



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101532012 B

(45) 授权公告日 2011.03.16

(21) 申请号 200810101603.5

(22) 申请日 2008.03.10

(73) 专利权人 首都师范大学

地址 100037 北京市海淀区西三环北路 105
号首都师范大学生命科学学院

(72) 发明人 李乐攻

(74) 专利代理机构 北京法思腾知识产权代理有
限公司 11318

代理人 杨小蓉

(51) Int. Cl.

C12N 15/10 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 2007014138 A2, 2007.02.01, 全文.

WO 2006015326 A2, 2006.02.09, 全文.

WO 2007035750 A1, 2007.03.29, 全文.

审查员 徐莉

权利要求书 3 页 说明书 8 页

(54) 发明名称

一种快速抽提纯化 RNA 的试剂盒以及方法

(57) 摘要

本发明涉及分子生物学领域,尤其涉及一种快速抽提纯化 RNA 的试剂盒及方法。本发明的试剂盒包括:裂解液、前处理液、RNA 结合液、RNA 洗液 I 和 II、以及 RNA 过滤柱和结合柱。本发明的方法包括裂解、前处理、过滤、结合 RNA、清洗提纯和洗脱等步骤。本发明摒弃了以往经典的酸性酚法及大公司的 Trizol 法,创造了一种全新的 RNA 抽提纯化方法,它使抽提纯化的时间大大缩短,只需 10 分钟,即可从各种材料中提纯可用于下游各种实验的高纯度 RNA,如:cDNA 的转录、Northern blot、RNAi 等。

1. 一种快速 RNA 抽提纯化试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括以下组分:

1) 样品裂解液,

所述裂解液针对含多糖的材料的配方为:

4. 0-6M GuCl

20-80mM MES-NaOH, pH 5.2-6.5

10-50mM 柠檬酸钠

0.1-0.6% TritonX-100

0.5-2% N-月桂酰肌氨酸

5-20ul/ml β -巯基乙醇

所述裂解液针对其它材料的配方为:

3. 5-5.5M GuSCN

20-80mM MES-NaOH, pH5.2-6.3

10-50mM 柠檬酸钠

0.1-0.6% TritonX-100

0.5-2% N-月桂酰肌氨酸

5-20ul/ml β -巯基乙醇;

2) RNA 结合柱前处理溶液,其配方为:

3. 5-4.5M LiCl

0.005-0.02M HCl

0.05-0.3% TritonX-100;

3) RNA 结合溶液,其配方为:

a) 200-500mM MES pH4.5-5.5

b) 90-100%乙醇,且 a : b = 1 : 96;

4) RNA 洗液 I,其配方为:

50-200mM MES-NaOH, pH5 ~ 6,

3. 5-4.5M GuSCN

0.1-1% TritonX-100

15-30%乙醇;

5) RNA 洗液 II,

对于植物材料所述洗液 II 的配方为:

70-85%乙醇

0.5-1.5%丙酮

0.005-0.05% DEPC,

对于其它材料所述洗液 II 的配方为:

70-85%乙醇和 0.005-0.05% DEPC;

6) Rnase-free H₂O;

7) RNA 过滤柱;以及

8) RNA 结合柱,所述 RNA 结合柱的材料为二氧化硅纤维膜。

2. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述 RNA 过滤柱的过滤介质为 0.5-2 微

米孔径的氧化铝滤片。

3. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述 RNA 结合柱由孔径为 0.3-0.8 微米的酸化玻璃纤维材料制成。

4. 一种快速抽提纯化 RNA 的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

1) 裂解样品,将样品研磨,并加入样品裂解液进行裂解,

所述裂解液针对含多糖的材料的配方为:

4.0-6M GuCl

20-80mM MES-NaOH, pH 5.2-6.5

10-50mM 柠檬酸钠

0.1-0.6% TritonX-100

0.5-2% N-月桂酰肌氨酸

5-20ul/ml β -巯基乙醇

所述裂解液针对其它材料的配方为:

3.5-5.5M GuSCN

20-80mM MES-NaOH, pH5.2-6.3

10-50mM 柠檬酸钠

0.1-0.6% TritonX-100

0.5-2% N-月桂酰肌氨酸

5-20ul/ml β -巯基乙醇

2) 前处理,将 200 μ L RNA 结合柱前处理液注入 RNA 结合柱中,然后离心去除溶液,所述 RNA 结合柱前处理溶液的配方为:

35-4.5M LiCl

0.005-0.02M HCl

0.05-0.3% TritonX-100;

3) 过滤,将裂解样品用过滤柱过滤,在滤液中加入 0.5 倍体积的 RNA 结合溶液并混匀,所述 RNA 结合液的配方为:

a) 200-500mM MES pH4.5-5.5

b) 90-100%乙醇,且 a : b = 1-5 : 95-99;

4) 结合 RNA,将步骤 3) 获得的溶液加入到 RNA 结合柱上,并离心去除溶液;

5) 清洗提纯 RNA,加 500 μ L RNA 洗液 I 于 RNA 结合柱中,并离心去除溶液,然后再加 750 μ L RNA 洗液 II 于 RNA 结合柱中,并离心去除溶液,

所述 RNA 洗液 I 的配方为:

50-200mM MES-NaOH, pH5 ~ 6,

3.5-4.5M GuSCN

0.1-1% TritonX-100

15-30%乙醇,

对于植物材料所述洗液 II 的配方为:

70-85%乙醇

0.5-1.5%丙酮

0.005-0.05% DEPC,

对于其它材料所述洗液 II 的配方为:

70-85%乙醇和 0.005-0.05% DEPC;

6) 洗脱 RNA, 向经步骤 5) 处理的 RNA 结合柱中加入 Rnase-free 的 H₂O, 静止, 并离心收集溶液, 得到高纯度的 RNA,

其中, 所述 RNA 结合柱的材料为二氧化硅纤维膜。

5. 根据权利要求 4 所述的方法, 其特征在于, 所述 RNA 过滤柱的过滤介质为 0.5-2 微米孔径的氧化铝滤片。

6. 根据权利要求 4 所述的方法, 其特征在于, 所述 RNA 结合柱由孔径为 0.3-0.8 微米的酸化玻璃纤维材料制成。

一种快速抽提纯化 RNA 的试剂盒以及方法

技术领域

[0001] 本发明涉及分子生物学领域,尤其涉及一种快速抽提纯化 RNA 的试剂盒及方法。

背景技术

[0002] RNA 是遗传的基本物质之一,也是蛋白合成的模板,分离高纯度的 RNA 是现代分子生物学研究(包括临床医学诊断等)和分子治疗(如:RNAi 治疗)的必要技术手段,也是不可逾越的试验过程。RNA 具有易降解,难纯化的特点。它极易被无处不在 RNase 降解,也很容易在抽提过程中被 DNA 和蛋白污染;传统的方法,如:AGPC 法或酸性酚法、氯化铯密度梯度离心法等以及现在常用的 Trizol 法,必须用到毒性极强的酚和氯仿等,对环境和试验人员易造成危害。并且操作过程复杂、操作时间长,这样都容易导致提纯的 RNA 被污染降解,并且这些方法对操作环境的要求都十分的苛刻,为了保证 RNA 不被污染,在提取之前,需要做大量的配液、处理环境及耗材的工作,费时又费力,增加的提取成本,且不利于大规模操作,限制了大规模临床检测应用及分子和基因组学的发展。

发明内容

[0003] 因此,为了解决上述问题,本发明的发明人提出并完成了本发明。

[0004] 本发明的目的为提供一种快速抽提纯化 RNA 的试剂盒。

[0005] 本发明的另一目的为提供一种快速抽提纯化 RNA 的方法。

[0006] 根据本发明的快速抽提纯化 RNA 的试剂盒包括:

[0007] 1) 样品裂解液,

[0008] 所述裂解液针对含多糖的材料的配方为:

[0009] 4. 0-6M GuCl

[0010] 20-80mM MES-NaOH, pH 5. 2-6. 5

[0011] 10-50mM 柠檬酸钠

[0012] 0. 1-0. 6% TritonX-100

[0013] 0. 5-2% N- 月桂酰肌氨酸

[0014] 5-20ul/ml β - 巯基乙醇

[0015] 所述裂解液针对其它材料的配方为:

