



中科瑞泰（北京）生物科技有限公司

Tel: 010-82598075 82597807

Fax: 010-82597807

[http:// www.real-tims.com.cn](http://www.real-tims.com.cn)

E-mail: real-times@vip.163.com

RNA 提取常见问题分析

1 RNA 抽提中自备有机溶液的配制及保存问题

2 总 RNA 的非变性电泳检测

3 RNA 质量检测与鉴定

4 关于 RNA 样品中基因组 DNA 污染的问题

1 RNA 抽提中自备有机溶液的配制及保存问题

RNA 抽提中涉及的有机试剂包括苯酚、氯仿、异丙醇、乙醇等。

苯酚的使用和保存：

苯酚基本已经商品化，选择和保存都不应该有什么问题，4℃避光保存即可；只强调一点：尽管 Tris 饱和的苯酚也可以用于 RNA 的抽提，但使用水饱和苯酚会更好一些，因为 RNA 在 pH 7 以上的溶液中，发生降解的机率大大提高。

下面是关于氯仿、异丙醇、乙醇的有关建议。

选择：国内大的化学试剂公司生产或者监制的分析纯级别试剂（AR）就完全可以满足要求。如国药集团，西陇化工等。

预处理：不需要进行任何的预处理。绝对不可以高温高压灭菌，这三种试剂的沸点都低于 100℃，高温高压可能导致危险。

75% 乙醇的配制

一份无菌无酶的水（DEPC 水）与 3 份（体积）无水乙醇混匀即成。不要使用量筒等过渡容器。事实上，70% - 80% 的乙醇都具有较好的洗涤能力，使用都不会导致片段比较大的核酸的丢失，所以，配制时就不要为了准确而左勾右兑。75% 乙醇也不可以高温高压灭菌，原因同无水乙醇。

保存：

第一，要使用新的未开封的试剂，用后做好标记。其次，分成相对小一点的包装（50ml - 100ml）；500ml 的瓶子取液是非常不方便的，移液器的杆子往往都进入了瓶口里，非常容易造成污染。第三，塑料瓶子密封性好，装醇类试剂是非常好的选择；但氯仿绝对不要使用塑料瓶子。第四，盖紧瓶盖，作好标记。第五，保存于室温。将有机试剂保存于冰箱的人不在少数，但这么做却是令人奇怪的。首先，任何挥发性的东西都不保存在冰箱（除非万不得已，如 DEPC）。其次，与外面相比，冰箱除了灰尘少一点外，什么都会比外面多。第三，在室温打开低温的瓶子，将导致空气大量进入瓶子，增加了污染的风险。

使用：

非常幸运的是，有机试剂对菌污染和酶污染似乎有我们想象不到的抑制和灭活作用，所以，使用这些试剂没有特殊的要求，按正常抽提 RNA 的要求就完全可以了。吸取有机试剂时，最好使用比要吸取的体积大的移液器，因为有机试剂有越吸越多的现象，试剂容易接触到移液器的杆头，污染不说，氯仿还会腐蚀杆头。

2 总 RNA 的非变性电泳检测

总 RNA 的电泳检测，原来我使用 Lambda DNA/EcoR I（或者 Hind III）酶切 Marker，现在基本上不再用 Marker 了。指示剂一定是溴酚蓝加二甲苯氰，胶浓度 1-1.2%。加样后，开始电泳（电压的选择的唯一依据是，我后面的时间安排）。溴酚蓝出孔 2-3cm 后终止电泳，紫外观察。首先能吸引我的一定是非常亮的位置（是否上样过量），然后观察溴酚蓝到二甲苯氰之间的条带情况（降解情况），再就是加样孔（杂质残留情况），最后是 23kb 处是否有条带（基因组 DNA 残留情况）。如果同时抽提的样品是多个，在具体分析某一个样品前，要先综合一下该批次抽提的总的成败。如果全部有某现象，可能与试剂有关，也可能与样品有关，还可能与操作有关；如果只有部分有该现象，更可能与操作有关，少部分与样品有关（先做的和后做的可能也有区别）。只有在宏观上有了一个概念，微观分析才有价值，才准

确。

微观分析重点要看如下几个位置：

1: 溴酚蓝偏下一点点。这个位置提供的是小片段 rRNA (5S 等)的信息及降解的辅助指标。有可能有，也可能没有。没有不是问题，因为柱子抽提方法及 TRIZol 的高盐沉淀方法，都会去除大部分小的 RNA 片段。

问题一：特别亮，宽度甚至超过了加样孔的宽度。特别亮首先提示上样量过大，而过大的上样量是很容易掩盖一些信息的，导致判读错误。不管能否看见大片段 RNA，也不管带型如何，碰到小片段非常亮的情况，最好大大降低上样量重新跑一次，再判读。

2: 指示剂溴酚蓝到二甲苯氰之间或者其上面一点点。这个位置提供的是大片段的 rRNA (28S/18S 等)完整性的信息。条带清晰弥散轻微，表示完整性好；否则表示完整性差。

问题一：比例达不到 2:1。条带亮度比例，没有必要太放在心上，因为比例不是非变性电泳的结论；同时，有些物种本身就不具备这样的比例，关键是条带是否清晰，弥散少。

问题二：有多条带。多条带也不是问题，有些物种-如植物，本身就是有多条带。即使本身只“应该”有两条带的出现了多条带，也不要放在心上，因为这只是 RNA 的二级结构的一种体现 (如同质粒的构型)；同时，它不会对后续实验产生任何影响。

