

HeLa 细胞的核质分离及细胞核与细胞质中 RNA 抽提

Nuclear and cytoplasmic isolation and RNA extraction in HeLa cell

王怡旻[#], 范静[#], 程红^{*}

分子生物学国家重点实验室, 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心, 上海

*通讯作者邮箱: hcheng@sibcb.ac.cn

[#]共同第一作者/同等贡献

引用格式: 王怡旻, 范静, 程红. (2021). HeLa 细胞的核质分离及细胞核与细胞质中 RNA 抽提. Bio-101 e1010804. Doi: 10.21769/BioProtoc. 1010804.

How to cite: Wang, Y. M., Fan, J. and Cheng, H. (2021). Nuclear and cytoplasmic isolation and RNA extraction in HeLa cell. Bio-101 e1010804. Doi: 10.21769/BioProtoc. 1010804. (in Chinese)

摘要: 细胞核质分离后抽提 RNA 能够高效、特异地得到细胞核和细胞质中的 RNA, 是研究 RNA 出核及降解相关问题时常用的实验方法。由于细胞质膜和核膜中胆固醇含量的不同, 核膜比质膜更致密, 所以针对两层膜设计能破坏质膜但不破坏核膜的裂解液, 就可以实现细胞核质分离。TRizol 中含有苯酚、异硫氰酸胍等物质, 能从细胞组织中抽提 RNA 的同时保持 RNA 的完整性。此方法相较于其他核质分离方法具有用时少、操作简便、对样品需求量较少等优势。通过此方法获得的 RNA 可用于 RT-PCR、RNA 测序等实验, 研究在不同实验条件下 RNA 在细胞核和胞质中的定位以及丰度变化。

关键词: 细胞核, 细胞质, RNA, 抽提

材料与试剂

1. 1.5 ml RNase-free 离心管 (Biosharp)
2. Tirs-base (Sigma, catalog number: T1503-1KG)
3. NaCl (Sigma, catalog number: S3014-1KG)
4. MgCl₂ (Sigma, catalog number: 63068-250G)
5. Igepal CA-630 (Sigma, catalog number: 18896-50ML)
6. Sodium deoxycholate (Sigma, catalog number: D6750-25G)
7. Ribonucleoside Vanadyl Complex, RVC (New England BioLabs, catalog number:

S1402S)

8. NaCl (Sigma, catalog number: S3014-1KG)
9. Na₂HPO₄ (Sigma, catalog number: S3264-500G)
10. KCl (Sigma, catalog number: P9541-1KG)
11. KH₂PO₄ (Fluka, catalog number: 60218)
12. 胰酶 (Gibco™, catalog number: 25200072)
13. TRIzol (Sigma, catalog number: T9424-100ML)
14. 氯仿 (国药试剂)
15. 20mg/ml 糖原 (Sigma, catalog number: G8751-5G)
16. 异丙醇 (Sigma, catalog number: I9030-500ML)
17. 乙醇 (泰坦科技, catalog number: G73537B)
18. Lysis buffer (见溶液配方)
19. Lysis buffer + Sodium deoxycholate (见溶液配方)
20. 1x PBS (见溶液配方)

仪器设备

1. 移液器 (Gilson)
2. 载玻片 (世泰, catalog number: 188105W)
3. 冷冻离心机 (Eppendorf, model: Centrifuge 5424 R)
4. 显微镜 (Olympus, model: IX71)
5. -80 °C 超低温冰箱 (Thermo Fisher Scientific, model: Heto Ultra Freeze)
6. pH 计 (Mettler Toledo, SevenEasy 8603)
7. CO₂ 培养箱 (Thermo Fisher Scientific, model: Forma Water Jacketed CO₂ Incubator 3111)
8. 紫外分光光度计 (Thermo Fisher Scientific, model: NanoDrop 2000)

实验步骤

一、细胞核与细胞质分离

1. 对于贴壁细胞：以 HeLa 细胞为例，取 4×10^5 个 HeLa 细胞，弃上清，加入 250 μ l 胰酶，放置于 CO₂ 培养箱中 37 °C 消化 5 min，加入 1 ml 1x PBS 终止消化；对

