

## (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国 际 局



(43) 国际公布日  
2012 年 11 月 22 日 (22.11.2012) WIPO | PCT



(10) 国际公布号

WO 2012/155577 A1

(51) 国际专利分类号:

C12N 15/10 (2006.01)

(21) 国际申请号:

PCT/CN2012/071598

(22) 国际申请日:

2012 年 2 月 24 日 (24.02.2012)

(25) 申请语言:

中文

(26) 公布语言:

中文

(30) 优先权:

201110129253.5 2011 年 5 月 18 日 (18.05.2011) CN

(72) 发明人; 及

(71) 申请人: 杨湘龙 (YANG, Xianglong) [CN/CN]; 中国天津市南开区华苑小区天华里 28-5-202, Tianjin 300384 (CN)。

(72) 发明人; 及

(75) 发明人/申请人 (仅对美国): 李学敬 (LI, Xuejing) [CN/CN]; 中国天津市南开区华苑小区天华里 28-5-202, Tianjin 300384 (CN)。

(74) 代理人: 天津市北洋有限责任专利代理事务所 (BEI & OCEAN); 中国天津市南开区鞍山西道时代公寓 A 座 603, Tianjin 300193 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,

BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

### 根据细则 4.17 的声明:

- 关于申请人有权申请并被授予专利(细则 4.17(ii))
- 关于申请人有权要求在先申请的优先权(细则 4.17(iii))

### 本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

(54) Title: METHOD FOR SEPARATING AND PURIFYING RNA FROM BIOMATERIAL

(54) 发明名称: 从生物材料中分离纯化 RNA 的方法

(57) Abstract: Provided is a method for separating and purifying RNA from a biomaterial, comprising: (1) mixing an organic tissue with formamide and an univalent cationic salt solution for homogenization to give a dehydrated biosample; (2) mixing the dehydrated biosample with the univalent cationic salt solution for incubation; (3) adding the precipitate, univalent cationic salt solution for homogenization and centrifugation, with a supernatant being poured into another centrifuge tube; (4) adding isopropanol for homogenization and centrifugation, and discarding an upper liquid, a lower liquid and a residual impurity between them, to give a white RNA precipitate. The method according to the present invention enables efficient isolation of the protein from RNA in the biosample, thus avoiding the decomposition effect of the residual protein in the product on the product RNA; the reagents used in the present invention are the low toxic compounds with little damage to environment and human body; and the method is easy to operate without special skill, with simple apparatus at low cost, to give the RNA at high yield and purity.

### (57) 摘要:

提供了一种从生物材料中分离纯化 RNA 的方法, 包括: (1) 将组织器官和甲酰胺、单价阳离子盐水溶液混合, 匀浆, 得到脱水生物样品; (2) 将脱水生物样品与单价阳离子盐水溶液混合, 孵育; (3) 加入起沉淀作用的单价阳离子盐水溶液, 混匀, 离心, 将上清液倒入另一离心管中; (4) 加入异丙醇, 混匀, 离心, 倒掉上相液体、下相液体及介于两相间的残余杂质, 得到白色 RNA 沉淀。本发明的方法能高效剥离生物样品中 RNA 上蛋白质, 避免产品中残存的蛋白质对产物 RNA 的分解作用; 本发明所用试剂为低毒化合物, 对环境和人体的危害小; 且操作简便、操作人员不需专业的技术便可操作, 设备简单、成本低廉, 所得到的 RNA 得率和纯度都极高。

WO 2012/155577 A1

## 从生物材料中分离纯化 RNA 的方法

### 技术领域

本发明涉及一种 RNA 的纯化分离方法。

5

### 背景技术

核酸，包括脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA)，可在所有活性细胞中存在。DNA 是细胞的遗传物质，其上的基因可被转录为信使 RNA (mRNA)，而后者所携带的对应遗传信息又会被翻译为具有功能活性的蛋白。除了 mRNA，还有其它的 RNA：转移 RNA

10 (tRNA)，核糖体 RNA (rRNA)，干扰 RNA(iRNA)，微小 RNA(miRNA)和不均一 RNA (hnRNA)。通过检测组织或者细胞中的 mRNA，iRNA 和 miRNA 来分析基因的表达与调控是生命科学领域中极其重要的手段，并为细胞提供了极大的生理指标。检测 mRNA，iRNA 和 miRNA 水平的技术多种多样，包括：聚合酶链反应 (PCR)、定量聚合酶链反应 (qPCR)、实时 PCR (Real-Time PCR)、Northern Blotting, 生物芯片和转录子组测序等。