问题三：看不见条带。如果能看见小的片段 (或者其它泳道能看见)，以及小的片段不是非常亮，多提示降解；如果小片段非常亮，见 1。

问题四：有弥散。如果小片段不是非常亮，多提示降解；如果小片段非常亮，见 1。如果弥散同时也向加样孔方向发生，则还需要考虑电泳的问题和盐残留的问题，因为单纯的降解是不可能发生向上的弥散的。

问题五：非常亮的一大团，不成条带状。几乎都与上样过量有关，降低上样量重新跑一次，再判读。

许多人喜欢与精确的 DNA Marker 比对大小，来判断 RNA 的条带大小。这是有问题的，可能产生误导；我自己就碰到过 28S 在接近 2kb 位置，也有接近 1kb 位置的情况，这与胶浓度以及胶的生产厂家有关。

3: 23kb 处。这个位置提供的是基因组 DNA 残留量的信息。如果不使用 DNase I 处理，任何方法抽提的总 RNA 都残留有基因组 DNA，只是残留量的多少有区别。

问题一：条带可见，且无弥散。基因组 DNA 的残留，主要与方法/试剂有关，其次与样品使用量有关。柱子抽提方式，如果过程中没有使用苯酚，基因组 DNA 的残留量都是比较高的。TRIZol 方法出现基因组 DNA 的残留，多与样品过量有关；同时也与吸取上清的操作不当有关。

问题二：条带清晰，但有弥散。首先肯定是有基因组 DNA 的残留，但为什么会弥散？如果非常亮，弥散可以由上样过量导致。如果不是很亮，则看加样孔：加样孔不亮，提示高盐残留；加样孔很亮，则见下面 4。

4: 加样孔。这个位置提供的是杂质残留的信息。导致加样孔发亮的原因非常多，其中最主要的是非蛋白质/非核酸类的大分子杂质 (如多糖、多酚) 的残留以及蛋白质和核酸的同步残留。大分子杂质的残留，首先与样品本身有关 (如植物、菌、动物肝脏、肺等)，其次与所使用的方法/试剂去除这些杂质的能力有关。蛋白质和核酸的同步残留，少量与样品有关 (如肌肉)，大部分则与所使用的方法/试剂以及操作不当有关。另外，样品使用过量，也是一个重要原因。

5: 弥散问题。这个问题可以出现在胶体的任何位置。一般讲，降解是向下弥散的；向上的弥散 (即拖尾) 多与上样核酸中的杂质有关。如果向下的弥散和拖尾同时出现，更可能的还是杂质残留的问题。当然，如果电泳体系出了问题，也会出现这样的现象的。

判读电泳照片，必须综合考虑，方能找准问题的方向。不要看了照片，像降解的就认为是降解；孔一亮，就认为是蛋白残留。总之，照片判读，是一个经验的活，有时候说都不清楚。但是，多研读结果不好的照片，一定会对今后的实验大有帮助。

3 RNA 质量检测与鉴定

方法一、检测 RNA 溶液的吸光度

280、320、230、260nm 下的吸光度分别代表了核酸、背景（溶液浑浊度）、盐浓度和蛋白等有机物的值。一般的，我们只看 OD260/OD280 (Ratio, R)。A260/A280 是衡量蛋白质污染程度的指标，2.0 是高质量 RNA 的标志，但受二级结构等的影响，读数可能会有一些变化，高质量的 RNA，A260/A280 读数（10mM Tris, pH7.5）在 1.8-2.1 之间，有时甚至 >2.1。有资料指出：同一个 RNA 样品，假定在 10mM Tris, pH7.5 溶液中测出的 A260/A280 读数 1.8-2.1 之间，在水溶液中所测读数则可能在 1.5-1.9 之间，原因是因为 A260/A280 读数受测定所用溶液的 pH 值影响。当 $R < 1.8$ 时，溶液中蛋白或者其他有机物的污染比较明显，你可以根据自己的需要决定这份 RNA 的命运。当 $R > 2.2$ 时，说明 RNA 已经水解成单核酸了。另外，需要注意的是，样品的稀释倍数要使得分光光度计的读数在 0.15-0.5 之间，因为此时线性最好，读数准确

方法二、RNA 的电泳图谱

一般的，RNA 的电泳都是用变性胶进行的，但是根据我的经验，如果你仅仅是为了检测 RNA 的质量是没有必要进行如此麻烦的实验的，用普通的琼脂糖胶就可以了。电泳的目的是在于检测 28S 和 18S 条带的完整性和他们的比值，或者是 mRNA smear 的完整性。一般的，如果 28S 和 18S 条带明亮、清晰、条带锐利（指条带的边缘清晰），并且 28S 的亮度在 18S 条带的两倍以上，我们认为 RNA 的质量是好。以上是我们常用的两种方法，但是这两种方法都无法明确的告诉我们 RNA 溶液中有没有残留的 RNA 酶。如果溶液中有非常微量的 RNA 酶，用以上方法我们很难察觉，但是大部分后续的酶学反应都是在 37 度以上并且是长时间进行的。这样，如果 RNA 溶液中有非常微量的 RNA 酶，那么在后续的实验 RNA 就可能发生降解。下面，我们介绍一个可以确认 RNA 溶液中有没有残留的 RNA 酶的方法。