于悬浮细胞：可以直接吹打使细胞脱落进行收集。4 °C，1,000 × g 离心 3 min，弃上清。

注：整个实验过程中使用到的所有离心管及枪头需为 RNase free。

2. 1 ml Lysis buffer 重悬细胞沉淀，将其吹散，力度适宜，并减少气泡产生。冰上放置 5 min。

注：取 20 μl 样品置于载玻片上，显微镜下观察细胞状态，约 80-90% 细胞的细胞质已裂，核膜上沾有少量的细胞质残骸 (图 1)。冰上放置时间根据细胞种类的不同需要摸索。

3. 4 °C，1,000 × g 离心 3 min，取上清，即为细胞质组分。

注：为了得到纯净的细胞质，可将上清 4 °C，12,000 × g 离心 10 min，再次取上清。

4. 1 ml Lysis buffer+ Sodium deoxycholate 重悬上一步获得的细胞沉淀，将其吹散，约吹打 5-7 次，力度适宜，并减少气泡产生。冰上放置 4 min。

注：取 20 μl 样品置于载玻片上，显微镜下观察细胞状态，几乎所有细胞的细胞质膜破裂，细胞核较第二步要干净，较少细胞质残骸剩余 (图 2)。

5. 4 °C，1,000 × g 离心 3 min，彻底去上清，保留细胞沉淀。

6. 1 ml Lysis buffer 重悬细胞沉淀，4 °C，1,000 × g 离心 3 min。

7. 彻底去上清，沉淀即为细胞核组分。

8. 细胞核及细胞质组分可各取一部分进行 Western Blot，根据指示蛋白的分布情况检测核质分离的效果 (图 3)。

二、细胞核与细胞质 RNA 抽提

1. 取 200 μl 步骤 1-3 中所得上清，加入 800 μl 的 TRIzol，迅速混匀。在细胞核沉淀中，加入 1 ml TRIzol，迅速混匀。

2. 加入 200 μl 的氯仿，剧烈震荡 15 s，室温静置 2 min。

3. 4 °C，12,000 × g 离心 15 min，样品分相为三层。其中 RNA 存在于上层水相中。小心取上清 450-500 μl 转移至新的离心管中。切勿吸取到中间层。

注：为提高 RNA 抽提效率，可在体系里加入 2 μl 糖原。

4. 每个样品中加入 500 μl 异丙醇，上下颠倒混匀后，-80 °C 静置 20 min。

5. 4 °C, 12,000 × g 离心 15 min, 弃上清, 离心管底部可见白色 RNA 沉淀。
6. 每个样品中加入 1 ml DEPC 水配制的 75% 乙醇, 4 °C, 7,500 × g 离心 5 min, 尽量吸弃上清, 将离心管置于洁净处自然风干至液体不可见。加入 10 μl DEPC 水溶解 RNA 沉淀。
7. NanoDrop 测定浓度后, 将细胞核与细胞质 RNA 保存于 -80 °C 冰箱中备用。
8. 细胞核和细胞质 RNA 可各取一部分进行实时荧光定量 PCR, 根据指示基因的表达水平判断核质分离的效果 (图 4)。

溶液配方

1. Lysis buffer

Final concentration	Stock	Work (50 ml)
10 mM Tris-Cl pH = 8.0	1 M	0.5 ml
140 mM NaCl	5 M	1.4 ml
1.5 mM MgCl ₂	1 M	75 μl
0.5% Igepal	10%	2.5 ml
Vanadyl ribonucleoside complexes	200 mM	2 mM
H ₂ O		Add DEPC water to 50 ml

2. Lysis buffer + Sodium deoxycholate

Final concentration	Stock	Work (50 ml)
10 mM Tris-Cl pH = 8.0	1 M	0.5 ml
140 mM NaCl	5 M	1.4 ml
1.5 mM MgCl ₂	1 M	75 μl
0.5% Igepal	10%	2.5 ml
0.5% Sodium deoxycholate	10%	2.5 ml
Vanadyl ribonucleoside complexes	200 mM	2 mM
H ₂ O		Add DEPC water to 50 ml

