

一、实验准备阶段

1. 实验所需仪器

台式高速离心机；组织匀浆器（也可以用液氮研磨设备，部分样品可以用 Dounce 匀浆器）；操作台（无 RNase 污染）；微量加样器；六十孔板。

2. 实验所需环境

普通实验室，若该实验室做过提取 DNA 的实验，则需要在操作台中进行实验。

3. 实验所需样品

用于提取的是动物组织；但也可用于一些植物组织（如草本植物的叶，茎等）。新鲜的组织最佳， -80°C 存储 36 个月以内的动植物组织亦可， -20°C 存储的动植物组织可能对提取质量产生不利影响。

4. 实验所需试剂及耗材

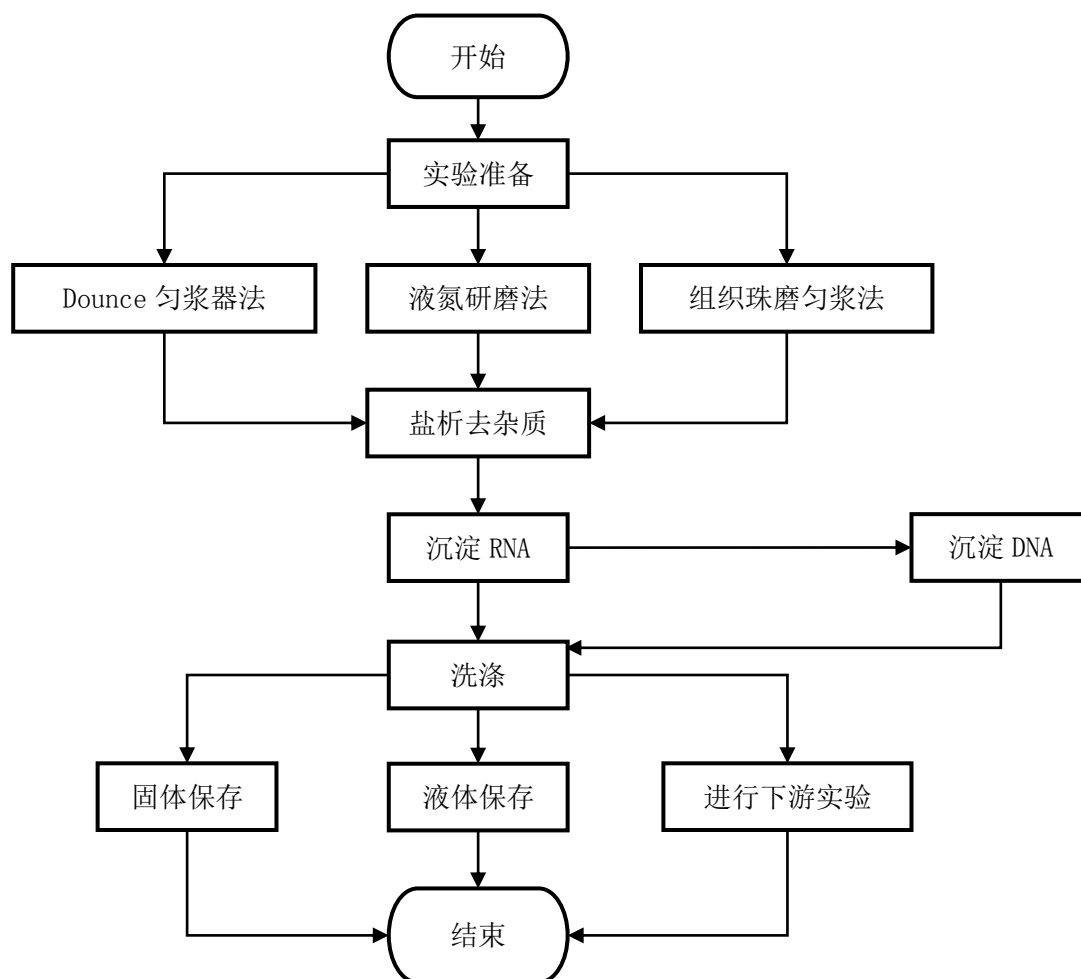
试剂 I、试剂 II、异丙醇、90%乙醇、无水乙醇、RNase-Free 高纯水、冰块等。RNase-Free 低吸附 1.5m 离心管、面巾纸、微量加样器吸头等。若需要用液氮进行组织研磨，则需要准备液氮及相关器材。

