

TRIzol法提取RNA

1.裂解

- 1.1 每 $(5-10) \times 10^6$ 个细胞加入1 mL RNAiso Plus
- 1.2 4 °C裂解5 min

2.萃取

- 2.1 加入RNAiso Plus 总体积1/5的三氯甲烷，用力震荡15-30 s，4 °C静置5 min
- 2.2 12000 g \times 15 min，4 °C离心

3.沉淀

- 3.1 离心后取上清于新Ep管，加入等体积异丙醇，轻轻上下颠倒10次混匀，4 °C静置10-30 min
- 3.2 12000 g \times 10 min，4 °C离心

4.洗涤

- 4.1 丢弃离心后上清，加入1 mL 75%乙醇，上下颠倒洗涤沉淀
- 4.2 7500 g \times 5 min，4 °C离心（重复洗涤一次）

5.溶解

- 5.1 弃上清，通风橱干燥5-10 min（Ep管中无水滴），加入20 μ L-30 μ L DEPC水溶解RNA

常见问题解析

1. RNA提取量较低怎么办？

①评估样本质量：确保使用新鲜样本（离体后速冻于液氮， -80°C 保存），组织样本建议先采用液氮研磨至粉末状或加入RNAiso Plus后，充分研磨匀浆使其充分裂解；细胞数需达标（培养细胞 $\geq 10^6$ ，组织 $\geq 20\text{ mg}$ ），且细胞裂解前用PBS彻底清洗（避免培养基血清干扰）；②增加裂解效率：增加TRIzol用量（组织样本推荐比例50-100 mg/mL）；延长裂解时间（室温15 min，涡旋震荡）；复杂样本可配合超声破碎（20 kHz，10 s \times 3次，冰浴间隔）；③优化相分离关键参数：准确吸取水相（保留约80%体积，避免触碰中间层）；④沉淀条件改进：异丙醇沉淀时间延长至过夜（ -20°C ）；添加共沉淀剂（如glycogen 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）。

2. 提取的RNA不溶怎么办？

①75%乙醇清洗沉淀后不要干燥时间过长或加热干燥；②于 60°C 加热5 min后再于冰上溶解数 h；③RNA沉淀中含有不溶的蛋白质混合物时，应注意在相分离后吸取上清液时，避免枪头接触蛋白层；④溶解液更换为0.5%的SDS溶液。

3. OD260/OD280值 <1.65 ，为什么？

①RNA应使用TE Buffer稀释后再进行吸光度值的测定，低离子强度或低pH值会使OD280值升高；②样品裂解时加入的RNAiso Plus量偏少，造成蛋白变性不充分，可再次对RNA溶液进行苯酚/氯仿抽提，以除去蛋白；③含有裂解液的样品经匀浆混匀后未在室温静置，或静置的时间不足5 min；④相分离后，吸取上清液时不小心接触蛋白层造成污染；⑤RNA未充分溶解。

参考文献

[1] Dietrichs E. Cerebellar autonomic function: direct hypothalamocerebellar pathway [J]. Science, 1984, 223(4636): 591-593.