方法三、保温试验

方法很简单，按照样品浓度，从 RNA 溶液中吸取两份 1000 ng 的 RNA 加入至 0.5 ml 的离心管中，并且用 pH7.0 的 Tris 缓冲液补充到 10 ul 的总体积，然后密闭管盖。把其中一份放入 70°C 的恒温水浴中，保温 1 h。另一份放置在 -20°C 冰箱中保存 1 h。时间到了之后，取出两份样本进行电泳。电泳完成后，比较两者的电泳条带。如果两者的条带一致或者无明显差别，则说明 RNA 溶液中没有残留的 RNA 酶污染，RNA 的质量很好。相反的，如果 70°C 保温的样本有明显的降解，则说明 RNA 溶液中有 RNA 酶污染。

4 关于 RNA 样品中基因组 DNA 污染的问题

其实在 RNA 实验中，基因组 DNA (genomic DNA, gDNA) 的污染比 RNA 的提取更让人头疼，因为 DNA 的污染经常会让我们后续实验中出现假阳性结果。那么我们怎么才能解决 RNA 提取中基因组的污染问题呢？遗憾的是，到目前为止，所有的 RNA 提取方法都不能完全杜绝 DNA 的污染。要想得到 ultra pure 的 RNA，只能提取结束后用 RNase-free 的 DNase 消化样品（下面将有详细介绍）。下面将从几个方面介绍怎样降低或方便检测基因组 DNA 污染的问题。

1、引物设计阶段：在引物设计时，设计跨内含子的上下游引物。这样在反转录结束后，可以根据扩增片段大小判断是否有 gDNA 的污染。然而这种方法有个缺点：仅适用于已知序列，未知序列此方法不奏效。

2、RNA 提取阶段：使用 TRIzol 提取时，氯仿分相后吸取上清时切记一个原则：吸取上清宁少勿多。一定不要用枪头触及中间相。用 200 μ l 移液器多吸几次比用 1ml 移液器吸一次污染 gDNA 的危险性要小很多。另外，很重要的一点，起始材料宁少勿多（其实，这对提取到高质量的 RNA 同样重要），如果 50mg 材料得到的 RNA 能胜任 RT 需要，不要用 100mg。实验时，最好先用材料，根据提取效果再逐渐增加样品起始量。当然，做 Northern 的话另当别论（Northern 也勿须过份担心 gDNA 的污染）。当使用试剂盒离心柱方法提取 RNA 时，gDNA 污染要比用 TRIzol 方法要更加严重。Protocol 中一般建议在离心柱上进行 DNase 的消化（下面有详细介绍）。

3、RNA 样品的处理：上面已经提到，RNA 样品中不可能没有 DNA 的污染，那么我们怎样去除 gDNA 的污染呢？“RNA” company-Ambion 提供了 3 种方法

(http://www.ambion.com/techlib/tb/tb_181.html):

① DNase 消化 ② PC 抽提 (phenol-chloroform extraction) ③ LiCl 沉淀。其中 DNase 消化和 PC 抽提都能有效去除 gDNA 污染，而 LiCl 沉淀方法不能有效去除 gDNA 污染。DNase 消化 RNA 的关键一步是

消化后样品中的残余酶活性完全灭活，否则 RT 中它将会降解 cDNA。Ambion 给出了四种灭活方法，其中最简单有效的方法是热灭活：样品消化结束后 70℃ 处理 5 分钟。

我们设计了以下程序可用来快速方便去除 gDNA 的污染：

1. 取 RNase-free 的离心管，依次加入
10-15μg 的 RNA 提取物
1μl 的 10xDNaseI Buffer
1U 的 DNase I (RNase-free)
用 DEPC 水定容至 10μl
2. 室温孵育 15 min;
3. 在反应液中加入 1μl 的 20mM EDTA (RNase-free) ,70℃放置 5 分钟。

RNA 提取试剂盒由于环保安全，操作快捷一直受人们青睐。然而，使用试剂盒进行 RNA 提取时，由于不使用酚，氯仿，gDNA 的污染更加严重，有时 gDNA 的亮度与 RNA 亮度相近。供应商建议用柱上 DNase 消化的方式去除 gDNA 污染：在 RNA 挂到离心柱上后，将 DNase 和 DNase buffer 一起加到离心柱的硅胶膜上，室温放置 15 分钟即可。这种方法能很好地去除 DNA 的污染，也降低了 RNA 的污染可能性。然而，由于 RNase-free 的 DNase 价格不菲，大多数供应商包括 Qiagen 等 DNase set 要单独购买，这样就使得使用试剂盒提取 RNA 花费太高 (Qiagen 的 RNeasy 系列，一个样品约 200 人民币!)，让人望盒兴叹。那么有没有一种价格适中，gDNA 污染小，又兼具环保快捷的试剂盒呢？答案肯定的。我们都知道，TRIzol 是去除 gDNA 污染比较好的试剂，它利用 DNA 溶解于酸性酚中的原理去除了 RNA 中绝大多数 gDNA。如果把 TRIzol 提取和离心柱结合 RNA 结合起来将能达到上述目的，能快捷得到 gDNA 污染小的 RNA。目前，国内外市场上已经有这种 RNA 提取试剂盒在销售。

