

实验二

动物**总**RNA**抽提**与**定量**

(1) 实验目的

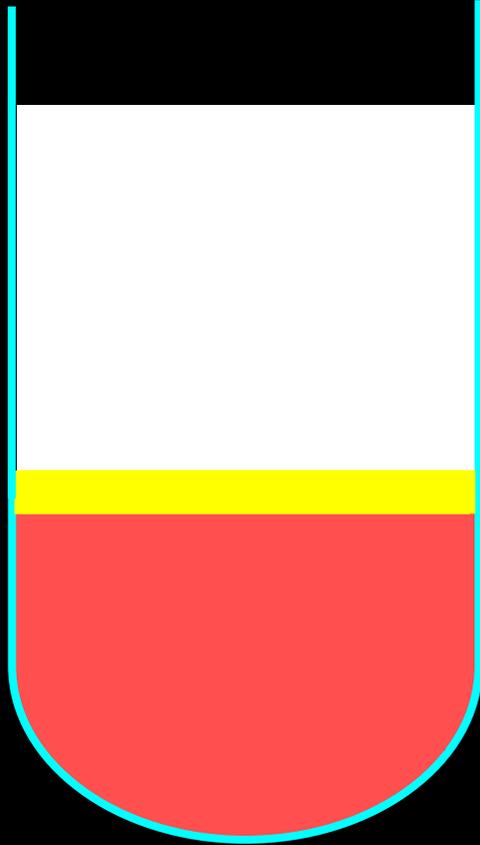
通过本实验：

- (1) 学习总RNA分离的**原理**；
- (2) 掌握**TRIZOL**法总RNA提取的方法；
- (3) 掌握RNA的琼脂糖凝胶电泳技术；
并识别与DNA琼脂糖凝胶电泳技术的**区别**

(2) 基本原理

TRIZOL 是一种总 RNA 抽提试剂，能够直接从细胞或组织中提取总 RNA。TRIZOL 内含异硫氰酸胍 (Guanidine thiocyanate) 等物质，能迅速破碎细胞，抑制细胞释放出的核酸酶。TRIZOL 的主要成分是酚，主要作用是裂解细胞，使细胞中的蛋白，核酸物质解聚得到释放。酚虽可有效地变性蛋白质，但是它不能完全抑制 RNA 酶活性，因此 TRIZOL 中还加入了 8-羟基喹啉、异硫氰酸胍、 β -巯基乙醇等来抑制内源和外源 RNase。

它在破碎和溶解细胞时能保持RNA的完整性。加入氯仿后离心，样品分成水样层和有机层。RNA存在于水样层中。收集上面的水样层后，RNA可以通过异丙醇沉淀来获得。在除去水样层后，样品中的DNA和蛋白也能相继以沉淀的方式获得。乙醇沉淀能析出中间层的DNA，在有机层中加入异丙醇能沉淀出蛋白。



RNA (Isopropanol)

DNA (Ethanol)

Protein (Isopropanol)

(3) 主要仪器与试剂

- (液氮罐、研钵)
- 一次性手套、微量移液器、Tips、离心管、台式冷冻高速离心机
- 微波炉、水平电泳装置，电泳仪、紫外透射仪、分光光度计等。
- TRIZOL、氯仿、异丙醇、75%乙醇、DEPC水、TAE电泳缓冲液、Goldview、上样缓冲液、琼脂糖等

Diethylpyrocarbonate

- 焦碳酸二乙酯
- covalent modification of histidine (most strongly), lysine, cysteine and tyrosine residues
- **Inactivate RNase**
- 0.1% v/v DEPC for at least 2 hours at 37°C and then autoclaved (at least 15 min) to inactivate traces of DEPC

RNase-free

(4) 实验操作步骤 (细节)

1) 组织匀浆化:

各取一管分装好的斑马鱼组织。（助教已统一准备好：取新鲜动物组织块，剪取，称量。把样品放入液氮并在液氮里用研钵，研磨棒将样品磨成粉状。加入**TRIZOL**，上下轻摇晃混匀。离心，上清液分装到小管子，每管1 ml）。

（每50-100 mg 组织共加 **1 ml** 的 Trizol。匀浆化时组织样品容积不能超过 Trizol 容积的10%）

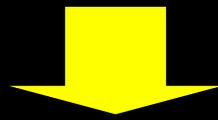


2) 分离阶段 (重复2x) [★] :

