

## A260/A280比率<1.65

- 1.在分光光度计测量前用水而不是用TE缓冲液稀释RNA样品。低离子强度和低pH溶液会增加280nm处的光吸收值。
- 2.样品匀浆化时所加的TRIpure量太少。
- 3.匀浆化后样品没有在室温下放置5分钟。
- 4.分离的水样层中污染有苯酚层。
- 5.终RNA没有完全溶解。

## RNA降解

- 1.从动物体取下的组织没有立即进行抽提或冰冻保存。
- 2.用于抽提的样品，或抽提的RNA样品保存于-5~-20°C，而不是存放于-60~-70°C。
- 3.细胞经胰酶消化而分散。
- 4.水溶液或试管污染有RNA酶。
- 5.用于琼脂糖凝胶电泳的福尔马林pH低于3.5。

## DNA污染

- 1.样品匀浆化时所加的TRIpure量太少。
- 2.用于抽提的样品包含有机溶媒（例如，乙醇，DMSO），强缓冲液，或碱性溶液。

## 蛋白多糖和多糖污染

下述的对RNA沉淀方法（步骤3）的改进能从抽提的RNA中移去复合污染。以匀浆化时每1ml TRIpure为例，在水样层中加入0.25ml异丙醇后再加入0.25ml的高盐溶液(0.8 M柠檬酸钠和1.2 M NaCl)。将终溶液混匀，离心并继续进行前述的抽提操作。改进后的沉淀法能有效地析出RNA而多糖和蛋白多糖仍以可溶的形式留在溶液中。对于含有大量多糖的植物，要抽提其RNA将改进后的沉淀法和在最初匀浆化时多加一次离心(RNA抽提指南，可选方案)合并使用是十分必要的。

完成操作。避免呼吸道吸入。如无例外，所有的操作应该在在 15~30°C 的条件下。

## 实验所需试剂但未提供的物品:

- \* 氯仿 \* 异丙醇
- \* 75%乙醇(用DEPC处理过的水配制)
- \* 无RNA酶的水或0.5% SDS溶液[调配无RNA酶的水，将水加入无RNA酶的玻璃瓶中，加入DEPC至0.1% (v/v)。放置过夜并高压灭菌。SDS溶液必须用DEPC处理过并经高压灭菌的水配制。]

## 1. 匀浆化作用

### a. 组织

用glass或强力匀浆器搅匀组织样品，每50~100mg组织加1ml的TRIpure。匀浆化时组织样品容积不能超过TRIpure容积的10%。

### b. 单层生长的细胞

直接往直径3.5 cm的培养板中加入1ml的TRIpure溶解细胞，通过移液管分次移出细胞裂解物。依据培养板的面积而不是依据细胞的数量来决定所需的TRIpure量（每10cm<sup>2</sup>加1ml）。当TRIpure量不足时可导致抽提的RNA中污染有DNA。

### c. 悬浮生长的细胞

通过离心来沉淀细胞。在TRIpure试剂中用移液管反复吹打来裂解细胞。每5~10×10<sup>6</sup>的动物细胞，植物或酵母菌细胞或每1×10<sup>7</sup>细菌加1ml的TRIpure。在加入TRIpure前应避免洗涤细胞，因为那样会增加mRNA降解的可能性。破裂某些酵母菌和细菌可能需要使用匀浆器。

## 可选方案:

当样品富含蛋白质，脂肪，多糖或是细胞外物质例如肌肉，脂肪组织和植物的块茎部分时可能需要一额外的分离步骤。匀浆化后在2~8°C的条件下以12,000×g的离心力离心10分钟，

移除匀浆中不溶解的物质，余下的沉淀中包含有细胞外膜，多糖，以及高分子量DNA，而上层的超浮游物含有RNA。在来自于脂肪组织的样品中，大量的脂肪漂在最上层因而应该除掉。在每一个案中，将清亮的匀浆溶液转移到一干净的试管中加入氯仿并继续进行下述的分离步骤。

## 2. 分离阶段

将匀浆样品在15-30°C条件下孵育5分钟以使核蛋白体完全分解。每1ml TRIpure加0.2ml氯仿。盖紧样品管盖，用手用力摇晃试管15秒并将其在30°C下孵育2~3分钟。在2~8°C下以不超过12,000×g的离心力高速冷冻离心15分钟。离心后混合物分成三层：下层苯酚-氯仿层，中间层，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TRIpure容量的60%。

## 3. RNA的沉淀

将水样层转移到一干净的试管中，如果希望分离DNA和蛋白，有机层同样要予以保留。通过将水样层和异丙醇混合来沉淀RNA。最初均化时的每1ml TRIpure对应0.5ml异丙醇。将混合的样品在15-30°C条件下孵育10分钟并在2~8°C下以不超过12,000×g的离心力高速冷冻离心10分钟。RNA沉淀在离心前通常不可见，形成一胶状片状沉淀附着于试管壁和管底。

## 4. RNA的漂洗

移去上层悬液。用75%的乙醇洗涤RNA沉淀一次，每1ml的TRIpure至少加1ml的75%乙醇。漩涡振荡混合样品并在2~8°C下以不超过7,500×g的离心力高速冷冻离心5分钟。

## 5. RNA的再溶解

在操作的最后，简单干燥RNA沉淀（空气干燥或真空干燥5~10分钟）不要在真空管里离心干燥RNA。尤为重要，不能让RNA沉淀完全干燥那样会极大地降低它的可溶性。部分溶解的RNA样品其A260/280比值<1.6。用移液管尖分几次移取无RNA酶的水或0.5%SDS溶液来溶解RNA，并在55~60°C下孵育10分钟（当RNA以后要用于酶切反应时，

避免使用SDS。）RNA还能被100%甲酰胺（除去离子）再溶解并保存在-70°C。

## RNA抽提注意事项:

1.从少量的组织(1~10mg)或细胞( $10^2\sim 10^4$ )中分离RNA样品：往组织或细胞中加入800μl TRIpure。待样品裂解后，加入氯仿并进行步骤2中的抽提操作。在用异丙醇沉淀RNA之前，加入5~10μg无RNA酶的glycogen作为水样层的载体。为降低其黏度在加入氯仿前用26号注射器抽吸两次以切断基因组DNA。Glycogen会留在水样层中并和RNA共析出。在浓缩到4mg/ml之前它不会抑制逆转录反应第一链的合成也不会抑制PCR。

2.在匀化后和加入氯仿之前，样品可以在-60~-70°C保存至少一个月。RNA沉淀（步骤4，RNA漂洗）溶于75%的乙醇在2~8°C至少可以保存一周，在-5~-20°C下至少可保存一年。

3.台式离心机最大能达到2,600×g的离心力，如果将离心时间延长到30~60分钟可以满足步骤2和步骤3中的操作。

## 疑难解答:

### **每1mg组织或 $1\times 10^6$ 培养细胞预期的RNA产量**

- 1.肝和脾，6~10μg
- 2.肾，3~4μg
- 3.骨骼肌和脑组织，1~1.5μg
- 4.胎盘，1~4μg
- 5.上皮细胞( $1\times 10^6$  cultured cells)，8~15μg
- 6.纤维母细胞( $1\times 10^6$  cultured cells)，5~7μg

### **抽提得率低**

- 1.样品均化或裂解不完全。
- 2.终RNA不完全再溶解。