RNA提取

目 的

- 完整RNA的提取和纯化,是进行RNA方面的研究工作如Nothern杂交、mRNA分离、定量PCR、cDNA合成及体外翻译等的前提。
- 掌握从组织或细胞中提取总RNA和mRNA反转录的方法
- 熟悉紫外吸收法检测RNA浓度与纯度的原理及测定方法
- 掌握RT-PCR基因扩增的原理和过程

实 验 流 程

提 取 总RNA → 定量 → 合成 cDNA 第一链 → PCR → 电泳

提取原理 操作步骤	计算方法 操作步骤	逆转录原理 操作步骤	原理体系 引物选择	电泳原理 电泳步骤

第一部分

小鼠肝脏总RNA的提取及定量

原 理

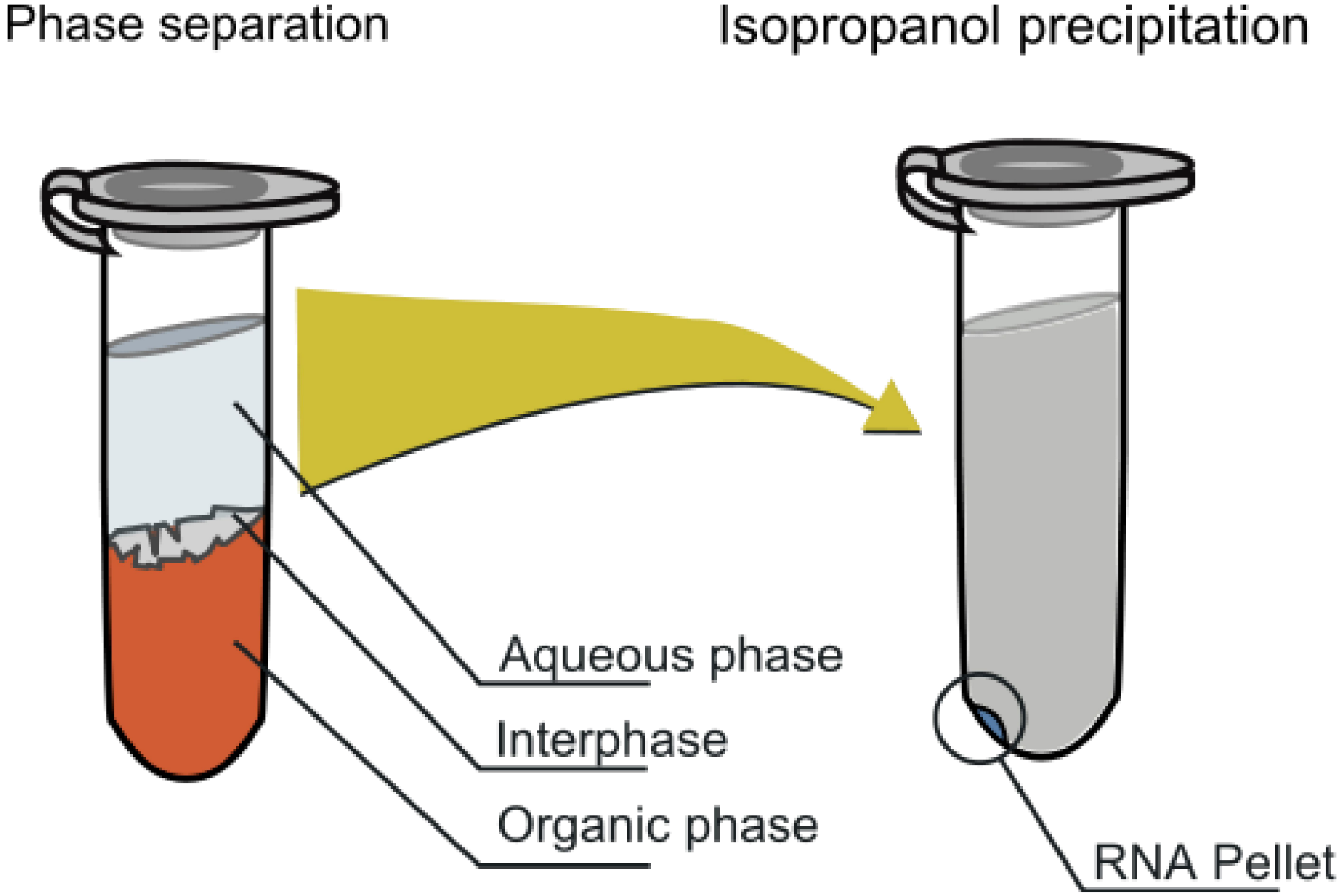
- 10^{-5}μg RNA/细胞
  - rRNA 80-85%：28S 18S 5S
  - tRNA, snRNA 10-15%
  - mRNA 1-5%
- mRNA 3’端存在20-250个多聚腺苷酸(polyA) 结构，可用oligo(dT)亲和层析柱分离mRNA。
- RNA分离的方法：异硫氰酸胍氯化铯超速离心法，盐酸胍-有机溶剂法，氯化锂-尿素法，蛋白酶K-细胞质RNA提取法等、异硫氰酸胍-酚-氯仿一步法等。
- 目前常用的是Trizol法。