RNA 抽提之应知应会

背景介绍

对大部分实验人员来说，RNA 抽提比基因组 DNA 抽提要困难得多。事实上，现有的 RNA 抽提方法/试剂，如果用于从培养细胞中抽提 RNA，比抽提基因组 DNA 更方便，成功率也更高。那为什么同样的方法用于组织 RNA 的抽提，总会碰到问题呢？

组织 RNA 抽提失败的两大现象是：RNA 降解和组织内杂质的残留。关于降解问题，首先看一下为什么从培养细胞中抽提 RNA 不容易降解。现有的 RNA 抽提试剂，都含有快速抑制 Rnase 的成分。在培养细胞中加入裂解液，简单的混匀，即可使所有的细胞与裂解液充分混匀，细胞被彻底裂解。细胞被裂解后，裂解液中的有效成分立即抑制住细胞内的 Rnase，所以 RNA 得以保持完整。也就是说，培养细胞由于很容易迅速与裂解液充分接触，所以其 RNA 不容易被降解；反过来讲，组织中的 RNA 之所以容易被降解，是因为组织中的细胞不容易迅速与裂解液充分接触所致。因此，假定有一种办法，在抑制 RNA 活性的同时能使组织变成单个细胞，降解问题也就可以彻底解决了。液氮碾磨就是最有效的这样一种办法。但是，液氮碾磨方法非常麻烦，如果碰到样品数比较多的时候更加会有此感觉。这样就产生了退而求其次的方法：匀浆器。匀浆器方法没有考虑细胞与裂解液接触前如何抑制 Rnase 活性这个问题，而是祈祷破碎组织的速度比细胞内的 Rnase 降解 RNA 的速度快。电动匀浆器效果较好，玻璃匀浆器效果较差，但总的来说，匀浆器方法是不能杜绝降解现象的。因此，如果抽提出现降解，原来用电动匀浆器的，改用液氮碾磨；原来用玻璃匀浆器的，改用电动匀浆器或者直接用液氮碾磨，问题几乎 100% 能获得解决。影响后续实验的杂质残留问题，其原因比降解更多样，解决方法相应也不同。总之，如果出现降解现象或者组织内杂质残留现象，则必须对具体实验材料的抽提方法/试剂进行优化。优化大可不必使用你的宝贵样品：可以从市场上购买一些鱼/鸡之类的小动物，取相应部分的材料用于 RNA 抽提，其它部分用于抽提蛋白质 - 用嘴碾磨，肠胃抽提。

究竟怎样才能确保 RNA 抽提的成功率呢？实验前选择合适的方法/试剂，这是最重要的一步；好的方法/试剂在确保成功的同时，操作方便，经济实用。当然，你的选择可能仍然有问题，这就需要能正确

分析实验失败的原因，以便改进。

实验前方法/试剂的选择

0: 抽提 RNA 的目的

RNA 用于不同的后续实验，其质量要求不尽相同。cDNA 文库构建要求 RNA 完整而无酶反应抑制物残留；Northern 对 RNA 完整性要求较高，对酶反应抑制物残留要求较低；RT-PCR 对 RNA 完整性要求不太高，但对酶反应抑制物残留要求严格。投入决定产出；每次都以获得最高纯度的 RNA 为目的，劳民伤财。

1: 样品的收集/保存 - 影响降解的因素

样品离开活体/或者原来的生长环境后，样品中的内源酶即会开始降解 RNA，降解速度与内源酶含量及温度有关。传统上，只有两个办法可以彻底抑制内源酶活性：1 - 立即加入裂解液并且彻底而迅速地匀浆；2 - 切成小块后立即投入液氮冷冻。后者适合所有的样品，而前者只适合细胞及内源酶含量较低的并且较容易匀浆的组织。象植物组织，肝脏，胸腺，胰腺，脾脏，脑，脂肪，肌肉组织等，不是内源酶含量高，就是不容易匀浆，所以最好都先用液氮冷冻起来，再往下做。

样品冷冻保存的正确处理方法为：将样品从活体上取下，迅速切割小后，立即放入液氮中速冻。再移入 -70C 冰箱或者直接放在液氮罐保存。样品不经过液氮冷冻而直接放入 -70C 冰箱保存，RNA 有被降解的风险。

经过裂解液彻底匀浆的样品，可以在 -20C 冰箱中保存一个月左右。(我们的实验显示，这样保存的样品，完整性没有任何问题，但得率似乎下降了一些。)

液氮保存及立即匀浆都有各自的缺陷：

立即匀浆的问题：样品不适合直接匀浆，采集样品的场所不允许做实验。

液氮保存的问题：没有液氮，不能将液氮带入采集样品的场所，液氮保存样品的抽提操作很麻烦等。

2: 样品的破碎及匀浆 - 影响降解和得率的因素

样品的粉碎是为了彻底匀浆，匀浆是为了使 RNA 彻底完整地释放出来。一般讲来，细胞无须粉碎即可直接匀浆，组织需要破碎后才能匀浆，酵母菌和细菌需要先用相应的酶破壁后才能匀浆。内源酶含量较低并且较容易匀浆的组织可以在裂解液中通过匀浆器一次完成破碎和匀浆过程；植物组织，肝脏，胸腺，胰腺，脾脏，脑，脂肪，肌肉组织等样品，它们不是内源酶含量高，就是不容易匀浆，所以必须将组织的粉碎和匀浆分开操作。最可靠而且得率最高的破碎方法是使用液氮的碾磨，最可靠的匀浆方法是使用电动匀浆器。使用液氮碾磨要特别注意一点：在整个碾磨过程中，样品不得融化，因为冷冻过的样品内必定形成冰晶，破坏了细胞内部的结构，使其内源酶更容易起作用。