[0016] 3. 5-5. 5M GuSCN

[0017] 20-80mM MES-NaOH, pH5. 2-6. 3

[0018] 10-50mM 柠檬酸钠

[0019] 0. 1-0. 6% TritonX-100

[0020] 0. 5-2% N- 月桂酰肌氨酸

[0021] 5-20ul/ml β - 巯基乙醇;

[0022] 2) RNA 结合柱前处理溶液,其配方为:

[0023] 3. 5-4. 5M LiCl

- [0024] 0.005-0.02M HCl
- [0025] 0.05-0.3% TritonX-100 ;
- [0026] 3)RNA 结合溶液,其配方为 ;
- [0027] a)200-500mM MES pH4.5-5.5
- [0028] b)90-100%乙醇,且 a : b = 1-5 : 95-99 ;
- [0029] 4)RNA 洗液 I,其配方为 :
- [0030] 50-200mM MES-NaOH, pH5 ~ 6,
- [0031] 3.5-4.5M GuSCN
- [0032] 0.1-1% TritonX-100
- [0033] 15-30%乙醇 ;
- [0034] 5)RNA 洗液 II,
- [0035] 对于植物材料所述洗液 II 的配方为 :
- [0036] 70-85%乙醇
- [0037] 0.5-1.5%丙酮
- [0038] 0.005-0.05% DEPC,
- [0039] 对于其它材料所述洗液 II 的配方为 :
- [0040] 70-85%乙醇和 0.005-0.05% DEPC ;
- [0041] 6)Rnase-free H₂O ;
- [0042] 7)RNA 过滤柱。
- [0043] 8)RNA 结合柱。
- [0044] 根据本发明的试剂盒,所述 RNA 结合柱的材料为二氧化硅纤维膜。
- [0045] 根据本发明的试剂盒,所述 RNA 过滤柱的过滤介质为 1 μ M 孔径的氧化铝滤片。
- [0046] 根据本发明的试剂盒,所述 RNA 结合柱由孔径为 0.5 μ M 的酸化玻璃纤维材料制成。
- [0047] 根据本发明的快速抽提纯化 RNA 的方法包括以下步骤 :
- [0048] 1) 裂解样品,将样品研磨,并加入样品裂解液进行裂解,
- [0049] 所述裂解液针对含多糖的材料的配方为 :
- [0050] 4.0-6M GuCl
- [0051] 20-80mM MES-NaOH, pH 5.2-6.5
- [0052] 10-50mM 柠檬酸钠
- [0053] 0.1-0.6% TritonX-100
- [0054] 0.5-2% N-月桂酰肌氨酸
- [0055] 5-20ul/ml β - 巯基乙醇
- [0056] 所述裂解液针对其它材料的配方为 :
- [0057] 3.5-5.5M GuSCN
- [0058] 20-80mM MES-NaOH, pH5.2-6.3
- [0059] 10-50mM 柠檬酸钠
- [0060] 0.1-0.6% TritonX-100
- [0061] 0.5-2% N-月桂酰肌氨酸