Trizol的主要成分

- Trizol 是一种新型总 RNA 抽提试剂
- 主要成分是异硫氰酸胍和酚。异硫氰酸胍属于解偶剂，是一类强力的蛋白质变性剂，可溶解蛋白质，其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。
- 酚虽可有效的变性蛋白质，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、β-巯基乙醇等来抑制内源和外源RNase。

原 理

- 在加入氯仿离心后，溶液分为水相和有机相，RNA在上层水相中。
- 取出水相用异丙醇沉淀可回收RNA；用乙醇沉淀中间层可回收DNA；用异丙醇沉淀有机相可回收蛋白质。


Phase separation
Isopropanol precipitation
Aqueous phase
Interphase
Organic phase
RNA Pellet

RNA酶污染来源

- RNA酶可耐受多种处理而不被灭活，如煮沸、高压灭菌等。
- 严格控制外源性RNA酶的污染：外源性的RNA酶存在于操作人员的手汗、唾液等，也可存在于灰尘中，造成器械、玻璃制品、塑料制品、电泳槽、研究人员的手及各种试剂的污染。
- 最大限度地抑制内源性的RNA酶：各种组织和细胞中含有大量内源性的RNA酶。

DEPC (Diethylprocarbonate) 焦碳酸二乙酯

RNA酶的强抑制剂，一种潜在的致癌物质。主要是吸入性毒性。操作时戴口罩，在通风橱中进行。沾到手上立即冲洗，废液通过废液道排泄。

高温、高压处理，DEPC分解为二氧化碳和水，无毒性。

防止RNA酶污染的措施

1. 所有的玻璃器皿均应在使用前于180℃的高温干烤6h或更长时间。
2. 塑料器皿可用0.1%DEPC水浸泡12h以上，高压灭菌。
3. 有机玻璃的电泳槽等，可先用去污剂洗涤，双蒸水冲洗，
4. 配制的溶液应尽可能用0.1% DEPC在37℃处理12h以上。然后用高压灭菌除去残留的DEPC。不能高压灭菌的试剂，应当用DEPC处理过的无菌双蒸水配制，然后经滤膜过滤除菌。
5. 操作人员戴一次性口罩、帽子、手套，实验过程中手套要勤换。
6. 设置RNA操作专用实验室，所有器械等应为专用。

操作步骤

样品处理

- 提取组织RNA时，液氮研磨，每50～100mg组织用1ml Trizol试剂对组织进行裂解；
- 悬浮细胞先离心沉淀，每5-10 ×10^6个细胞加1ml Trizol后以裂解细胞。
- 培养贴壁细胞不须消化，可直接用Trizol进行消化、裂解，Trizol体积按10cm^2/ml比例加入。

(注意：匀浆一定要彻底，是提取高质量RNA的前提；细胞数量与Trizol的比例，细胞的数量不能过多。)

实验材料：小鼠肝脏

关 键 点

所有RNA的提取过程中都有五个关键点：

1. 样品细胞或组织的有效破碎；
2. 有效地使核蛋白复合体变性；
3. 对内源RNA酶的有效抑制；
4. 有效地将RNA从DNA和蛋白混合物中分离；
5. 对于多糖含量高的样品还牵涉到多糖杂质的有效除去。

操作步骤

1. 细胞中加入1 ml Trizol颠倒混匀，室温放置5min，使其充分裂解。4℃ 12,000g离心5min，去除沉淀。

   （注意：此时可放入-70℃长期保持。）

2. 按200 ul 氯仿/ml Trizol加入氯仿，振荡混匀后室温放置2-3 min。

   (注意：此步一定要振荡混匀，使氯仿和Trizol不分层。)

3. 4℃ 12,000g离心15min。样品分为三层：底层为黄色（红或绿）有机相，上层为无色水相和一个中间层。RNA主要在水相中，水相体积约为所用Trizol试剂的60％。（此步开始组长负责组织各组同步进行离心）