现有的 RNA 抽提试剂，都含有快速抑制 Rnase 的成分。在培养细胞中加入裂解液，简单的混匀，即可使所有的细胞与裂解液充分混匀，细胞被彻底裂解。细胞被裂解的同时，裂解液中的有效成分立即抑制住细胞内的 Rnase，所以 RNA 得以保持完整。也就是说，培养细胞由于很容易迅速与裂解液充分接触，所以其 RNA 不容易被降解；反过来讲，组织中的 RNA 之所以容易被降解，是因为组织中的细胞不容易迅速与裂解液充分接触所致。因此，假定有一种办法，在抑制 RNase 活性的同时能使组织变成单个细胞，降解问题也就可以彻底解决了。液氮碾磨就是最有效的这样一种办法。但是，液氮碾磨方法非常麻烦，如果碰到样品数比较多的时候更加会有此感觉。这样就产生了退而求其次的方法：匀浆器。匀浆器方法没有考虑细胞与裂解液接触前如何抑制 Rnase 活性这个问题，而是祈祷粉碎组织的速度比细胞内的 RNase 降解 RNA 的速度快。电动匀浆器效果较好，玻璃匀浆器效果较差，但总的来说，匀浆器方法是不能彻底杜绝降解现象的。因此，如果抽提出现降解，原来用电动匀浆器的，改用液氮碾磨；原来

用玻璃匀浆器的，改用电动匀浆器或者直接用液氮碾磨，问题几乎 100% 能获得解决。

带针头的一次性注射器是一个非常有用的工具。与玻璃匀浆器相比，它有三大优点：非常方便；匀浆更彻底；可以更好地打断基因组 DNA，从而降低裂解液黏度。强烈建议在抽提 RNA 前准备一些一次性注射器，以便在实验过程中，一旦发现裂解液体系较为粘稠，可以及时解决。

3: 裂解液的选择 - 影响操作方便程度，内源杂质残留的因素

常用的裂解液几乎都能抑制 **Rnase** 活性，因此，选择裂解液的重点是要结合纯化方法一起考虑。只有一个例外：高内源酶含量的样品建议使用含苯酚的裂解液，以增加灭活内源酶的能力。

4: 纯化方法的选择 - 影响内源杂质残留，抽提速度的因素

对于干净的样品，如细胞，手边的几乎任何纯化方法都可以获得满意的结果。但对于许多其它样品，尤其是植物，肝脏，细菌等杂质含量很高的样品，选择合适的纯化方法是至关重要的。柱离心式纯化方法抽提速度快，能有效去除影响 RNA 后续酶反应的杂质，但价格较贵；使用经济而经典的纯化方法，如 LiCl 沉淀等，也可以获得满意的结果，但操作时间长。

RNA 质量的判断

1: 完整性的判断

通常，使用电泳判断 RNA 的完整性。理论上，完整的 RNA 拥有 28S:18S = 2.6:1 左右的比例（即分子量之比），而大部分资料则强调 28S:18S = 2:1 的比例。事实是，除了细胞外，从其它样品中抽提的 RNA 几乎很难得到 2:1 的比例，原因是大分子 rRNA 的二级及三级结构程度更高，所以较之小分子 rRNA 更容易降解；当 28S 有相当程度的降解时，18S（包括 mRNA）却相当完整。（此结论是 Ambion 公司使用 Agilent Bioanalyzer 获得）。使用电泳准确评估 28S:18S 比例并不容易，因为 RNA 的电泳结果受许多因素的影响，包括二级结构，电泳条件，上样量，被 EB 饱和的程度等。

另外，即使来自不同器官的组织，在确定其 mRNA 没有降解的前提下，其比例也有区别（如肝/肺的比例较低）。可以说，2:1 是高质量的标准，但低于 2:1 并不就是质量低。

非变性电泳能用于检测，但问题是：RNA 的二级结构改变了泳动方式，使之不按真实大小泳动；同时，条带不够紧密，甚至出现多条带。变性电泳能解决这些问题，但作为一般的检测方法有些烦琐。使用非变性电泳检测 RNA，当用 1.0 - 1.2% 的进口品牌 Agarose 电泳，以 DNA Marker 做对照，28S 和 18S 条带分别在 2kb 和 0.9kb 左右；更简单地，直接使用含溴酚蓝和二甲苯青指示剂的上样液，28S 和 18S 条带正好处于两种指示剂之间。如果 28S 和 18S 条带清晰，且 28S:18S > 1，该完整性可以满足绝大部分后续实验要求了。

