

## 水稻组织总 RNA 抽提

方玉洁, 沈建强, 马斯琦, 熊立仲\*

作物遗传改良国家重点实验室, 华中农业大学, 武汉

\*通讯作者邮箱: [lizhongx@mail.hzau.edu.cn](mailto:lizhongx@mail.hzau.edu.cn)

引用格式: 方玉洁, 沈建强, 马斯琦, 熊立仲. (2018). 水稻组织总 RNA 抽提. *Bio-101* e1010111. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010111.

**实验原理:** TRIzol 中苯酚和硫氰酸胍, 从组织细胞中快速抽提总 RNA, 并在匀浆和裂解细胞时保持 RNA 的完整性。氯仿萃取有机相后, RNA 溶于水中相中, 用异丙醇沉淀 RNA。

**实验目的:** 抽提水稻叶片、根、茎、穗、愈伤等组织总 RNA。所得 RNA 可用于 Northern 杂交, RT-PCR, mRNA 分离, 体外翻译等实验。

**关键词:** 水稻组织, RNA, 抽提

### 材料与试剂

1. 液氮 (湖北省畜牧局制氧厂)
2. 焦碳酸二乙酯 (DEPC, Sigma D5758)
3. TRIzol (Invitrogen 公司)
4. 苯酚:氯仿:异戊醇 (体积比 25:24:1)或氯仿 (国药试剂, 分析纯)
5. 异丙醇 (国药试剂, 分析纯)
6. 无水乙醇或 95%乙醇 (国药试剂, 分析纯)
7. 75%乙醇: 用 95%乙醇和 0.1% DEPC 处理水配制
8. TE 缓冲液
9. 0.1% DEPC 处理水 (见溶液配方)

### 仪器设备

1. 研钵和研磨棒
2. 移液器: 1 ml、200  $\mu$ l、20  $\mu$ l、10  $\mu$ l、2.5  $\mu$ l (eppendorf)

3. 枪头及配套枪头盒: 1 ml、200  $\mu$ l、20  $\mu$ l (AXYGEN)
4. 离心管和配套管架: 1.5 ml (AXYGEN)
5. 试剂瓶: 250 ml
6. 50 ml 离心管: 分装氯仿、异丙醇和酒精
7. 4 °C 冷冻离心机(eppendorf Centrifuge 5417R)
8. 紫外分光光度计: Nanodrop(Thermo Fisher)

**注: 器具处理与准备**

- 1) 塑料制品: (包括枪头、EP 管等): 新枪头和离心管(经伽玛射线灭菌)可直接使用, 已开封枪头和离心管经高温高压灭菌后使用。
- 2) 玻璃制品: 新试剂瓶需酸泡过夜, 冲洗干净, 0.1% DEPC 处理水浸泡后盖上锡纸, 180 °C, 2 h。

**实验步骤**

1. 组织取样后投入液氮速冻中, 可保存于-80 °C。在液氮中将组织研磨成粉, 预冷 1.5 ml 离心管加入样品 0.1 g, 并加入 1 ml TRIzol (Invitrogen 公司), 迅速混匀。  
*注: TRIzol 中样品可保存于-80 °C 冰箱中。*
2. 室温下静置 5-10 分钟。向每管 1ml TRIzol 加入 200  $\mu$ l 苯酚:三氯甲烷:异戊醇 (体积比 25:24:1)或 200 $\mu$ l 三氯甲烷, 剧烈震荡 30 秒, 室温(25 °C)静置 5 分钟。
3. 4 °C 12,000 rpm 离心 10 分钟, 样品分相为三层, 其中上层水相为 RNA (约为 TRIzol 的 60%)。小心吸取上清 500-600  $\mu$ l 转移至新离心管中。有机相和中间层含有 DNA 和蛋白质, 请勿吸取。  
*注: 此处可重复步骤 2 和步骤 3 以得到更纯的 RNA。*
4. 加入 500  $\mu$ l 的异丙醇, 轻柔颠倒混匀, 室温(25 °C)静置 5-10 分钟。
5. 4 °C 12,000 rpm 离心 10 分钟, 可见白色 RNA 沉淀于离心管底部, 弃上清。
6. 每管加入 1 ml 75%乙醇, 涡旋振荡。
7. 4 °C 12,000 rpm 离心 5 分钟, 弃上清。(若将 RNA 保存于乙醇中, 此时可重新加入 1 ml 预冷的 75%乙醇。在 75%乙醇中, RNA 在 4°C 至少保存 1 周, -20 °C 至少保存 1 年。)
8. 短暂离心后用 20  $\mu$ l 移液器小心吸弃残余 75%乙醇。

- 超净台上将 RNA 沉淀吹至半透明胶状，不能完全干燥(5-10 分钟)，根据沉淀多少加 30-40  $\mu\text{l}$  灭菌 0.1% DEPC 处理水或 TE 缓冲液溶解 RNA 沉淀。
- 55-60°C 孵育 10 分钟。小心混匀样品，并短暂离心。经紫外分光光度计测定浓度后 RNA 样品可保存于 -80 °C 冰箱备用。