15 在所有这些技术中，必须使用所分离的 RNA 样品，并且该 RNA 样品不应含有下列在活性细胞中所存在的污染物：基因组 DNA，蛋白，脂肪，酚类物质，多糖和其它某些生物分子。  
[Wyatt, J. R, and Tinoco, I.J.(1993) RNA structure and RNA function, in The RNA World(Gesteland, R.F and Atkins, J. F., eds.), Cold Spring Harboore Laboratory Press, Cold Sring Harbor, NY,pp.465-496.]

20 从生物材料中分离 RNA，必须使 RNA 与 DNA 及构成生物标本的其它成分分离。纯化 RNA 的关键是：1、操作过程中必须使包括核酸酶(RNases)在内的具有核酸酶活性的所有酶失活，防止这些酶对 RNA 的分解作用。2、将天然 RNA 上附着蛋白完全剥离开，释放裸露 RNA 到溶液中；这样既可防止 RNA 随着附着蛋白而一起当成杂质被去掉，用以提高提取 RNA 的得率，同时又能防止得到的 RNA 样品中因残存痕量蛋白而导致的 RNA 分解，以提高所分离 RNA 的质量和纯度。3、所得到的 RNA 样品中不能含有任何残余的微量蛋白，因为这些微量蛋白中常常含有具有 RNases 活性的酶，会导致 RNA 分解。

25 在细胞中除了核酸酶之外，还有许多酶具有 RNase 活性，如真核和原核细胞中都存在具有 RNase 活性的多种 DNA 聚合酶，转录酶，逆转录酶等。所以在提取 RNA 之前，彻底抑制包括 RNases 在内的所有酶的活性，才是防止 RNA 分解的关键所在。因此，在得到的 RNA 样品中，也不能有痕量的蛋白存在，因为痕量蛋白中完全可能存在某些具有 RNase 活性的酶，导致得到的 RNA 很快被分解。

许多科学家发明和阐述了各种分离 RNA 的方法。这些方法大多数依赖于氯化铯密度梯度离心或者苯酚、氯仿抽提，其缺点是耗时、使用有害试剂对环境和人体造成危害、样品被外源性核酸和蛋白污染。  
[U.S. Pat. Nos. 5,075,430; 5,234,809; 5,155,018; 6,277,648;  
35 6,875,857; 6,958,392; 6,953,686; 6,310,199; 6,992,182; 6,475,388; 5,075,430; 7,074,916;  
U.S. Patent Publication No. 20060024701; European Patent No. EP0765335; Boom et al. 1990, J.

Clinical Microbiology 28:495; Cox, R. A. (1968) The use of guanidinium chloride in the isolation of nucleic acids Methods Enzymol 12, Part B, 120-129; Chirgwin, J, M., Przybyka, A. E., Mac Donald, R.J., Rutter, W. J. (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. Biochemistry 18(24), 5294-5299]

5 在早期的 RNA 提取中，使用苯酚和氯仿进行蛋白抽提[Kirby, K. S. (1968)Isolation of nucleic acids with phenolic solutions, Methods Enzymol 12, part B, 87-99.]；该方法中，有相当一部分没有完全剥离掉蛋白的 RNA 分子，会连着去掉的蛋白而被当成杂质去掉；而在所得到 RNA 样品中还有一部分 RNA 还附着少量的蛋白，因此需要反复的苯酚和氯仿抽提去掉残存的蛋白。这就导致了所提取的 RNA 的得率极低、整个 RNA 提取过程繁杂冗长、  
10 而且不能完全去除的痕量蛋白常常导致所提取的 RNA 被分解。[ Ingle, J. and Burns, R.G.(1968) The loss of ribosomal ribonucleic acid during the preparation of nucleic acid from certain plant tissues by the detergent-pjenol method, Biochem J.110,605,606]