2: 纯度的判断

通常，使用 A260/A280 判断 RNA 的纯度。A260/A280 是一个给大家带来许多困惑的指标。首先要明确该指标用于核酸的原始含义是：纯的 RNA，其 A260/A280 = 2.0 左右。纯 RNA 是‘因’，A260/A280 = 2 是‘果’。现在大家却在拿 A260/A280 当‘因’用，认为“如果 A260/A280 = 2，所以 RNA 是纯的”，自然会产生困惑。有兴趣的话，可以在你的 RNA 样品中加入一点抽提中经常使用的试剂，如苯酚，异硫氰酸胍，PEG 等，再测 A260/A280 比值。现实是，许多抽提 RNA 时使用的试剂，以及样品中的许多杂质都在 A260 和 A280 处附近有吸收，对 A260/A280 产生影响。

目前最具有指导性的做法是：对 RNA 样品在 200-300 nm 范围扫描。纯 RNA 的曲线具有如下特点：曲线平滑，A230 和 A260 是两个拐点，A300 接近 0，A260/A280 = 2 左右，A260/A230 = 2 左右，A260/A215 = 1 左右。如果没有扫描数据，除了测定 A260/A280 比值外，也一定要测定 A260/A230

比值，因为该比值对所有影响酶反应的杂质的残留更敏感。另外，要考虑设备的线形范围（如 A260 要处于 0.1 - 0.5 之间），超出线形范围的读数没有太大参考价值的。另外有两个有趣的现象：在水中测定 A260/A280，比值将变低 0.3 左右；而在 10mM EDTA 中测定的比值比在 1mM EDTA 中测定的高 0.2 左右。

3: 小结

28S:18S > 1 的完整性是能满足绝大部分实验要求的，而且对绝大部分实验来说，纯度比完整性更重要，因为绝大部分的后续实验是酶反应。残留的有机物，金属离子，酶等将对后续酶反应产生巨大的影响。下面的实验是非常简单实用的：RNA 样品 37°C 温浴 2 小时后，与未温浴的 RNA 同时电泳。如果温浴后 RNA 降解超过 20%，样品则可能不适合后续的酶反应。

总之，高完整性，低杂质含量的 RNA 称为高质量的 RNA。在实际工作中，根据 RNA 用于不同的后续实验，其质量要求也不尽相同。cDNA 文库构建要求 RNA 完整而无酶反应抑制物残留；Northern 对 RNA 完整性要求较高，对酶反应抑制物残留要求较低；RT-PCR 对 RNA 完整性要求不太高，即使有相当程度的降解也可以接受，但对酶反应抑制物残留要求严格。因此，根据你的后续实验要求选择合适的抽提方法和试剂，将注意力集中于控制影响你后续实验的因素上，自然能获得事半功倍的效果。

特殊组织的抽提

纤维组织：心脏/骨骼肌等纤维组织抽提 RNA 关键在彻底破碎组织。这些组织细胞密度低，故单位重量的组织 RNA 的含量就少，最好用尽可能多的起始量。一定要在冷冻条件下将组织彻底磨碎。

蛋白/脂肪含量高的组织：脑/植物脂肪含量高，PCI 抽提后，上清含白色絮状物。必须用氯仿再次对上清进行抽提。

核酸/核酶含量高的组织：脾/胸腺等核酸和核酶含量很高。在冷冻条件下碾磨组织，再快速匀浆，能有效灭活核酶。但如果裂解液太粘稠（因为核酸含量高的缘故），PCI 抽提不能有效分层；加入更多裂解液可以解决此问题。多次 PCI 抽提可以去除更多残留的 DNA。如果加入醇后马上有白色沉淀形成提示有 DNA 污染。溶解后用酸性 PCI 再次抽提，可以去除 DNA 污染。

植物组织：植物组织比动物组织更为复杂。一般，大家都是在液氮条件下对植物进行碾磨的，所以内源酶作用使 RNA 降解的现象不常见。如果降解问题不能解决，几乎可以肯定是样品中的内含杂质导致。许多植物的内含杂质都会导致残留，之所以残留，往往是因为这些杂质与 RNA 有一些相似性：你沉淀我沉淀，你吸附我吸附。这些特点决定了它们是非常强的酶抑制剂。目前，商品化的 RNA 抽提试剂经过小量调整，可以适合几乎所有的动物组织，但却没有一种商品化的 RNA 抽提试剂，可以适合大部分植物组织。

RNA 抽提的“三大纪律八项注意”

