

临床血液样本的处理和组织总RNA的提取

华丽



1.实验目的

- 掌握临床血液样本的预处理。
- 完整RNA的提取和纯化, 是进行RNA方面的研究工作如 **Nothern杂交、mRNA分离、RT-PCR、定量PCR、cDNA合成及体外翻译等的前提。**
- 掌握从组织中提取和纯化总RNA的方法。



2. 实验操作内容

- 临床血液样本的预处理
- 组织总RNA的提取、纯化和测定



3. 临床血液样本的处理步骤

- 接收临床血液样本，附样本信息单（包含流水号，姓名，身份证号）
- 核对临床血液样本流水号：每个研究对象采集2管抗凝血，血液量（4-5ml），记录血液样本量，分为缺失、1-3ml、4-6ml（3个级别），做好标记
- 按流水号顺序排列，离心，4°C，1200转/分，20分钟；血液分层为上层血浆，中间层白细胞和血小板，下层红细胞；每份血液分装为2管血浆（黄色管盖），1管白细胞（白色管盖），2管红细胞（红色管盖）



3. 临床血液样本的处理步骤

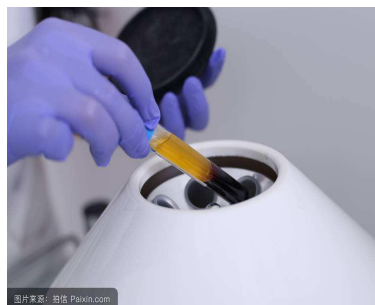
- 冻存管入盒，准备10份冻存盒（血浆1，血浆2，血浆3，血浆4，白细胞1，白细胞2，红细胞1，红细胞2，红细胞3，红细胞4），10管分别入盒，每盒存放81个样本（9行*9列），
- 冻存盒正面及正侧面分别做好记录（记录内容为：总编号，**年**月**日，****社区**样本第*管，流水号**——**，例如：1编号，2016年04月13日，天山社区血浆样本第1管，1-81号标本）
- 所有样本及时放入-80℃冰箱，原则上相同社区的样本存放在同一个冰箱，血液样本存放示意图，入库



4. 临床血液样本的处理步骤示意图



离心, 1200rpm/min, 20min



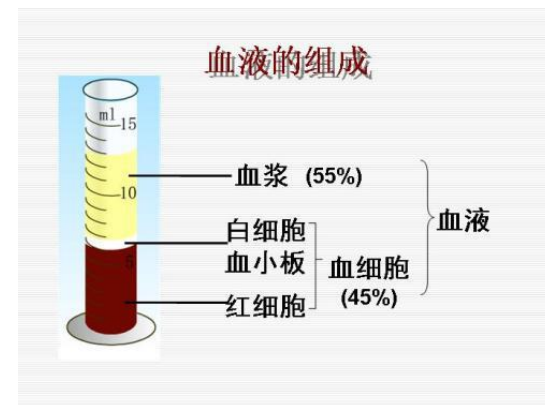
分层



入库



分装



5. 组织总RNA提取和纯化步骤

样品处理

- 用DEPC水浸泡过的剪刀剪取小鼠肺组织30mg左右（约半粒米大小），放入含有1ml Trizol试剂和磁珠的离心管中；
- 将EP管放进研磨机中进行研磨，按照90HZ的频率研磨1分钟，连续研磨7次，间隔时间为1分钟。
- 取出研磨好的离心管，放入离心机中按照3000rpm/min的速度离心1分钟，小心吸出上层匀浆到另一新的1.5ml离心管。



5.组织总RNA提取和纯化步骤

- 按0.2ml 氯仿/1ml Trizol加入氯仿（1:5）（本实验加200 μ l），剧烈振荡混匀后室温放置10min。（注意：此步振荡非常重要，建议在旋涡振荡器上进行振荡15ses，室温放置5min。）
- 4°C ， 12,000g离心15min。离心管中的样品分为三层：底层为黄色（红）有机相，上层为无色水相和一个中间层。RNA主要在水相中，水相体积约为所用Trizol试剂的60%。
- 吸取上层水相，至另一离心管（RNA free）中。一般300–350 μ l就足够了（一般300ul），宁少勿多！（注意：千万不要吸取中间界面）
- 加入等体积预冷的异丙醇（300ul），混匀，室温放置10min。



5.组织总RNA提取和纯化步骤

- 4°C 12,000g离心10min, 弃上清, 离心后在管侧和管底出现胶状沉淀。
- 按0.5ml 75%乙醇/1ml Trizol加入预冷的75%乙醇 (500ul) 洗涤RNA沉淀, (**切勿触及沉淀!**) 温和振荡离心管, 悬浮沉淀。
- 4°C 12,000g离心5min, 尽量弃上清 (**重复一次!**)。
- 室温晾干或真空干燥RNA沉淀5-10min, 尽可能使乙醇挥发。
(**注: RNA样品不要过于干燥, 否则很难溶解。**)
- 加入20μl无RNase的水, 充分震荡混匀。
- Nanodrop核酸测定仪测定核酸浓度



6. 操作步骤示意图

剪取30 mg肺组织，
加**1ml Trizol**

(1)

按90HZ的频率，每次1min，
共研磨7次，直至裂解液中
无明显沉淀

3000转, 1min

取匀浆 (2)

向裂解液中
加**200 μ l**氯仿

盖紧离心管盖，漩涡振荡**15s**

室温静置**10min** (3)

4°C, 12000g
离心**15min**

(4)

吸取上清液**300 μ l**
至另一新离心管中
(切忌吸出白色中间层)

(5)

向上清中加入**等体积**
预冷的异丙醇混匀

上下颠倒离心管充分混匀

室温静置**10min** (6)

4°C, 12000g 离心**10min**

小心弃去上清

(7)

缓慢沿离心管壁
加入**500 μ l** 75%乙醇

轻轻上下颠倒

洗涤离心管壁 (8)

4°C, 12000g 离心**5min**
小心尽量弃去乙醇

室温干燥沉淀**3-5min**

(9)

加入**20 μ l** RNase-free水
溶解沉淀备用



7. 试剂及其作用

➤ Trizol（异硫氰酸胍和苯酚）：

异硫氰酸胍：属于解偶剂，是一类强力的蛋白质变性剂，可溶解蛋白质，其主要作用是裂解细胞，使细胞中的蛋白/核酸物质解聚得到释放。

苯酚：虽可有效的变性蛋白质，但是它不能完全抑制RNA酶活性，因此Trizol中还加入了8-羟基喹啉、 β -巯基乙醇等来抑制内源和外源Rnase。



7. 试剂及其作用

- **氯仿**：蛋白变性剂，与水不互溶，与苯酚互溶，可以带走残余的苯酚。
- **预冷的异丙醇**：强的分子内脱水机，使RNA局部密度增加，从而使RNA从可溶状态变为固态不溶状态（其作用相当于甘油）
- **75%的乙醇**



7. 试剂及其作用

➤ 75%的乙醇（3个优点）：

1. 失去了无水乙醇的脱水作用；
2. 挥发性好（减轻水化层的形成，减少对RNA的“保护”，以免影响接下去RNA的功能）；
3. 利用有机溶剂相似相溶的原理达到洗涤RNA的目的。



8. 实验试剂及器材

- Trizol试剂
- 氯仿
- 预冷异丙醇
- 预冷75% 乙醇
- H₂O (DEPC Treated)
- 离心管及枪头 (1000ul、20-200ul)
- 离心机
- 漩涡振荡器、剪刀、镊子、小磁珠

