果蝇总 RNA 制备

Preparation of *Drosophila* Total RNA

邓娟，刘南*

中国科学院生物与化学交叉研究中心，上海

*通讯作者邮箱: liunan@sioc.ac.cn

引用格式：邓娟，刘南 (2019). 果蝇总 RNA 制备. *Bio-101* e1010254. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010254.

How to cite: Deng, J and Liu, N. (2019). Preparation of *Drosophila* total RNA. *Bio-101* e1010254.

Doi: 10.21769/BioProtoc. 1010254. (in Chinese)

摘要： 主要介绍制备果蝇总 RNA 的方法，为后面的 RNA 实验做准备。

关键词： 果蝇，总 RNA，制备

材料与试剂

1. 1.5 ml 离心管
2. 果蝇
3. TRIzol™ Reagent (Invitrogen™, catalog number: 15596026)
4. TURBO DNA-free™ Kit (Invitrogen™, catalog number: AM1907)
5. 异丙醇
6. 乙醇
7. DEPC-H₂O

仪器设备

1. 离心机 (Eppendorf)
2. Thermomixer compact (Eppendorf)

实验步骤

注： 该实验需要在 RNA 洁净区操作，RNA 易降解，需要使用 RNA 专用试剂耗材和设备。务必佩戴洁净的手套甚至口罩。

1. 取 200 μ l TRIzol 置于 1.5 ml 离心管中，放在冰上，将麻醉的 10 只果蝇放入冰上的离心管中，将果蝇碾碎，再加入 800 μ l TRIzol 试剂，颠倒混匀。
2. 室温放置 10 min，间歇混匀数次。
3. 4 °C，12,000 $\times g$ 离心 10 min，去掉果蝇残体，取上清至新管。
4. 加入 200 μ l 氯仿，混匀，室温放置 5 min。
5. 4 °C，12,000 $\times g$ 离心 15 min。
6. 取上清 (约 500 μ l) 到新的 RNAase free 的离心管中，加入等体积的异丙醇混匀，室温放置 10 min。
7. 4 °C，12,000 $\times g$ 离心 30 min。
8. 弃上清，加入 500 μ l 70%乙醇，颠倒数次，使 RNA 漂浮。
9. 4 °C，7,500 $\times g$ 离心 5 min。
10. 弃乙醇，如果残留的乙醇有挂壁现象，倒掉液体后再短暂离心，将残液用移液器吸出。室温放置直到白色沉淀呈透明装时加入 50 μ l DEPC-H₂O 溶解。
11. 50 °C，600 rpm 金属浴震荡混匀 10 min 或者时不时轻弹混匀。
12. 加入 1 μ l DNase，5 μ l DNase Buffer，37 °C 温育 30 min。
13. 加 5 μ l DNAase inactive reagent，室温放置 5 min，间歇混匀 2~3 次。
14. 4 °C，10,000 $\times g$ 离心 1.5 min。
15. 转移上清至新的 EP 管中，测浓度；-80 °C 保存。