纪律一：杜绝外源酶的污染。

注意一：严格戴好口罩，手套。

注意二：实验所涉及的离心管，Tip 头，移液器杆，电泳槽，实验台面等要彻底处理。

注意三：实验所涉及的试剂/溶液，尤其是水，必须确保 RNase-Free。

纪律二：阻止内源酶的活性

注意四：选择合适的匀浆方法。

注意五：选择合适的裂解液。

注意六：控制好样品的起始量。

纪律三：明确自己的抽提目的

注意七：任何裂解液系统在接近样品最大起始量时，抽提成功率急剧下降。

注意八：RNA 抽提成功的唯一经济的标准是后续实验的一次成功，而不是得率。

RNase 污染的 10 大来源

- 1: 手指头 - 手指头是外源酶的第一来源，所以必需戴手套并且频繁更换。另外，口罩也必需戴，因为呼吸也是一个重要的酶来源。戴手套口罩的另外的好处是保护实验人员。
- 2: 枪头，离心管，移液器 - 单纯的灭菌是不能灭活 RNase 的，所以枪头和离心管要用 DEPC 处理，即使是标明为 DEPC 处理过的。移液器最好是专用的，用前用 75% 的酒精棉球搽拭干净，尤其是杆子；另外，一定不要使用褪头器褪头。
- 3: 水/缓冲液 - 一定要确保无 RNase 污染。
- 4: 实验台面 - 最起码要用 75% 的酒精棉球搽拭干净。
- 5: 内源 RNase - 所有组织均含内源酶，故组织用液氮速冻是降低降解的最好办法。液氮保存/碾磨方法的确不方便，但对有一些内源酶含量很高的组织，却是唯一的办法。
- 6: RNA 样品 - RNA 抽提产物可能都会含痕量的 RNase 污染。
- 7: 质粒抽提 - 质粒抽提往往用到 RNase 降解 RNA，残留的 RNase 要用 Proteinase K 消化，PCI 抽提。
- 8: RNA 保存 - 即使低温保存，痕量的 RNase 亦会导致 RNA 降解。长期保存 RNA 的最好办法是盐/醇悬液，因为醇在低温时抑制所有的酶活性。
- 9: 阳离子 (Ca, Mg) - 在含这些离子时，80C 加热 5 分钟会导致 RNA 被剪切，故如果 RNA 需要被加热，保存液需要含螯合剂 (1mM Sodium Citrate, pH 6.4)。
- 10: 后续实验所用的酶 - 酶均有可能被 RNase 污染。

RNase 和 DEPC 处理

- 1: 高压灭菌是可以灭活部分 RNase A 的。实验证明：37 C 与 RNA 反应，没有灭菌的 PBS，活性点为 100 pg/ml；灭菌后，活性点为 100 ng/ml。当然，灭菌后 RNase 仍然不能认为没有残留。
- 2: DEPC 在水中半衰期为 30 分钟。0.1% 的 DEPC 灭菌 15 分钟可以认为彻底破坏了 DEPC。破坏后可以闻到一点气味。
- 3: 在 1M Tris, 1M HEPES, 1M MOPS 中分别加入 1ug/ml RNase A 和 0.1% 及 1% DEPC 实验。结果提示，0.1% DEPC 只对 MOPS 有效，而 1% DEPC 对三种试剂都有效。
- 4: 0.01% DEPC, 0.1% DEPC, 1% DEPC 有效去除 RNase A 的浓度分别为：100 ng/ml, 500ng/ml, 1 ug/ml。但要注意，DEPC 灭活后的副产品，对有些后续实验是有影响的。

RNA 抽提的 10 大窍门

- 1: 快速阻止 RNase 活性 - 样品收集后快速冷冻，裂解时快速操作灭活 RNase。
- 2: 选择合适的抽提方法 - 高核酶含量的组织，脂肪组织最好用含苯酚的方法。
- 3: 预判质量要求 - Northern, cDNA 文库构建对完整性要求高，RT-PCR, RPA (Ribonuclease protection assay) 对完整性要求不是很高。RT-PCR 对纯度 (酶抑制物残留) 要求很高。
- 4: 彻底匀浆是提高得率和降低降解的关键。
- 5: 检查 RNA 的完整性 - 电泳检测，28S:18S =2:1 是完整的标志，1:1 对大部分实验也是可以接受的。
- 6: 去除 DNA - 用于 RT-PCR, array analysis 最好用 Dnase I 去除 DNA。
- 7: 降低外源酶的污染 - 不能从外面又导入酶。
- 8: 低浓度的核酸浓缩时，要加入助沉淀试剂。但要防止助沉淀剂含酶及 DNA 污染。
- 9: 彻底溶解 RNA，必要时可以 65C 加热 5 分钟。
- 10: 合适的保存方法 - 短时间可以 -20C 保存，长期请保存于 -70C 以下。

附：TRIzol 操作解析

1: 样品的裂解 - 根据你的样品, 选择一个使用方法。

A: 组织的裂解

方法 a: 加入 TRIzol, 用玻璃匀浆器 (少量的可以使用 Pellet Pestle) 将组织彻底匀浆。将匀浆液移入离心管中。

方法 b: 液氮冷冻条件下将组织捣碎成粉末。在液氮完全挥发前, 将捣碎的组织移入已经加入了 TRIzol 的离心管中, 立即用移液器吹打混匀。

B: 细胞的裂解

a: (悬浮培养细胞) 300 x g 离心 5 分钟后彻底弃上清。加入 TRIzol, 立即用移液器吹打以彻底混匀。

b: (贴壁培养细胞) 将培养皿中的培养液彻底弃干净。将 TRIzol 直接加在培养皿中的细胞上。立即用移液器吹打使细胞脱壁后, 将裂解液移入离心管中。

C: 人血液的裂解

先低速离心或者使用其它方法获得白细胞, 再按照悬浮培养细胞操作。

• 下面是 1 ml TRIzol 可以裂解的样品最大量。你可以根据你的具体样品量增加或者减少 TRIzol 的用量, 但 TRIzol 的最小用量建议不低于 0.8 ml:

动物组织的裂解: 最大起始量 30 - 100 mg。(高核酶/核酸含量的、高脂肪含量的动物组织; 最大起始量 30 - 50 mg, 其它的动物组织, 最大起始量 50 - 100 mg。)

悬浮培养细胞的裂解: 最大起始量 5 - 10 x 10⁶。

贴壁培养细胞的裂解: 如果是直接在培养器皿中裂解, 不管细胞数量是多少, 最大起始量为 10 cm²。如果使用机械或者酶消化使细胞脱壁收集后再裂解, 则按悬浮培养细胞对待。使用 TRIzol LS Reagent 更经济、可靠。