4. 吸取上层水相，至另一新的离心管中。*一般400-450 ul 就足够了，千万不要贪多！*

   （注：千万不要吸取中间界面；若同时提取DNA和蛋白质，则保留下层酚相存于4℃冰箱，若只提RNA，则弃下层酚相。）

操作步骤

5. 加入等体积异丙醇后，上下颠倒混匀，室温放置10 min。
6. 4℃ 12,000g离心10 min，弃上清，离心后在管侧和管底出现白色沉淀。
7. 加入1 ml 75%乙醇，（切勿触及沉淀！）上下颠倒，温和振荡离心管。
8. 4℃ 12,000g离心5 min，尽量弃上清。
9. 室温晾干或真空干燥5 min。（注：RNA样品不要过于干燥，否则很难溶解。）
10. 加入50 ul无RNase的DEPC水，充分混匀。

收集适量细胞，加1ml Trizol，颠倒混匀，室温静置5min

向裂解液中加入200 μl氯仿

盖紧离心管盖，上下颠倒15s，室温静置2min， 4℃， 12000g离心15min

吸取上清液400~450 μl至另一新离心管中(切忌吸出白色中间层)

加入等体积异丙醇，上下颠倒离心管充分混匀，室温静置10min 4℃, 12000g 离心10min，小心弃去上清

缓慢沿离心管壁加入1ml 75%乙醇，轻轻上下颠倒，4℃， 12000g 离心5min，小心尽量弃去乙醇，室温干燥沉淀5min

加入50 μl DEPC水溶解沉淀, 检测RNA浓度和纯度

紫外光吸收法

原 理：

1. 物质在光的照射下会产生对光的吸收效应
2. 而且物质对光的吸收是具有选择性的
3. 各种不同的物质都具有其各自的吸收光谱

因此不同波长的单色光通过溶液时其光的能量就会被不同程度的吸收，光能量被吸收的程度和物质的浓度有一定的比例关系.

紫外吸收检测RNA的浓度

- RNA在260nm波长处有最大的吸收峰。因此，可以用260nm波长分光测定RNA浓度，OD值为1相当于大约 40 μg/ml 的单链RNA。用双蒸水稀释RNA样品n倍并以双蒸水为空白对照，根据此时读出的OD260 值即可计算出样品稀释前的浓度:

RNA (mg/ml) = 40×OD260 读数×稀释倍数(n)/1000

dsDNA(双链DNA)	$1OD_{260}$ = 50ug/ml
ssDNA(单链DNA)	$1OD_{260}$ = 33ug/ml
RNA	$1OD_{260}$ = 40ug/ml

