

3. 预防 RNase 污染, 在实际的操作中应遵循以下指南 (参见《分子克隆》)
  - \* 全程佩戴一次性手套。皮肤经常带有细菌和霉菌, 可能污染RNA的抽提并成为 RNA 酶的来源。培养良好的微生物实验操作习惯预防微生物污染。
  - \* 使用灭菌的、一次性的塑料器皿和自动吸管抽提RNA, 避免使用公共仪器所导致的RNA酶交叉污染。
  - \* 使用无 RNA 酶的非一次性的玻璃器皿或塑料器皿。玻璃器皿可以在 150°C 的烘箱中烘烤 4 小时, 塑料器皿可以在 0.5 M NaOH 中浸泡 10 分钟, 用水彻底漂洗干净后高压灭菌备用。
4. 常规的琼脂糖凝胶电泳和变性胶电泳均可以用来分析大 RNA 的质量。好的 RNA 产物在电泳后应该可以看到明显的二条优势核糖体 RNA 带, 分别为~5Kb (28S), ~2Kb (18S), 条带亮度比值约为 2: 1。
5. 检测 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 吸光度比值时, RNA 样品应该溶于 TE 后检测, 如果用水稀释后检测, 由于一般水离子强度和 pH 值低, 会使 OD<sub>280</sub> 升高, 从而使比值降低。
6. 加入裂解液 DL 匀浆后, 样品可在 -60°C-70°C 保存一个月以上。

## 五、操作步骤

\* 第一次使用前请先在漂洗液 RW 瓶和 70%乙醇瓶中加入指定量乙醇!

1. 将石蜡包埋的组织切成 5-10 μm 的薄片后置于 1.5ml 离心管中。
2. 加入 1ml 二甲苯, 涡旋振荡 10 秒。
3. 室温 12,000rpm 离心 2min。去掉上清液, 小心不要去掉沉淀。
4. 加入 1ml 无水乙醇, 涡旋混匀, 室温 12,000rpm 离心 2min。
5. 去掉上清液, 小心不要去掉沉淀。室温晾干 10min 或直至残留的乙醇已挥发完全。
6. 加入 240μl 溶液 PTL 和 10μl 蛋白酶 K 溶液, 涡旋混匀。55°C 孵育 15min, 再 80°C 15min。
7. 加入 750μl 裂解液 DL, 涡旋混匀, 室温放置 2min。
8. 加入 500μl 蛋白沉淀液。盖紧样品管盖, 剧烈振荡 15 秒并将其在室温下孵育 3 分钟。
9. 于 4°C 12,000rpm 离心 10 分钟, 取上清转移到新管中, 进行下一步操作。
10. 加入等体积 70%乙醇 (请先检查是否已加入无水乙醇!), 颠倒混匀 (此时可能会出现沉淀)。得到的溶液和可能沉淀一起转入吸附柱 RA 中 (吸附柱套在收集管内, 溶液太多可分次过柱)。
11. 10,000rpm 离心 45 秒, 弃掉废液, 将吸附柱重新套回收集管。
12. 加 500μl 去蛋白液 RE, 12,000rpm 离心 45 秒, 弃掉废液。
13. 加入 700μl 漂洗液 RW (请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000 rpm 离心 60 秒, 弃掉废液。
14. 加入 500μl 漂洗液 RW, 12,000 rpm 离心 60 秒, 弃掉废液。
15. 将吸附柱 RA 放回空收集管中, 掀开离心柱盖, 12,000 rpm 离心 2

分钟，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。

16. 取出吸附柱 RA，放入一个 RNase free 离心管中，加入 30 $\mu$ l RNase free water（事先在 65-70 $^{\circ}$ C 水浴中加热效果更好），室温放置 2 分钟，12,000 rpm 离心 1 分钟。收集得到纯净 RNA 保存于 -20 $^{\circ}$ C 或者更低。

## 二、原理简介

独特的裂解液裂解细胞和灭活 RNA 酶，然后基因组和 RNA 在高离子盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜，再通过一系列快速的漂洗—离心的步骤，去蛋白液和漂洗液将细胞代谢物、蛋白等杂质去除，最后低盐的 RNase free water 将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱。

## 三、试剂盒特点

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口世界著名公司特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。
2. 稳定性好、纯度高、方便快捷的优点，不需要异丙醇沉淀和乙醇洗涤过程，RNA 可以直接从离心柱上洗脱避免了过度干燥不易溶解问题。
3. 多次漂洗去蛋白过程，提取基因组和 RNA 纯度更高。

## 四、注意事项（实验前必须首先阅读这部分！）

1. 为防止 RNA 降解，所有离心步骤如未加说明，均在 4 $^{\circ}$ C 低温进行。使用转速可以达到 13,000 rpm 的传统台式离心机，如 Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
2. 裂解液 DL 中含有刺激性有害化合物，操作时要戴乳胶手套，**避免**沾染皮肤、眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或者生理盐水冲洗。