15 为了克服苯酚和氯仿抽提法所提取 RNA 的诸多缺陷，有人使用氯化铯梯度离心法，只选择性沉淀 RNA，可以获得极高纯度的核酸，是一种代替苯酚、氯仿抽提的方法，但该方法需要极其昂贵的设备，严格的操作训练和繁杂的操作过程，没有在普通实验室应用的可能，更不具备推广价值。[Glisin, V., Crkvenjakov, R., and Byus, C (1974) Ribonucleic anid isolated by cesium chloride centrifugation. Biochemistry 13, 2633-2637. ]

目前应用最多的 Chomczynski, P. 的美国专利 United States Patent 5,945,515 和论文公开的技术。[Chomczynski, P. and Sacchi, N,(1987) Single-step method of RNA siolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. Biocemistry 18, 5294-5299; and Sacchi, N,(1987) Single-step method of RNA siolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction Anal Bilchem 162(1), 156-159. ]

25 Chomczynski, P. 在其专利中公开了同时分离 RNA、DNA 和蛋白的一种溶液。该溶液含有硫氰酸胍、40~60%的苯酚，作为苯酚稳定剂的甘油，和保持溶液 pH 值为 4 的缓冲液。该溶液是一种均一混合物（即单相液），通过加入 10%的氯仿，可将其进行有效的分相，导致 RNA 分配到水相，而蛋白和 DNA 则集中在有机相和两相之间。加入等体积的异丙醇到水相，可进行 RNA 的沉淀。通过离心而得到的 RNA 沉淀，可用 70%乙醇洗涤，并晾干。

30 该方法的优点是与以往的技术相比，其操作时间大大缩短为不到 1 小时，操作强度也大大降低。产品的纯度高，效率高。但该方法仍然存在下列的许多问题，只能用于实验室，而不能广泛推广使用：

需要昂贵的实验室条件，如高速冷冻离心机，液氮，低温冰箱，通风橱等。

需要熟练的技术人员，即使用该方法，需要培训专门人员和实验工作经验。

35 所用耗材，如离心管、微量加样器吸头、玻璃器皿和试剂，都需要 DEPC 水处理，或者高温、长时间烘烤，以去掉顽固性 RNases 对 RNA 的分解作用。这是需要大量时间和精力的。

不仅使用高毒化合物苯酚和氯仿，而且使用剧毒的高浓度（2~5M）胍盐溶液，对健康

极其有害---硫氰酸胍和盐酸胍被 CHIP(英联邦化学制剂危害信息与包裹)定为有害品，也被 HCS (美国危险交通设备标准) 认为是有毒试剂。

E. 虽然高浓度胍盐和苯酚、氯仿联合剥离 RNA 上的蛋白之效果极大提高，但仍不能完全剥离 RNA 上的蛋白-----这常常导致一些生物材料所提取 RNA 之得率的降低，并且由于得到的 RNA 样品中残存微量的蛋白，这些微量蛋白中的 Rnases 会导致所提取 RNA 的分解。

F. 还有，对于不溶于胍盐的组织，特别是植物的大多数组织，使用高浓度胍盐的方法是不会产生任何 RNA。

## 10 发明内容

本发明的目的是克服现有技术中的不足，提供一种安全、简易、快速和高效的、并适用于普通实验室应用和工业化生产的从生物材料中分离纯化 RNA 的方法。

本发明的技术方案概述如下：

从生物材料中分离纯化 RNA 的方法，包括如下步骤：

15 (1) 用下述两种方法之一种制备脱水生物样品：

方法一：将组织器官加入到体积比为 1000: 0-1000 的甲酰胺与 3M-13.5M 单价阳离子盐水溶液的混合液中，在 0~25℃ 匀浆 5s~20min，得到脱水生物样品；所述组织器官和所述混合液的比例为 0.5~200mg: 1ml，所述组织器官为动物、植物或真菌的组织器官；

方法二：将单细胞沉淀中加入到体积比为 1000: 0-1000 的甲酰胺与 3M-13.5M 单价阳离子盐水溶液的混合液中，在 0~25℃ 悬浮或在 0~37℃ 匀浆 20s~20min，得到脱水生物样品；所述单细胞沉淀来自革兰氏阳性菌培养细胞、革兰氏阴性菌培养细胞、真菌培养细胞、动物培养细胞、植物培养细胞、血液细胞或精液细胞；