- [0062] 5-20 μ l/ml β -巯基乙醇；
- [0063] 2) 前处理, 将 200 μ LRNA 结合柱前处理液注入 RNA 结合柱中, 然后离心去除溶液,
- [0064] 所述 RNA 结合柱前处理溶液的配方为：
- [0065] 35-4.5M LiCl
- [0066] 0.005-0.02M HCl
- [0067] 0.05-0.3% TritonX-100；
- [0068] 3) 过滤, 将裂解样品用过滤柱过滤, 在滤液中加入 0.5 倍体积的 RNA 结合溶液并混匀,
- [0069] 所述 RNA 结合液的配方为：
- [0070] a) 200-500mM MES pH4.5-5.5
- [0071] b) 90-100% 乙醇, 且 a : b = 1-5 : 95-99；
- [0072] 4) 结合 RNA, 将步骤 3) 获得的溶液加入到 RNA 结合柱上, 并离心去除溶液；
- [0073] 5) 清洗提纯 RNA, 加 500 μ LRNA 洗液 I 于 RNA 结合柱中, 并离心去除溶液, 然后再加 750 μ LRNA 洗液 II 于 RNA 结合柱中, 并离心去除溶液,
- [0074] 所述 RNA 洗液 I 的配方为：
- [0075] 50-200mM MES-NaOH, pH5 ~ 6,
- [0076] 3.5-4.5M GuSCN
- [0077] 0.1-1% TritonX-100
- [0078] 15-30% 乙醇,
- [0079] 对于植物材料所述洗液 II 的配方为：
- [0080] 70-85% 乙醇
- [0081] 0.5-1.5% 丙酮
- [0082] 0.005-0.05% DEPC,
- [0083] 对于其它材料所述洗液 II 的配方为：
- [0084] 70-85% 乙醇和 0.005-0.05% DEPC；
- [0085] 6) 洗脱 RNA, 向经步骤 5) 处理的 RNA 结合柱中加入 Rnase-free 的 H₂O, 静止, 并离心收集溶液, 得到高纯度的 RNA。
- [0086] 根据本发明的方法, 所述 RNA 过滤柱的过滤介质为 1 μ M 孔径的氧化铝滤片。
- [0087] 根据本发明的方法, 所述 RNA 结合柱由孔径为 0.5 μ M 的酸化玻璃纤维材料制成。
- [0088] 本发明摒弃了以往经典的酸性酚法及大公司的 Trizol 法, 创造了一种全新的 RNA 抽提纯化方法, 它使抽提纯化的时间大大缩短, 只需 10 分钟, 即可从各种材料中提纯可用于下游各种实验的高纯度 RNA, 如 : cDNA 的转录、Northern blot、RNAi 等。
- [0089] 综上, 本发明具有以下优点：
- [0090] 1、摒弃以往商用“Trizol”法、氯化铯密度梯度离心法和酸性酚法所用的酚抽提步骤, 采用温和变性剂裂解法, 辅助氧化铝剪切, 不使用任何对环境造成污染的药品。
- [0091] 2、不离心沉淀收集收集样品, 直接裂解, 一步过滤, 一步结合, 两步特异清洗纯化。
- [0092] 3、采用特殊的全新溶液配方前处理二氧化硅纤维膜, 使蛋白、DNA 等杂质更易清除, 而且 RNA 更易结合。
- [0093] 4、大大缩短抽分离提纯时间, 10 分钟即可完成。

