free 糖原。糖原会与 RNA 一同沉淀出来, 糖原浓度不高于 4mg/ml 是不影响第一链的合成, 也不影响 PCR 反应。
- 2) 匀浆后加氯仿之前样品可以在 -60 至 -70°C 保存至少一个月。RNA 沉淀可以保存于 75%乙醇中 2-8°C 一星期以上或者 -5 至 -20°C 一年以上。
- 3) 分层和 RNA 沉淀时也可使用台式离心机, 2600×g 离心 30-60min。预先期待产量: 1mg 组织或者  $1 \times 10^6$  细胞提出取得 RNA 分别为: 肝和脾 6-10μg, 肾 3-4μg, 骨骼肌和脑组织 1-1.5μg, 胎盘 1-4μg, 上皮细胞 8-15μg, 成纤维细胞 5-7μg。

### 三、常见问题分析:

1. 得率低:
  - a) 样品裂解或者匀浆处理不彻底;
  - b) RNA 沉淀未完全溶解。
2. A260/A280<1.65:
  - a) 检测吸光度时, RNA 样品没有溶于水, 而溶于了 TE 中。低离子浓度和低 pH 值前提下 A280 值偏高;

- b) 样品匀浆时加的试剂量太少;
  - c) 匀浆样品时未在室温放置 5min;
  - d) 吸取水相时混入了有机相;
  - e) RNA 沉淀未完全溶解。
3. RNA 降解:
- a) 组织取出后没有及时处理或者冷冻;
  - b) 待提出取得 RNA 的样品没有保存于-60 至-70°C,而保存在了-5 至-20°C;
  - c) 细胞在用胰酶处理时过度;
  - d) 溶液或者离心管未经 RNase 处理。
4. DNA 污染:
- a) 样品匀浆时加的试剂量太少;
  - b) 样品中含有有机溶剂(如乙醇,DMSO 等),强缓冲液或者碱性溶液。
5. 蛋白质和多糖污染:

沉淀 RNA 的历程中作以下改进可去除这些污染,步骤中,每一使用 1ml TRIzol 在水相中加 0.25ml 异丙醇和 0.25ml 高盐溶液(0.8M 柠檬酸钠和 1.2M NaCl)混淆离心,按之前操作举行。这类方法可使蛋白质和多糖留在溶液中,高效沉淀出纯 RNA。

## RNA 检测

1. 抽完 RNA 后首先拿 nanodrop 检测 RNA 纯度。DNA、RNA 的 A260/A280、A260/A230 比值均需在 2.0 左右为最好,同时记录好浓度;
2. 跑胶鉴定 RNA 质量。注意用新的 buffer 配胶、跑胶,使用 RNA 专用 loading buffer,抽提较好的 RNA 可以看到明显的两条核糖体带;
3. 需反复使用的 RNA 建议分装冻于-80°C,抽完 RNA 后建议立即进行逆转录。

## 去除基因组 DNA

若之后进行逆转录以及 PCR 乃至定量 PCR,涉及的引物对不跨越内含子,为避免 DNA 的影响,需使用 DNaseI除去 DNA。实验室使用 premeqa 的试剂盒,

并有自带 protocol，实验大致过程如下：

1. 反应体系：

溶于水或者 TE 的 RNA	1–8 $\mu$ l
RQ1 RNase-Free DNase 10X Reaction Buffer	1 $\mu$ l
RQ1 RNase-Free DNase	1u/ $\mu$ g RNA
Nuclease-free water to a final volume	10 $\mu$ l

2. 配好后在 37°C 放置 30min;

3. 加入 1 $\mu$ l RQ1 DNase Stop Solution 终止上面的反应;

4. 65°C, 10min 使 DNase 失活。

## 逆转录

根据试剂盒配套 protocol 计算好自己要加入的 RNA 以及各种引物的体积。

一般情况罗列如下：

1) oligo(dT) (50 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
random primers (10 $\mu$ M)	4 $\mu$ l
gene-specific primer (GSP 10 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ l
dNTP	
RNA	10 pg–5 $\mu$ g
	(一般 200ng

左右即可)

RNAase Free Water	补水至 13 $\mu$ l
-------------------	----------------

2) 65°C for 5min, 立即放在冰上 1min

3) 5X First-Strand Buffer	4 $\mu$ l
0.1 M DTT	1 $\mu$ l
RNaseOUT	1 $\mu$ l
SuperScript™ III RT	1 $\mu$ l

注意：其中 SuperScript™ III RT 的使用量可以酌情调整，若只是逆转录短的片段，使用 0.5  $\mu$ l 即可，若使用 gene-specific primer 或者 oligo(dT)逆转大于 5 kb 的片段则建议使用 2 $\mu$ l SuperScript™ III RT。

- 4) 若使用了 random primer 则混合液需先 25°C, 5min; 其他引物均 50°C 放置 30–60min。时间依据片段大小可做相应调整。若想提高特异性, 可采用 55°C 进行逆转录;
- 5) 70°C, 15min 失活酶;
- 6) 接着可以进行第二链合成或者稀释逆转录产物 (即 cDNA) 用于 PCR 以及定量 PCR。