20 (2) 按体积比为 200: 0~200，将所述脱水生物样品与 3M-13.5M 单价阳离子盐水溶液混合或按体积比为 160: 50: 40 将所述脱水生物样品、3M-13.5M 单价阳离子盐水溶液和质量浓度为 5%-40% 的十二烷基硫酸钠的甲酰胺溶液混合，在 0~95℃ 孵育 0.5~120 min，在 0~40℃ 放置 0~10 min；

25 (3) 按体积比为 200: 400~1000 向步骤(2)获得的产物中加入起沉淀作用的 3.3M-5M 的单价阳离子盐水溶液，混匀，在 4~25℃ 下，2000~16000g 离心 0.15~30 min，将上清液倒入另一离心管中；

30 (4) 按体积比为 900: 300~800 的比例，向上清液中加入异丙醇，混匀，在 4~37℃ 下，2000~16000g 离心 1~30 min，倒掉上相液体、下相液体及介于上下两相之间的可见的残余杂质固体，得到位于离心管底部的白色 RNA 沉淀。

所述还包括下述步骤：用体积百分浓度为 70%-80% 的乙醇水溶液洗涤白色 RNA 沉淀，在 4~37℃，2000~16000g 离心 10~60s，倒掉洗涤液后，干燥沉淀。

35 所述组织器官和所述混合液的比例为 5~100mg:1ml。

所述单价阳离子盐为氯化锂、氯化钠或氯化钾至少一种。

所述单价阳离子盐为氯化钠或氯化锂。

所述起沉淀作用单价阳离子盐为氯化锂、氯化钠和氯化钾至少一种。

所述起沉淀作用单价阳离子盐为氯化钠和氯化钾。

所述步骤（4）为：按体积比为 700: 400~600 的比例，向上清液中加入异丙醇，均匀，在 20~25℃下，8000~12000g 离心 2 min，倒掉上相液体、下相液体及介于上下两相之间的可见的残余杂质固体，可得到位于离心管底部的白色 RNA 沉淀。

10 实验证明本发明的方法能够高效剥离生物样品中的 RNA 上的蛋白质，获得纯品 RNA 产品，避免了现有技术存在的产品中残存的蛋白质对产物 RNA 的分解作用；本发明所用试剂为低毒化合物，对环境和人体的危害小；由于不易被分解，所获得的产品可方便于远途运输和室温存贮；本发明操作简便、操作人员不需专业的技术便可操作，设备简单、成本低廉，所得到的 RNA 得率和纯度都极高。

该发明适于普通实验室应用和工业化生产。

#### 附图说明

- 15 图 1 为实施例 1 和实施例 2 所获得的产品的电泳图。  
图 2 为实施例 3 产品的电泳图、产率及纯度比值。  
图 3 为实施例 4 产品的电泳图、产率及纯度比值。  
图 4 为实施例 5 产品的电泳图、产率及纯度比值。  
图 5 为实施例 10 使用 5M NaCl 水溶液的解离时间和油菜幼叶 RNA 得率之间的关系。  
20 图 6 为实施例 11 用于解离作用的 13.5M LiCl 水溶液体积和山楂树幼叶 RNA 得率之间的关系。  
图 7 为实施例 12 使用 13.5M LiCl 水溶液的解离时间和山楂树幼叶 RNA 得率之间的关系。  
图 8 为实施例 13 使用 13.5M LiCl 水溶液的解离温度和杨树幼叶 RNA 得率之间的关系。  
25 图 9 为实施例 14 使用油菜幼叶匀浆液的解离作用之后之冷却时间和 RNA 得率的关系。  
图 10 为实施例 15 的用本发明方法和 Trizol 试剂法分别提取小鼠肝脏 RNA 样品中的 β-actin mRNA 之 RT-PCR 扩增比较。  
图 11 为实施例 16 的用本发明方法和 Trizol 试剂法分别提取油菜幼叶 RNA 样品中的 β-actin mRNA 之 RT-PCR 扩增比较。  
30 图 12 为实施例 18 的小鼠肝脏质量与甲酰胺体积之比例和 RNA 样品得率的关系。

