



RNA 提取方法汇总以提取注意事项

RNA 提取原理和方法汇总

高浓度蛋白质变性剂(如异硫氰酸胍、盐酸胍等)的裂解方法,是抽提 RNA 的首选。总 RNA 的抽提,最重要的是快速裂解细胞,释放出 RNA。高浓度蛋白质变性剂能快速破坏细胞膜,进而迅速抑制住细胞内的 RNA 酶,确保了 RNA 的完整性。除了极少量不适用该方法的样品—主要是植物,其它绝大部分样品的 RNA 的提取,都基本是以高浓度的蛋白质变性剂为基础。

RNA 的提取试剂(盒)可以追溯到上世纪 80 年代,结过 20 多年的发展,目前已经形成了比较经典的两类试剂(盒):一类是 TRIzol 方法 (Invitrogen 公司最先开发),以异硫氰酸胍和苯酚为裂解液主要成分的一步法 RNA 提取试剂;另外一类 Qiagen 公司开发的:以异硫氰酸胍或盐酸胍进行裂解,不需要酚氯仿抽提,离心柱上用 DNA 酶消化基因组 DNA,然后漂洗纯化的方法。还有一种综合方法救生衣是在 TRIzol 基础上加了离心柱,能很好地提高 RNA 的纯度和操作的重复性和稳定性。

二、避免 RNA 降解的注意的事项

1. 使用正确的细胞或组织储存条件

在样品用液氮瞬间冻结之后,应该储存在-80°C,千万不能解冻。即使是置于含有胍盐的裂解液中作匀浆前的短暂解冻,也会导致 RNA 的降解和损失。瞬间冻结的组织应该首先在超低温条件下先研磨成粉,然后置于裂解液中进行匀浆。RNAfixer 使样品储存更为便利。储存在 RNAfixer 中的细胞或组织可在室温下稳定保存长达 1 个星期,在 4°C 可稳定保存长达 1 个月,或永久保存在-20°C。

2. 消除环境 RNase 的污染

为了得到完整的、高品质 RNA,在整个 RNA 制备过程中,当 RNA 离开强蛋白变性剂(如离液裂解液或酚)的保护时,避免引入新的 RNase 污染就非常关键。由于 RNase 几乎是无所不在,所以必须确保与纯化的 RNA 接触的每一样东西都是无 RNase 污染的。所有的表面,包括移液器、工作台、玻璃器皿和制胶设备,都必须用表面去污净化溶液如 RNase 喷雾清除剂来处理过,去除各种溶液或者反应缓冲液中可能存在的 RNase 污染,可以用 RNAsafe。必须保证一直使用无 RNase 的枪头、试管和溶液,手套也应经常更换。

3. 迅速灭活内源的 RNA 酶,以防止 RNA 降解。

以下 3 个方法均可有效使内源 RNA 酶失活:

- 1) 用含离液(如胍盐)的细胞裂解液收获样品,并立即匀浆。
- 2) 用液氮瞬间冻结样品。值得特别注意的是:组织块必须保证足够小,在浸入液氮的瞬间就能冻结,以确保瞬间令 RNA 酶失活。
- 3) 立即将样品置于 RNAfixer 无液氮 RNA 样品储存液中。它是一种水相、无毒的收集试剂,能立即稳定并保护完整、未冻结的组织 and 细胞样品中的 RNA。关键要点是组织样品切片一定要够薄(<0.5 cm),这样 RNAfixer 才能在 RNase 破坏 RNA 之前迅速渗入组织块中。



4. 选择合适破壁方法

细胞或组织的彻底匀浆对 RNA 提取来说，是一个很关键的步骤，它能够防止 RNA 的损失和降解。匀浆的方法应根据细胞或组织的类型来选择。大部分培养的细胞可以置于细胞裂解液中，通过简单的涡旋震荡来匀浆；而动物组织、植物组织、酵母和细菌、真菌则常常需要更加剧烈的方法，通常用液氮研磨。比如说细菌（特别是革兰氏阳性菌）的细胞壁，就需要溶菌酶消化来实现彻底的细胞裂解和 RNA 的最大回收，酵母提取时加入破壁酶帮助破壁。

5. 选择最适 RNA 提取试剂（盒）

现有众多的 RNA 分离方法也许令人难以取舍。目前最简单也是最安全的方法是柱式分离，也就是结合基于 Trizol 原理的裂解液和硅胶膜吸附柱的使用，是目前比较通用的一种方法。对于动物细胞，组织，植物叶片等常用材料都基本适用。植物 RNA 的提取比较难抉择，像根和果实等，由于多糖，多酚物质的存在，很难纯化；还有就是血清等液体样本的提取，水分多或者 RNA 含量少等，较难提取。可以采用针对性的试剂（盒），或者委托信诺金达公司进行提取。

6. 低浓度 RNA 的沉淀

纯化得到的 RNA 可能需要通过沉淀来浓缩，以满足一些下游应用的需要。醋酸铵(NH_4OAc)沉淀（加 0.1 体积的 5M 醋酸铵、2-2.5 体积的无水乙醇， -20°C 放置 25 分钟以上）可以很好地回收 RNA。如果需要定量回收低浓度的 RNA (ng/ml)，可以采用共沉淀（如 linear acrylamide 糖原 glycogen、酵母 yeast RNA）的方法。核酸助沉剂是 linear acrylamide，当 RNA 用于 RT-PCR 分析时，线性的丙烯酰胺和 DNase 处理的糖原都可以作为理想的共沉淀剂，因为它们都不含 DNA 污染，糖原含量高会抑制 PCR 反应，应注意控制浓度，核酸助沉剂对 PCR 无影响，成为病毒核酸提取的首选。酵母 RNA 和未处理的糖原会给样品带来核酸污染，有可能影响 RT-PCR 的结果。沉淀后，注意避免 RNA 沉淀过分干燥，因为这可能导致很难重新溶解。

7. 提取好的 RNA 如何储存

RNA 最好是提取完成后，立刻进行下游实验。如果只是短期储存，重悬的 RNA 应放置于 -20°C ；如果是长期储存的话，就应该放置于 -80°C 。储存 RNA 时，可以加入少量的 RNA 酶抑制剂防止 RNA 的降解。

北京信诺金达生物科技有限公司

地址：北京海淀区东北旺南路一号院北 321

电话：010-62419956 传真：010-62419956

www.sinogenesci.com info@sinogenesci.com