[0094] 5、此法为 RNA 抽提的自动化和规模化奠定了技术基础。

具体实施方式

[0095] 实施例使用本发明的试剂盒快速抽提纯化烟草叶的总 RNA

[0096] 一、配制溶液

[0097] 配制以下溶液：

[0098] 1) 样品裂解液，

[0099] 针对含多糖的材料的裂解液：

[0100] 5M GuCl

[0101] 50mM Mes-NaOH, pH 6.3

[0102] 20mM 柠檬酸钠

[0103] 0.5% TritonX-100

[0104] 1% N-月桂酰肌氨酸

[0105] 10ul/ml β -巯基乙醇

[0106] 针对其它材料的裂解液：

[0107] 4.25M GuSCN

[0108] 50mM MES-NaOH, pH 6.3

[0109] 20mM 柠檬酸钠

[0110] 0.5% TritonX-100

[0111] 0.5% N-月桂酰肌氨酸

[0112] 10ul/ml β -巯基乙醇；

[0113] 2) RNA 结合柱前处理溶液：

[0114] 4M LiCl

[0115] 0.01M HCl

[0116] 0.1% TritonX-100；

[0117] 3) RNA 结合溶液,其配方为；

[0118] a) 500mM MES pH5.0

[0119] b) 100%乙醇,且 a : b = 1 : 96；

[0120] 4) RNA 洗液 I：

[0121] 100mM MES-NaOH, pH5 ~ 6,

[0122] 4M GuSCN

[0123] 0.7% TritonX-100

[0124] 20%乙醇；

[0125] 5) RNA 洗液 II,

[0126] 对于植物材料的洗液 II：

[0127] 78%乙醇

[0128] 1%丙酮

[0129] 0.01% DEPC,

[0130] 对于其它材料的洗液 II 为：

- [0131] 78%乙醇和 0.01% DEPC ;
- [0132] 6)Rnase-free H₂O ;
- [0133] 二、提取烟草的总 RNA
- [0134] 1、裂解样品
- [0135] 取样品 (约为 50mg) 放入液氮轮动磨碎, 加入裂解液 450 μ l, 剧烈震荡, 温育 60℃, 静置 2 分钟。
- [0136] 2、同时前处理 DNA 结合柱 : 将 200 μ L DNA 前处理溶液加入柱中, 11000rpm 离心 10 秒, 弃除溶液。
- [0137] 3、过滤
- [0138] 将裂解样品用 RNA 过滤柱过滤 (剪切基因组 DNA), 滤液中加入 0.5 倍体积的结合溶液, 混匀。
- [0139] 4、特异结合 RNA
- [0140] 将以上得到的所有样品上样到 RNA 结合柱上, 11,000rpm (8200×g) 离心 20 秒, 弃除溶液。
- [0141] 5、清洗提纯 RNA
- [0142] 加 500 μ l 洗液 I 于 RNA 结合柱, 11,000rpm (8200×g) 离心 20 秒, 弃除溶液。再加 750 μ l 洗液 II, 11,000rpm (8200×g) 离心 10 秒, 弃除溶液, 再离心 1 分钟。
- [0143] 6、洗脱高纯度 RNA
- [0144] 将已结合 RNA 的干燥柱, 加入 RNase-free 的 H₂O, 静置 1 分钟, 11,000rpm (8200×g) 离心 1 分钟, 收集溶液, 得高纯度 RNA 约为 50 μ L (0.4 μ g/μ L)。
- [0145] 实施例二提取酵母细胞的总 RNA
- [0146] 以与实施例一相同的方法, 提取酵母细胞的总 RNA。
- [0147] 实施例三使用本发明的试剂盒快速抽提纯化烟草叶的总 RNA
- [0148] 一、配制溶液
- [0149] 配制以下溶液 :
- [0150] 1) 样品裂解液,
- [0151] 针对含多糖的材料的裂解液 :
- [0152] 4.0M GuCl
- [0153] 20mM Mes-NaOH, pH 6.3
- [0154] 10mM 柠檬酸钠
- [0155] 0.1% TritonX-100
- [0156] 0.5% N-月桂酰肌氨酸
- [0157] 5ul/ml β-巯基乙醇
- [0158] 针对其它材料的裂解液 :
- [0159] 3.5M GuSCN
- [0160] 20mM MES-NaOH, pH 5.2
- [0161] 10mM 柠檬酸钠
- [0162] 0.1% TritonX-100
- [0163] 0.5% N-月桂酰肌氨酸

- [0164] 5 μ l/ml β -巯基乙醇；
- [0165] 2)RNA 结合柱前处理溶液：
- [0166] 3.5M LiCl
- [0167] 0.005M HCl
- [0168] 0.05% TritonX-100；
- [0169] 3)RNA 结合溶液,其配方为：
- [0170] a)200mM MES pH5.0
- [0171] b)90%乙醇,且 a : b = 1 : 96；
- [0172] 4)RNA 洗液 I：
- [0173] 50mM MES-NaOH, pH5 ~ 6,
- [0174] 3.5M GuSCN
- [0175] 0.1% TritonX-100
- [0176] 15%乙醇；
- [0177] 5)RNA 洗液 II,
- [0178] 对于植物材料的洗液 II：
- [0179] 70%乙醇
- [0180] 0.5%丙酮
- [0181] 0.005% DEPC,
- [0182] 对于其它材料的洗液 II 为：
- [0183] 70%乙醇和 0.005% DEPC；
- [0184] 6)Rnase-free H₂O；
- [0185] 二、提取烟草的总 RNA
- [0186] 1、裂解样品
- [0187] 取样品(约为 50mg)放入液氮轮动磨碎,加入裂解液 450 μ l,剧烈震荡,温育 60 $^{\circ}$ C,静置 2 分钟。
- [0188] 2、同时前处理 DNA 结合柱:将 200 μ l DNA 前处理溶液加入柱中,11000rpm 离心 10 秒,弃除溶液。
- [0189] 3、过滤
- [0190] 将裂解样品用 RNA 过滤柱过滤(剪切基因组 DNA),滤液中加入 0.5 倍体积的结合溶液,混匀。
- [0191] 4、特异结合 RNA
- [0192] 将以上得到的所有样品上样到 RNA 结合柱上,11,000rpm(8200 \times g)离心 20 秒,弃除溶液。
- [0193] 5、清洗提纯 RNA
- [0194] 加 500 μ l 洗液 I 于 RNA 结合柱,11,000rpm(8200 \times g)离心 20 秒,弃除溶液。再加 750 μ l 洗液 II,11,000rpm(8200 \times g)离心 10 秒,弃除溶液,再离心 1 分钟。
- [0195] 6、洗脱高纯度 RNA
- [0196] 将已结合 RNA 的干燥柱,加入 RNase-free 的 H₂O,静置 1 分钟,11,000rpm(8200 \times g)离心 1 分钟,收集溶液,得高纯度 RNA 约为 50 μ l(0.4 μ g/ μ l)。