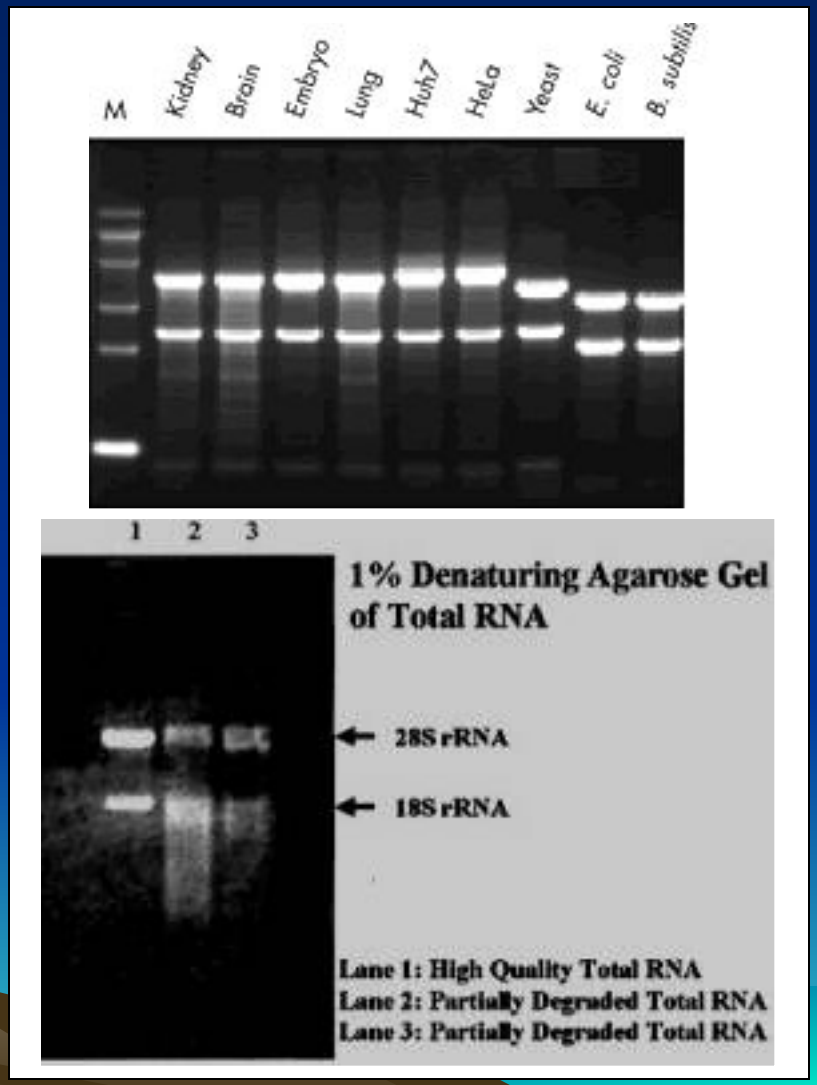
紫外吸收检测RNA的纯度

- RNA纯品的OD260 /OD280 的比值为2.0，故根据OD260 /OD280 的比值可以估计RNA的纯度。

- 若OD260/OD280小于2，说明可能有DNA片段污染，可以考虑用无RNase的DNase处理样品，若小于1.8，说明样品中还可能含有蛋白质或酚，应再用酚/氯仿抽提，以乙醇沉淀纯化RNA。若比值太高（大于2.2），则提示RNA有降解。

RNA完整性检测

- 完整的RNA的甲醛电泳可明显地观察到28S和18S两条带，并且28S大约是18S的两倍宽。
- 若两条带不明显，则说明RNA部分降解,可能的原因是污染了RNase。



第二部分

逆转录-聚合酶链反应

(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction，RT-PCR)

原 理

- 提取组织或细胞中的总RNA，以其中的mRNA作为模板，采用Oligo（dT）或随机引物利用逆转录酶反转录成cDNA。再以cDNA为模板进行PCR扩增，而获得目的基因或检测基因表达。
- RT-PCR使RNA检测的灵敏性提高了几个数量级，使一些极为微量RNA样品分析成为可能。
- 该技术主要用于：分析基因的转录产物、获取目的基因、合成cDNA探针、构建RNA高效转录系统。

（一）反转录酶的选择

1. 鼠白血病病毒（MMLV）反转录酶：有强的聚合酶活性，RNA酶H活性相对较弱。最适作用温度为37℃。在长时间的逆转录过程中，不会造成模板的降解，获得cDNA的几率大，适用于较长的cDNA链的合成。