## RNA 质量检测和浓度测定

### 1. 电泳检测 RNA 完整性:

制备甲醛变性，1% 琼脂糖凝胶快速电泳，检测 RNA 分子完整性，观察 18S、28S 条带是否清晰(图 1)。

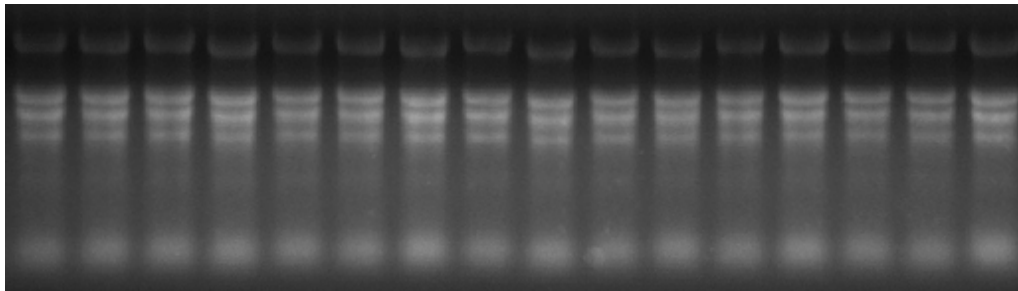


图 1. RNA 琼脂糖凝胶电泳检测示意图

- 紫外分光光度计测定  $A_{260}$  及  $A_{280}$  来定量分析 RNA 的纯度和浓度。用溶解 RNA 的溶剂读取 BLANK，NanoDrop 测定 RNA 浓度。分离 RNA 的理想效果是  $A_{260}/A_{280} = 1.8 \sim 2.0$ 。

## 注意事项

- 试剂配制，器皿处理和操作，严格遵循 RNase free 原则。
- TRizol、苯酚、氯仿等有机试剂易燃、易爆且对皮肤和黏膜有刺激性，需在通风橱内进行操作，避免接触皮肤，避免火源。DEPC 对眼睛和呼吸道粘膜有刺激，是一种潜在致癌物，操作时应在通风橱内进行。
- RNA 沉淀完全干燥，会极大地降低可溶性，部分溶解的 RNA 其  $A_{260}/A_{280}$  比值  $< 1.6$ 。

## 可能出现的问题和解决方法(Troubleshooting):

### 1. RNA 抽提率低或无沉淀:

- 1) 样品未及时处理: 样品分离后短时间内细胞内 RNA 酶被激活, 若不及时提取 RNA, 大部分 RNA 会被降解。若样品暂时不作 RNA 提取, 应立即用液氮冷冻完全, 置-80°C 贮存。
- 2) 系统超负荷: 过多样品, 将引起系统超负荷。系统超负荷常导致匀浆不完全、单位体积内的 DNA 和蛋白质所占比例增大, 使 RNA 不能有效地释放到上清中, 以及降低 RNA 沉淀效率。
- 3) 样品匀浆或裂解不完全: 匀浆不完全时, 基因组 DNA 分子为裂解, 溶液粘稠。变性的蛋白质和基因组 DNA 一起形成絮状凝集物容易包裹 RNA, 使之不能有效地释放到溶液中。
- 4) 沉淀不完全: 从小于 4 mg 植物组织或 RNA 含量低的植物组织中提取 RNA 时, 匀浆体积过大, 造成 RNA 浓度过低而沉淀失败。从该样品中提取 RNA, 应按比例减少抽提溶液。
- 5) 终 RNA 溶解不完全: 未溶解的 RNA 丢失。

### 2. RNA 测定吸光度 $A_{260}/A_{280}<1.65$ :

- 1) 样品匀浆化时所加的 TRIzol 太少。
- 2) 匀浆化后样品没有在室温下放置 5 分钟。
- 3) 分离的水样层有苯酚污染。
- 4) RNA 溶解不完全。
- 5) 溶解 RNA 的溶剂 pH 值不合适。低离子强度和低 pH 溶液会增加 280 nm 处的光吸收值。

### 3. RNA 降解:

- 1) 样品抽提前冻融。
- 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-80°C。
- 3) 抽提过程中有 RNA 酶污染。

### 4. DNA 污染

- 1) 样品匀浆化时所加的 TRIzol 量太少。
- 2) 用于抽提的样品中含有机溶剂(如乙醇, DMSO 等), 强缓冲液或碱性溶液。

## 5. 蛋白多糖和多糖污染:

下述对 RNA 沉淀的改进方法能从抽提的 RNA 中移去复合污染。以匀浆化时每 1 ml TRizol 为例, 在水样层中加入 0.25 ml 异丙醇后再加入 0.25 ml 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形式留在溶液中。对于含有大量多糖的植物, 在最初匀浆化时多加一次离心并使用改进的沉淀方法可改善抽提效果。

## 溶液配方

### 1. 0.1% DEPC 处理水

将 DEPC 按照 1:10,000(体积比)加入双蒸水, 搅拌超过 8 h, 根据需要可高温高压灭菌。