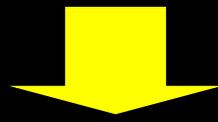
- 将匀浆样品在 15~30°C 条件下孵育 5 mins 以使核蛋白体完全分解。
- 每 1 ml Trizol 加 0.2 ml 氯仿。盖紧样品管盖，用手用力剧烈摇晃试管 15 secs 并将其在 30°C 下孵育 2~3 mins。
- 在 4°C 以不超过 12,000 × g 的离心力高速冷冻离心 15 mins。离心后混合物分成三层：

- 下层红色的**苯酚-氯仿**层，中间层白色的**变性蛋白**，上层无色的**水样层**。

- **RNA** 无一例外地存在于水样层当中。水样层的容量大约为所加 **Trizol** 容量的 **60%**。

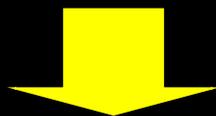


- 将 **500 μ l** 水样层转移到新管中 (如果希望分离DNA和蛋白, 有机层要予以保留)。
- 加入**等体积的氯仿 (500 μ l)**。**盖紧**样品管盖, 用手用力剧烈摇晃试管 15 secs 并将其在 30°C 下孵育 2~3 mins。
- 在 4°C 以不超过 $12,000 \times g$ 的离心力高速冷冻离心 15 mins。离心后混合物分成**三层**

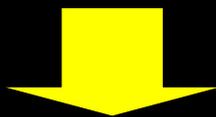


3) RNA的沉淀（通过将水样层和异丙醇混合）：

- 将 400 μl 水样层转移到新管中（如果希望分离DNA和蛋白，有机层要予以保留）。
- 以最初 1 ml Trizol 对应加入0.5 倍体积 (0.5 ml) 的异丙醇。将混合的样品在 15~30°C 条件下孵育 10 mins，并在 4°C, 12,000 $\times g$ 的离心力高速冷冻离心 10 mins。RNA沉淀在离心前通常不可见，离心后形成一胶状片状沉淀附着于试管壁和管底。



4) RNA的洗脱: 移去上层悬液。每 1 ml 的 Trizol 至少加 **1 ml** 的75%乙醇。振荡混合样品并在 4°C 下以不超过 $7,500 \times g$ 的离心力离心 5 mins, 弃上清。(重新放进离心机轻甩, 用白枪头在RNA沉淀**对面**的位置小心吸掉剩余的乙醇)



5) RNA的再溶解: 盖子打开, 把管子放在 55~60°C 下孵育 1 min。(不能让RNA沉淀完全干燥那样会极大地降低它的可溶性)。加入 **50 μ l** 无 RNA 酶水(DEPC H₂O), 放在55~60 °C下孵育 5 mins.

6) 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳分析总RNA

(a) 配制 1.2% 变性琼脂糖凝胶 (40 ml)

- 称取 0.48 g, 加入 25.2 ml DEPC 水, 4 ml 5X 电泳缓冲液, 加热使溶解, 稍冷却加入**甲醛** 3.4 ml, 混匀, 室温凝固 0.5-1 h。

(b) RNA电泳检测样品制备

- RNA 2 μ l, **甲醛** 2.5 μ l, **甲酰胺** 7.5 μ l, **10 \times MOPS** 2 μ l, RNA Loading Buffer 2 μ l, 灭菌的DEPC水 4 μ l, (EB). 混合液轻轻混匀并离心, 放于 **65 $^{\circ}$ C** 下温育 5 -10 mins 后, **立即**置于冰上。

(c) 将上述样品加入加样孔中，电泳 (130V, 100mA) 50 mins。用已知大小的RNA作为分子量标准参照物 (RNA marker)。

(d) 电泳结束，将胶置于紫外灯下照像。

为什么要变性胶电泳？

因为RNA分子有二、三级结构可以影响其电泳结果，因此电泳时应在变性剂存在下进行，常用的变性剂为甲醛和甲酰胺。

实际操作

- RNA 甲醛变性电泳改为普通琼脂糖电泳 (DNA)
- 每人电泳样品：
 - ★ RNA 20 μ l + 4 μ l loading buffer: Load 20 μ l



7) RNA的分析和定量:

- OD_{260}/OD_{280} 在 **1.9-2.1** 视为纯度高的RNA。
如需精确化, 只有浓度在 $40 \mu\text{g/ml}$ 以上的样品适于用光度计测定。
- 如 RNA 样品 OD_{260}/OD_{280} 的比值**太小**, 说明有**蛋白污染**。比值大于 **2.1**, RNA 则可能被**降解**。
- $OD_{260}/OD_{280} < 1.8$, 说明有**酚和/或 8-羟基喹啉污染**