#### 具体实施方式

下面的实施例可以使本领域的技术人员能够理解本发明，但并不对本发明作任何限制。

35 实施例 1 用甲酰胺悬浮的大肠杆菌细胞中 RNA 在高温下不分解  
从生物材料中分离纯化 RNA 的方法，包括如下步骤：

(1) 将已经接种了大肠杆菌菌株 JM109 (购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司) 的 LB 培养基在 37℃180 转/分摇床上过夜培养；在 1.5ml 离心管中加入 1ml 的该大肠杆菌培养菌液，室温下 8000g 以上离心 1 分钟，然后倒掉液体；再如上重复一次离心，然后用微量加样器吸去残余液体，得到大肠杆菌菌株 JM109 细胞沉淀；向大肠杆菌菌株 JM109 细胞沉淀中加入 160 $\mu$ l 甲酰胺，在 25℃悬浮 15s，得到脱水生物样品；大肠杆菌菌株 JM109 细胞沉淀和甲酰胺的比例为 5mg：160 $\mu$ l；

(2) 向 160 $\mu$ l 脱水生物样品中加入 40 $\mu$ l 质量百分浓度为 20% 十二烷基硫酸钠 (SDS) 的甲酰胺溶液，混匀，在 80℃孵育 10 min，以破裂细菌细胞，在 0℃放置 5min；

(3) 向步骤 (2) 获得的产物中加入起沉淀作用的 600 $\mu$ l 3.3M NaCl 水溶液，蜗旋震荡混匀，并冰浴 5 分钟，在 4℃下，8000g 离心 1 min，将上清液倒入另一离心管中；

(4) 向上清液中加入 600 $\mu$ l 异丙醇混匀，在 4℃下，8000g 离心 2 min，倒掉液体，可得到位于离心管底部的白色 RNA 沉淀。

用体积百分浓度为 70% 的乙醇水溶液洗涤离心管底部的沉淀；在在 4℃，8000g 离心 30 秒钟，倒掉洗涤液后，倒扣离心管于滤纸上，以晾干沉淀，加入 150 $\mu$ l 的注射用水溶解沉淀，用于检测。

琼脂糖凝胶电泳检验：取 0.4  $\mu$ l 上述 RNA 水溶液样品在 1.2% 的非变性琼脂糖凝胶 (1xTAE 电泳缓冲液) 中电泳，以 4V/cm 的电压电泳 30 分钟。

琼脂糖凝胶电泳结果：电泳图谱如图 1 中的 1 道所示，该大肠杆菌 RNA 溶液样品的 16s rRNA，23s rRNA 边缘整齐，证明所提取的大肠杆菌 RNA 溶液中 RNA 分子没有被分解。

归纳：实施例 1 的结果说明了用甲酰胺悬浮大肠杆菌细胞后，即使在 80℃下进行该细胞的孵育，可完全抑制甲酰胺溶液中的具有 RNases 活性的所有酶，防止了 RNA 分子被分解。

## 25 实施例 2 用异丙醇抽提杂质和离心沉淀 RNA 方法去掉 RNA 样品中的核酸酶

从生物材料中分离纯化 RNA 的方法，包括如下步骤：

(1) - (2) 同实施例 1；

(3) 向步骤 (2) 获得的 200 $\mu$ l 产物中加入起沉淀作用的 700 $\mu$ l 含有 3.57 M NaCl, 1.14 M KCl 的水溶液，蜗旋震荡混匀，在室温下，16000g 离心 5 min，将上清液倒入另一离心管中；

(4) 向上清液中加入 500 $\mu$ l 异丙醇混匀，在 25℃下，16000g 离心 10 min，倒掉上相液体、下相液体及介于上下两相之间的可见的残余杂质固体，可得到位于离心管底部的白色 RNA 沉淀。

用体积百分浓度为 80% 的乙醇水溶液洗涤白色 RNA 沉淀，在室温，16000g 离心 10s，倒掉洗涤液后，干燥沉淀。

加入 150 $\mu$ l 的注射用水 (无 RNases 污染) 溶解沉淀。取 RNA 样品各 50 $\mu$ l 到两个离心

管中，在 70℃下分别孵育 5 分钟、60 分钟。最后取出这两个离心管放于室温下冷却。

琼脂糖凝胶电泳检测：与实施例 1 中的琼脂糖凝胶电泳方法相同。

琼脂糖凝胶电泳结果：电泳图谱如图 1 中的 2、3 道 RNA 样品分别进行了 5 分钟、60 分钟的 70℃保温，其结果显示，该大肠杆菌 RNA 溶液的两种孵育处理后样品完全一样，即为它们的 16s rRNA，23s rRNA 边缘整齐，证明所提取的大肠杆菌 RNA 溶液中 RNA 分子在长时间的保温试验后仍然没有被分解。