2. 禽成髓细胞瘤病毒（AMV）反转录酶：有强的聚合酶活性和RNA酶H活性。最适作用温度为42℃。

3. Thermus thermophilus、Thermus flavus等嗜热微生物的热稳定性反转录酶：在Mn^{2+}存在下，允许高温反转录RNA，以消除RNA模板的二级结构。

4. MMLV反转录酶的RNase H-突变体：商品名为Superscript 和SuperScriptⅡ。此种酶较其它酶能多将更大部分的RNA转换成cDNA，这一特性允许从含二级结构的、低温反转录很困难的mRNA模板合成较长cDNA。

（二）引物的选择

1. 随机六聚体引物：用此种方法时，体系中所有RNA分子全部充当了cDNA第一链模板，通常用此引物合成的cDNA中96%来源于rRNA。

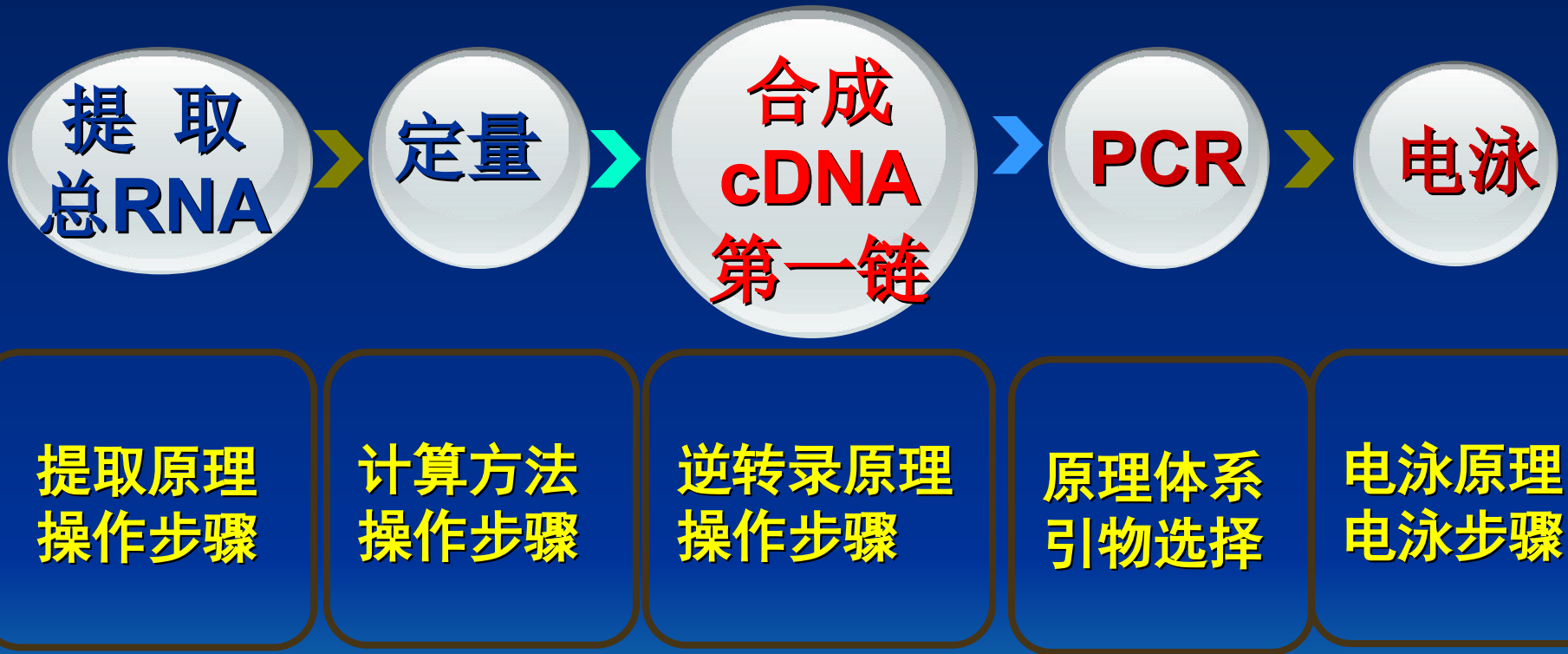
2. Oligo(dT)：是一种对mRNA特异的方法。因绝大多数真核细胞mRNA具有3’端Poly(A+)尾，此引物与其配对，仅mRNA可被转录。由于Poly(A+)RNA仅占总RNA的1-4%，故此种引物合成的cDNA比随机六聚体作为引物和得到的cDNA在数量和复杂性方面均要小。

3. 特异性引物：是用含目标RNA的互补序列的寡核苷酸作为引物，用此类引物仅产生所需要的cDNA，导致更为特异的PCR扩增。

仪器和主要试剂

1. 基因扩增仪、微量加样枪、灭菌超薄PCR反应管
2. 总RNA
3. 第一链cDNA合成试剂盒 （含有逆转录酶、RNA酶抑制剂、缓冲液）
4. dNTP mix：含dATP、dCTP、dGTP、dTTP各2 mmol/L

实 验 流 程


提 取
总RNA
定量
合成
cDNA
第一链
PCR
电泳
提取原理
操作步骤
计算方法
操作步骤
逆转录原理
操作步骤
原理体系
引物选择
电泳原理
电泳步骤

操作步骤

采用takara cDNA Kit 合成cDNA第一链

按下列组分配制RT反应液（20 μl）

1. dNTP Mix (2.5mM Each)	4 μl	17 μl
2. Primer Mix	2 μl	
3. 5×RT Buffer	4 μl	
4. RNAase inhibitor	2 μl	
5. HiFi-MMLV (200U/μl)	1 μl	
DEPC水	4 μl	
Total RNA	3 μl	

反转录反应条件如下　　注：反转录步骤在PCR仪中进行

42℃	50min	（反转录反应）
70℃	15min	（反转录酶失活反应）
4℃	∞	（保存）

实验思考和讨论

1. RNA提取过程中如何减少DNA的污染？
2. 从实验样品和实验步骤中分析有哪些原因可以导致RNA的降解，如何尽量减少RNA的降解？
3. 哺乳动物细胞扩增蛋白表达基因为何以cDNA为模板，不直接提取基因组DNA？