(5) 结果分析

- 1) 比较DNA和RNA提取方法，掌握原理。**
- 2) 分析提取的RNA结果，即完整性，产量和纯度。**

(6) 实验原理

在大肠杆菌中，

rRNA 量占细胞总 RNA 量的 **75-85%**；**tRNA** 占 **15%**，**mRNA** 仅占 **3-5%**。

真核生物中，

有4种rRNA，分别是5S、5.8S、18S和28S，分别具有大约120、160、1,900和4,700个核苷酸。电泳时，常见5.8S、18S和28S三条带，而5S易分解。

RNA电泳可以在变性及非变性两种条件下进行。非变性电泳使用1.0%-1.4%的凝胶，不同的RNA条带也能分开，但无法判断其分子量。只有在完全变性的条件下，RNA的泳动率才与分子量的对数呈线性关系。因此要测定RNA分子量时，一定要用变性凝胶。在需快速检测所提总RNA样品完整性时，配制普通的1%琼脂糖凝胶即可。

参考：鼎国公司Trizol使用说明书

- 从组织中提取总RNA

- 1) 液氮研磨，组织块直接放入研体中，加入少量液氮，迅速研磨，待组织变软，再加少量液氮，再研磨，如此三次，按50-100mg组织/ml Trizol加入Trizol，转移入离心管进行第2步操作。

- 2) 匀浆：组织样品按 50-100mg/mlTrizol 加入Trizol，另外，组织体积不能超过 Trizol 体积的10%，否则匀浆效果会不好，用电动匀浆器充分匀浆约需1-2分钟。

操作步骤

- 1) 细胞或组织加 Trizol 后，室温放置 5 mins，使其充分裂解。注：此时可放入 -70°C 长期保持。
- 2) 12,000 g 离心 5 mins，弃沉淀。
- 3) 按 200 μl 氯仿/ml Trizol 加入氯仿，振荡混匀 15 secs, 室温放置 15 mins。注：禁用漩涡振荡器，以免基因组DNA断裂。
- 4) 4°C 12,000 g 离心 15 mins。
- 5) 吸取上层水相，至另一离心管中。
注：(a) 千万不要吸取中间界面；(b) 若同时提取DNA和蛋白质，则保留下层酚相存于 4°C 冰箱,若只提RNA, 则弃下层酚相。

- 6) 按 0.5 ml 异丙醇/ml Trizol 加入异丙醇混匀，室温放置 5-10 mins。
- 7) 4°C 12,000 g 离心 10 mins，弃上清，RNA沉于管底。
- 8) 按 1ml 75%乙醇/ml Trizol加入75%乙醇，温和振荡离心管，悬浮沉淀。
- 9) 4°C 8,000 g 离心 5 mins，尽量弃上清。
- 10) 室温晾干或真空干燥5-10min。注：RNA样品不要过于干燥，否则很难溶解。
- 11) 可用 50 μ l H₂O，TE buffer 或 0.5%SDS 溶解RNA样品，55-60°C 5-10 mins。注：H₂O、TE或 0.5% SDS 均须用 DEPC 处理并高压。

12) 测OD值定量RNA浓度。

注 (a) 此方法提取RNA A_{260}/A_{280} 值在 1.6-1.8 之间。

(b) 产率估计：组织标本 ($\mu\text{g RNA}/\text{mg 组织}$):

1-10 μg ，培养细胞 ($\mu\text{g RNA}/10^6 \text{ Cell}$) : 5-15 μg 。

注意事项

- 1、组织或细胞量过少，可酌情减少Trizol用量。
- 2、组织或细胞用量过多，会引起DNA对RNA的污染。
- 3、高蛋白，脂肪或多糖类组织，肌肉组织或块状植物组织等，组织匀浆或液氮研磨后须4℃ 12000离心10min去掉不溶物，再进行下面操作，若顶层有脂肪物，则也须去掉。
- 4、热天提RNA，带手套是必须的，手是RNase的主要来源。
- 5、组织块用液氮研磨，效果最好，若没有液氮或电动匀浆器，可用手动匀浆器代替，此时组织块不宜过大，且需先用眼科剪将组织绞碎，然后再充分研磨。