5. 注意事项

- a) 本说明书中，生物材料，是特指除了胰腺以外的动物组织，不包括所有动物的积液、尿液、唾液、血液；离心，是特指室温下进行 12,000g、5 分钟离心；短暂离心，是特指室温下进行 12,000g、30 秒离心。
- b) 在操作时，需戴上手套，并在整洁的环境下进行。如皮肤、粘膜上黏上了试剂成分，可以用大量自来水冲洗。
- c) 操作的室温，是指 20~30 摄氏度的条件。

二、提取阶段

提取流程图



1. 匀浆阶段

匀浆阶段根据实验室所具备的条件，可以有三种方法：组织匀浆器（球磨机）法、液氮研磨法和 Dounce 匀浆器（Dounce 匀浆器）法。

1) Dounce 匀浆器法

对于柔软组织，如动物的肌肉，内脏，植物的嫩芽，嫩叶，嫩茎，花瓣等，可以用 Dounce 匀浆器进行匀浆。

将 **500 μ l 试剂 I** 加入 2ml Dounce 匀浆器中，并放于冰上冷却。称取 **30mg 生物材料** 加入 Dounce 匀浆器中，立即进行室温下的快速匀浆，取 **250 μ l 匀浆液** 到一个低吸附 1.5ml 离心管中。

2) 液氮研磨法

称取一定质量的动植物组织，放于研钵中，用液氮研磨成粉状；然后将已经研磨好的 **15mg 样本粉末** 倒入含有 **235 μ l 试剂 I** 的离心管中。将离心管室温下混匀，形成均匀悬液。

3) 组织珠磨匀浆法

将研磨珠和用穿刺针取下的 **15mg 生物材料**、**235 μ l 试剂 I** 加入 1.5ml 离心管中，立即进行室温下的珠磨匀浆，打碎组织、细胞，即可。

2. 盐析去杂质阶段

加 **700 μ l 试剂 II** 到前叙离心管中，盖上盖，反复颠倒 5 次以上，充分混合管内液体；然后，将离心管在室温下进行 12,000g、5 分钟离心；离心后，将离心管中上清液倒入一个新的低吸附 1.5ml 离心管中。

3. 沉淀 RNA 阶段

1) 混匀：向离心管中加 **500 μ l 异丙醇**，盖上盖反复颠倒离心管 10 次以上进行充分混合，然后室温下放置 15 分钟。

2) 离心：将离心管在室温下进行 12,000g、5 分钟离心，离心后取出离心管，常常见其底部的白色沉淀。（注：有些生物材料含有的 RNA 量少，就见不到离心管底部的核酸颗粒，但在洗涤阶段中，可见在酒精洗涤液中漂浮的核酸沉淀）

从此步骤开始所有的操作必须在无 RNase 污染的环境下进行，特别是实验室不能使用 RNase A。所用的所有试剂和耗材，如洗涤用乙醇，溶解 RNA 的水，都必须是无 RNase 污染的。

3) 倒液：将离心管中的上下液相及其之间的固体杂质**快速倒掉**，放入一个新的 1.5ml 离心管中（用于固体 DNA 提取）；然后倒扣原离心管于面巾纸上 3 秒钟，以便流干管内液体，留在离心管底部的白色沉淀是固体 RNA。（注：**快速倒掉**离心管中的液体，可以防止上下液相之间的杂质挂在离心管壁上，导致固体 RNA 的污染）

4. 洗涤和保存阶段

1) 洗涤

加 1ml **70%乙醇**洗涤液到离心管中，反复颠倒 5 次，洗涤离心管中的固体 RNA，然后短

暂离心（室温下进行 12,000g、30 秒离心），**缓慢倒掉**乙醇洗涤液。（注：在短暂离心之后，得到的固体 RNA 没有任何蛋白污染，在乙醇洗涤液中的粘性极低，所以要**缓慢倾倒**乙醇洗涤液，以防止固体 RNA 随着乙醇洗涤液而倒掉）用**无水乙醇**代替 70%乙醇，重复上一次洗涤。

2) 室温固体保存

晾干离心管内的无水乙醇。将离心管盖上盖，可以将固体 RNA 放于室温下，进行保存和邮寄。正常情况下可保存 1 个月。（晾干过程，可倒扣离心管于面巾纸上 3 秒，然后平放离心管，以便完全蒸发残留乙醇，同时又防止 RNA 掉落到面巾纸上而丢失。）