3. 1x PBS

Reagent	Dose
NaCl	8.0 g
Na ₂ HPO ₄	1.42 g
KCl	0.2 g
KH ₂ PO ₄	0.27 g

H₂O Add DEPC water to 1 L
 pH Adjust the pH to 7.4 with NaOH

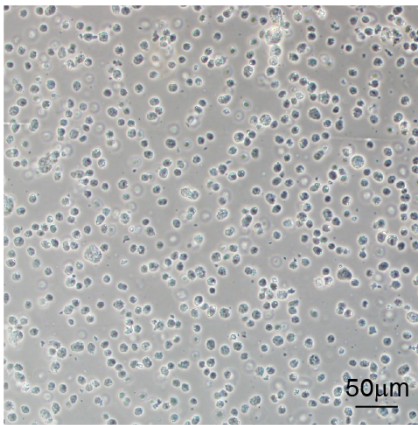


图1

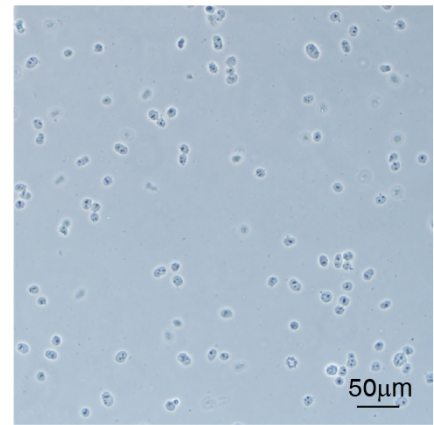


图2

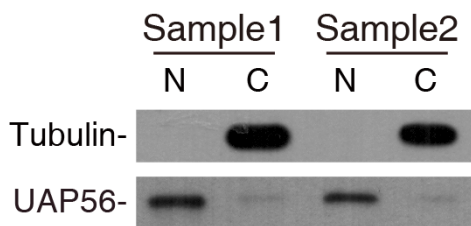


图3

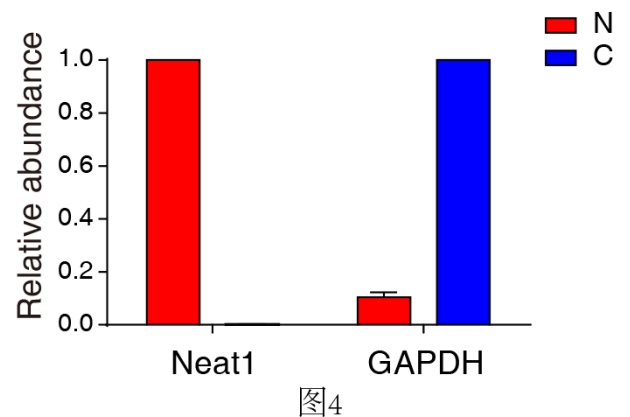


图4

图 1. Lysis buffer 重悬细胞后，显微镜下观察的细胞形态

图 2. Lysis buffer + Sodium deoxycholate 重悬细胞后，显微镜下观察的细胞形态

图 3. Western blot 检测核质分离效果，Tubulin 和 UAP56 分别作为细胞质和细胞核的指示蛋白

图 4. qPCR 检测核质分离效果，Neat1 和 GAPDH 分别作为细胞核和细胞质的指示基因

致谢

感谢中国科学院分子细胞科学卓越创新中心程红课题组的全体成员的建议和帮助。该研究受到国家自然科学基金 (31770880, 31800686) 的支持。本文实验方案由程红课题

组的王可博士参考优化自 2007 年发表在 *Science* 上名为"A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import"的文章。

参考文献

1. Hwang, H. W., Wentzel, E. A. and Mendell, J. T. (2007). [A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import.](#) *Science* 315(5808): 97-100.
2. Shi, M., Zhang, H., Wang, L., Zhu, C., Sheng, K., Du, Y., Wang, K., Dias, A., Chen, S., Whitman, M., Wang, E., Reed, R. and Cheng, H. (2015). [Premature termination codons are recognized in the nucleus in a reading-frame dependent manner.](#) *Cell Discov* 1: 15001.
3. Wang, K., Wang, L., Wang, J., Chen, S., Shi, M. and Cheng, H. (2018). [Intronless mRNAs transit through nuclear speckles to gain export competence.](#) *J Cell Biol* 217: 3912-3929.