

**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

<b>上海生物样本库</b>				
质量管理体系文件				
文件名称	细胞总 RNA 提取操作规程		编号	SOP-SC-056-01
批准人		批准日期	实施日期	

## 细胞总 RNA 提取操作规程

### 1. 目的

规定从细胞中提取总 RNA 实验应遵守的操作。

### 2. 适用范围

使用与从细胞中提取总 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 样本库实验技术人员负责从细胞中提取总 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 细胞裂解

6.2.1 贴壁细胞

不须消化, 可直接用 Trizol 进行消化、裂解, Trizol 体积按  $10\text{cm}^2/\text{ml}$  比例

加入。

#### 6.2.2 悬浮细胞

可直接收集、裂解，每 1ml Trizol 可裂解  $5 \times 10^6$  细胞。

### 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 H<sub>2</sub>O，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