

上海生物样本库
最佳实践规范及标准操作流程
文件汇编
（第二版）

2010 年 5 月

上海生物样本库					
质量管理体系文件					
文件名称	组织总 RNA 提取操作规程			编号	SOP-SC-055-01
批准人		批准日期		实施日期	

组织总 RNA 提取操作规程

1. 目的

规定从组织中提取总 RNA 实验应遵守的操作。

2. 适用范围

使用与从组织中提取总 RNA 的操作。

3. 定义和术语

3.1 RNA ribonucleic acid

由脱氧核糖核酸（DNA）为模板转录合成的核糖核酸的片断。

4. 职责

4.1 样本库实验技术员负责从组织中提取总RNA。

5. 设备和器材

见正文内容

6. 正文

6.1 准备

6.1.1 所需试剂：

0.1% DEPC 水、Trizol 裂解试剂、氯仿、异丙醇、无水乙醇、75%乙醇、TE 缓冲液。

6.1.2 防 RNA 酶污染

关于防 RNA 酶污染请参见《核酸提取和纯化控制程序》。

6.2 组织样本破碎和裂解

6.2.1 液氮研磨

组织块直接放入研钵中，加入少量液氮，迅速研磨，待组织变软，再加少量

液氮，再研磨，如此三次，按 50-100mg 组织/ml Trizol 加入 Trizol，转入离心管进行第 2 步操作。

注：组织或细胞量过少，可酌情减少 Trizol 用量；组织或细胞用量过多，会引起 DNA 对 RNA 的污染；高蛋白、脂肪或多糖类组织，肌肉组织或块状植物组织等，组织匀浆或液氮研磨后须 4℃ 12,000g 离心 10min 去掉不溶物，再进行下面操作，若顶层有脂肪物，则也须去掉

6.2.2 匀浆

组织样品按 50-100mg/ml Trizol 加入 Trizol。另外，组织体积不能超过 Trizol 体积的 10%，否则匀浆效果会不好，用电动匀浆器充分匀浆约需 1-2 分钟。

注：若没有液氮或电动匀浆器，可用手动匀浆器代替，此时组织块不宜过大，且需先用眼科剪刀将组织剪碎，然后再充分研磨。

6.3 总RNA 提取（一步法）

6.3.1 加 Trizol 后，室温放置 5min，使其充分裂解。

6.3.2 12,000rpm 离心 5min，弃沉淀。

6.3.3 按 200ul 氯仿/ml Trizol 加入氯仿，振荡混匀后室温放置 15min。

注：禁用漩涡振荡器，以免基因组 DNA 断裂。

6.3.4 4℃ 12,000g 离心 15min。

6.3.5 吸取上层水相，至另一离心管中。

注：千万不要吸取中间界面；若同时提取 DNA 和蛋白质，则保留下层酚相存于 4℃ 冰箱，若只提 RNA，则弃下层酚相。

6.3.6 按 0.5ml 异丙醇/ml Trizol 加入异丙醇混匀，室温放置 5-10min。

6.3.7 4℃ 12,000g 离心 10min，弃上清，RNA 沉于管底。

6.3.8 按 1ml 75%乙醇/ml Trizol 加入 75%乙醇，温和振荡离心管，悬浮沉淀。

6.3.9 4℃ 8,000g 离心 5min，尽量弃上清。

6.3.10 室温晾干或真空干燥 5-10min。注：RNA 样品不要过于干燥，否则很难溶解。

6.3.11 可用 50ul H₂O，TE buffer 或 0.5%SDS 溶解 RNA 样品，55-60℃，5-10min。

注：TE 或 0.5%SDS 均须用 DEPC 水配置。

7. 相关文件

《核酸提取和纯化控制程序》 SOP-SC-030-01

8. 参考标准与文献

《分子克隆实验指南》第三版，ISBN 7-03-010338-6