3) 液体保存

将上述 RNA 沉淀固体溶解于适量体积的无 RNase 的高纯水后，可放于-20℃或者更低温度的冰箱中储存一年以上。

4) 进行下游实验

将上述 RNA 沉淀固体溶解于适量体积的无 RNase 的高纯水后，可直接用于下游实验。

5. 沉淀 DNA 阶段

将沉淀 RNA 阶段中倒入新离心管中的剩余液体中加入 100 μ l 蒸馏水，并盖上盖，反复颠倒离心管以混匀其内液体。然后参照 RNA 提取步骤进行离心、提取、洗涤、保存固体 DNA。

三、疑难解答

1. RNA 产量低

原因 1:生物材料用量过高，导致试剂 I 不能完全解离 RNA-蛋白复合物，最终所释放的裸露 RNA 分子过低。

建议解决方法:按照说明书的配比要求，减少生物材料的用量，到适当的生物材料质量和试剂 I 体积的比例。

原因 2:使用的样品在-20℃或者-80℃冰箱中存放时间太长，存放时间过长可能降低 RNA 产量。

建议解决方法:尽快的处理样品。

原因 3:生物材料本身含 RNA 少。不同类型的组织和细胞含有不同量的 RNA。

建议解决方法:对于 RNA 含量少的细胞，应提高生物材料用量，并相应地按照比例提高试剂 I、试剂 II、异丙醇的用量体积。

2. RNA 降解、完整性不佳

原因 1：在核酸的四相纯化步骤之后，操作中有 RNases 污染；或者所用的相关溶液和谁，以及所使用的微量加样器吸头，没有灭活 RNases。

建议解决方法：按照“注意事项”准备 RNA 提取的各种用品。

原因 2：组织取出后没有马上处理或冷冻，提取前组织中的核酸已经被降解。

建议解决方法：组织应该尽量立刻处理，不能及时处理的应该尽快保存于液氮或者-80℃以下环境中。

原因 3：提取的 RNA 水溶液没有保存在-20℃或-80℃低温中。

建议解决方法：尽可能的将 RNA 水溶液保存在-20℃或-80℃的低温中。

原因 4：在的阶段中，上下相之间的残存蛋白挂在离心管壁上，而没有去除。残存蛋白中存在 RNases，导致 RNA 分解。

建议解决方法 1：**快速**倒掉离心管中上下相液体，可以避免上下相之间的杂质相挂在离心管壁上。

建议解决方法 2：如果已经发生了上下相之的杂质相挂在离心管壁上的情况，可以加入 700ul 试剂 II，再加入 500ul 异丙醇，混匀，重复沉淀 RNA 阶段的离心动作。

3. 沉淀 RNA 阶段离心后，大量盐颗粒沉淀于离心管底部

原因：相对于上清液的体积，异丙醇加入量过多；或者是生物材料中存在一些未知的特殊成分所导致的。

建议解决方法：在余下的操作中加入 1ml 70%乙醇溶液代替 90%乙醇洗涤液，然后用微量加样器反复吹吸乙醇溶液，以溶解盐颗粒，最后剩下的就是不溶解的固体 RNA，然后进行短暂离心，缓慢倒出洗涤液，再重复 2.4 的步骤。

4. RNA 样品中有大量 DNA 污染

原因：在操作的匀浆阶段中，加入的生物材料量远远大于规定的量；或者用于盐析取杂质阶段的组织匀浆悬液远远大于 250μ l。

建议解决方法：严格按照说明书操作。

5. 样本量很少怎么办

若可获取额样本量小于 30mg，则推荐用组织珠磨匀浆法操作：

- a) 如果生物材料的质量小于 30mg, 则取 15mg 材料加入到离心管中, 再加入 250 μ l 的试剂 I 和研磨珠, 进行室温下的珠磨匀浆; 然后直接进行步骤 2.2 操作。
- b) 如果生物材料的质量小于 15mg, 为 X mg, 那么在离心管中补加 15-X μ l 蒸馏水, 再加入 250 μ l 的试剂 I 和研磨珠, 进行室温下的珠磨匀浆。然后进行步骤 2.2 的操作。

6. 骨头、牙齿等样本如何提取?

如果生物材料中含有大量的不溶组织, 如动物的骨头、牙齿、植物的树皮、根部、松树的针叶等, 要适当增大生物材料的用量, 具体情况请与厂家协商。