- [0197] 实施例四使用本发明的试剂盒快速抽提纯化烟草叶的总 RNA
- [0198] 一、配制溶液
- [0199] 配制以下溶液：
- [0200] 1) 样品裂解液，
- [0201] 针对含多糖的材料的裂解液：
- [0202] 6M GuCl
- [0203] 80mM Mes-NaOH, pH 6.3
- [0204] 50mM 柠檬酸钠
- [0205] 0.6% TritonX-100
- [0206] 2% N-月桂酰肌氨酸
- [0207] 20ul/ml β -巯基乙醇
- [0208] 针对其它材料的裂解液：
- [0209] 5.5M GuSCN
- [0210] 80mM MES-NaOH, pH 6.3
- [0211] 50mM 柠檬酸钠
- [0212] 0.6% TritonX-100
- [0213] 2% N-月桂酰肌氨酸
- [0214] 20ul/ml β -巯基乙醇；
- [0215] 2) RNA 结合柱前处理溶液：
- [0216] 4.5M LiCl
- [0217] 0.02M HCl
- [0218] 0.3% TritonX-100；
- [0219] 3) RNA 结合溶液, 其配方为：
- [0220] a) 500mM MES pH5.5
- [0221] b) 100%乙醇, 且 a : b = 1 : 96；
- [0222] 4) RNA 洗液 I：
- [0223] 200mM MES-NaOH, pH5 ~ 6,
- [0224] 4.5M GuSCN
- [0225] 1% TritonX-100
- [0226] 30%乙醇；
- [0227] 5) RNA 洗液 II,
- [0228] 对于植物材料的洗液 II：
- [0229] 85%乙醇
- [0230] 1.5%丙酮
- [0231] 0.05% DEPC,
- [0232] 对于其它材料的洗液 II 为：
- [0233] 85%乙醇和 0.05% DEPC；
- [0234] 6) Rnase-free H₂O；
- [0235] 二、提取烟草的总 RNA

[0236] 1、裂解样品

[0237] 取样品（约为 50mg）放入液氮轮动磨碎，加入裂解液 450 μ l，剧烈震荡，温育 60 $^{\circ}$ C，静置 2 分钟。

[0238] 2、同时前处理 DNA 结合柱：将 200 μ L DNA 前处理溶液加入柱中，11000rpm 离心 10 秒，弃除溶液。

[0239] 3、过滤

[0240] 将裂解样品用 RNA 过滤柱过滤（剪切基因组 DNA），滤液中加入 0.5 倍体积的结合溶液，混匀。

[0241] 4、特异结合 RNA

[0242] 将以上得到的所有样品上样到 RNA 结合柱上，11,000rpm (8200 \times g) 离心 20 秒，弃除溶液。

[0243] 5、清洗提纯 RNA

[0244] 加 500 μ l 洗液 I 于 RNA 结合柱，11,000rpm (8200 \times g) 离心 20 秒，弃除溶液。再加 750 μ l 洗液 II，11,000rpm (8200 \times g) 离心 10 秒，弃除溶液，再离心 1 分钟。

[0245] 6、洗脱高纯度 RNA

[0246] 将已结合 RNA 的干燥柱，加入 RNase-free 的 H₂O，静置 1 分钟，11,000rpm (8200 \times g) 离心 1 分钟，收集溶液，得高纯度 RNA 约为 50 μ L (0.4 μ g/ μ L)。