人全血的裂解: 先获得白细胞, 再按照悬浮培养细胞操作。

植物组织的裂解: 最大起始量 100 mg, 使用方法 b 裂解。

• 如果同时要抽提多个样品, 为防止 RNA 降解, 正确的操作是: 一次取出一个样品, 彻底匀浆后, 置于冰上; 再取出一个样品, 同样处理, 直到所有样品全部彻底匀浆。再同步进行下一步操作。

• 操作必须非常快速, 才能确保 RNA 不被降解。另外, 样品量一定不要超过许可的范围, 否则将导致一系列问题。

• 如果同时要抽提 RNA 和 DNA, 不能使用电动匀浆器匀浆。用注射器抽打裂解物能帮助裂解, 提高得率。但如果同时要抽提长片段基因组 DNA, 则不能使用注射器抽打。

2: 根据样品, 选择使用方法 A 或者方法 B。如果不确定, 则使用方法 B。

A (细胞, 血液, 一般动物组织) - 室温静置 5 分钟。再按照 1 ml TRIzol 使用 200 ul 的比例加入氯仿, 用力颠倒离心管以混匀。室温静置 2 - 15 分钟使之分层后, 4°C 12,000 x g 离心 15 分钟。

B (植物, 脂肪及肝脏等某些杂质含量较高的样品) - 室温静置 5 分钟后, 4°C 12,000 x g 离心 10 分钟, 将上清移入另外一个离心管中。再按照 1 ml TRIzol 使用 200 ul 的比例加入氯仿, 用力颠倒离心管以混匀。室温静置 2 - 15 分钟使之分层后, 4°C 12,000 x g 离心 15 分钟。

• 4°C 离心对于降低基因组 DNA 的污染是很重要的。

• 杂质含量高的样品一定要使用 2-B 操作。2-B 操作不仅可以大部分杂质离心去除, 也可以将大片的基因组 DNA 离心去除, 方便加入氯仿后的分层, 所以没有什么坏处。不过, 如果想同时抽提总 RNA 和基因组 DNA, 则还是要使用 2-A 操作。

• 加入氯仿后的混匀是非常重要的, 否则会导致一系列的问题。不推荐振荡混匀, 而推荐直接用手混匀: 将管底斜向朝上, 手斜向快速摇动, 使体系成粉色乳状。

3: 小心将上层水相移至另外一个离心管中, 再加入等体积异丙醇, 混匀。室温放置 5 - 10 分钟。中间层和红色下层置于 4C 保存, 以便接下去抽提基因组 DNA。

- 取上层水相时要特别小心, 绝对不要吸入白色中间层及红色下层。移取水相时要使用小体积移液器: 200ul 移液器, Tip 的尖嘴要贴在管壁, 并且尽可能接近液面, 慢慢松手吸出液体。

- 如果是尖底离心管, 可以用下面的方法获得更多干净的水相: 将移液器小心深入离心管底, 轻轻地将尽可能多的下层吸入。将离心管置于离心机中高速离心 5 分钟后, 再小心将水相吸出。

- 对于脂肪类组织, 包括脑组织, 在上清的最上层为脂肪, 取上清时不要吸入。必要时用等体积氯仿对上清再抽提一次。

- 如果是杂质含量高的样品, 强烈建议将此步操作改为: 在上清中加入一半体积的异丙醇, 混匀后, 再加入一半 (指上清) 体积的 RNA 沉淀试剂 (1.2M NaCl, 0.8M 柠檬酸钠)。再混匀后, 室温放置 5 - 10 分钟。

4: 4C 12,000 x g 离心 5 - 10 分钟。小心地彻底弃上清。

- 如果离心后看不见沉淀, 则置于 40C 放置 10 - 30 分钟后再离心。

- 改用 7,500 x g 离心 5 分钟能改善质量, 但会少量降低产量。室温离心对质量不会有任何影响, 相反, 对杂质含量高的样品, 室温离心更有利于降低杂质。

- 弃上清后, 将离心管置于离心机中离心数秒, 再用移液器将残留液体小心吸出。这是最彻底的去除上清的方法, 比倒掉上清后再将离心管倒扣在吸水纸上的方法可靠得多。如果是杂质含量高的样品, 强烈建议增加此步操作。如果肉眼看不见沉淀, 则不要用移液器吸。

5: 在离心管中按照 1 ml TRIzol 使用至少 1 ml 的比例加入室温的 75% 乙醇, 来回颠倒离心管混匀并将沉淀悬浮起来。室温 7,500 x g 离心 5 分钟。小心地彻底弃上清。

- 务必使沉淀悬浮起来, 以确保洗涤干净。如果沉淀比较大, 室温静置 5 分钟再离心。

- 改用洗涤两次, 对改善质量大有帮助, 尤其是当沉淀比较大时。

- 强烈建议最后一次洗涤弃上清后, 将离心管置于离心机中离心数秒, 再用移液器将残留液体小心吸出。既可缩短干燥时间, 还有助于改善质量。如果肉眼看不见沉淀, 则不要用移液器吸。

6: 室温静置 5 - 15 分钟使 RNA 沉淀恰好干燥。溶解后, -70C 保存。