实施例 2 归纳：使用异丙醇抽提杂质和离心沉淀 RNA 方法提取大肠杆菌细胞 RNA，所得的 RNA 溶液样品中完全不含有可分解 RNA 的任何核酸酶。

### 10 实施例 3 甲酰胺中的 SDS 促进蛋白-RNA 复合物的分开

从生物材料中分离纯化 RNA 的方法，包括如下步骤：

分别称取一定质量的 SDS 固体，放于 1.5ml 离心管中，并加入 1ml 甲酰胺液体，放于 70℃下保温 10 分钟，以溶解 SDS 固体，以获得 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%SDS 的甲酰胺溶液；将已经接种了大肠杆菌菌株 JM109 的 LB 培养基在 37℃ 180 转摇床上过夜的培养；取 2ml 过夜培养的菌液，加入到 37℃下保温的 100ml LB 培养基，并在 37℃ 180 转摇床上培养 3~4 小时，其 600nm 的吸光度值达到约 0.8；取 10 个 1.5ml 离心管，每个离心管中加入 1ml 的该大肠杆菌培养菌液，室温下 8000g 以上离心 1 分钟，然后倒掉液体；再如上重复一次离心，吸去残余液体。分别用 200μl 含有 0.00%（对照组）、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%SDS 的甲酰胺溶液，悬浮该离心管中的细胞沉淀；

20 将离心管 80℃下孵育 10 分钟，以破裂细菌细胞。然后将离心管冰浴 5 分钟以上；

(3) ~ (4) 同实施例 2；

用体积百分浓度为 80%的乙醇水溶液洗涤白色 RNA 沉淀，在室温，16000g 离心 10s，倒掉洗涤液后，干燥沉淀。加入 150μl 的注射用水（无 RNases 污染）溶解沉淀。

琼脂糖凝胶电泳：与实施例 1 中的琼脂糖凝胶电泳方法相同。

25 琼脂糖凝胶电泳分析结果：如图 2-1 所示，所有的处理所得到的 RNA 样品的 23s rRNA 和 16s rRNA 条带边缘清晰，表明 RNA 没有被分解。另外，4 道的 RNA 条带最亮，表明 4%SDS-甲酰胺悬浮液用于细胞裂解，可以获得最大的得率。

分光光度计测定：取 RNA 溶液样品 75μl，加入到石英比色杯中的 2ml TE 溶液(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, PH8.0) 中混匀，并以 TE 溶液 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 30 PH8.0) 为对照，在紫外分光光度计上进行 260nm, 280nm 的吸光度测定。

分光光度计分析结果：如图 2-2 显示，不存在 SDS 的情况下，也能产生 RNA；但随着双价阳离子 SDS 浓度的增高，解离作用越来越强，但使用 4.00%SDS 的细胞裂解液是最高解离效果。所有的 RNA 样品的 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 皆在 2.1-2.25 之间，如图 2-3 显示，表明其无蛋白污染，没有、或者只有极微量 DNA 污染。

35 实施例 3 归纳：该实施例说明了不同浓度的 SDS 甲酰胺溶液在 80℃下对大肠杆菌细胞进行裂解和分开蛋白-RNA 复合物的效果。悬浮大肠杆菌的甲酰胺溶液在 80℃下能进行

大肠杆菌细胞裂解和分开蛋白-RNA 复合物（即解离作用）；但是 SDS 对解离作用有促进作用；于 80℃10 分钟解离作用时，使用 4%SDS-甲酰胺溶液悬浮大肠杆菌细胞时，可获得最大 RNA 得率。

5 实施例 4 甲酰胺中的钠离子 ( $\text{Na}^+$ ) 促进蛋白-RNA 复合物的分开

从生物材料大肠杆菌菌株 ATCC27853 中分离纯化 RNA 的方法，包括如下步骤：

(1) 将已经接种了大肠杆菌菌株 ATCC27853（购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司）的 LB 培养基在 37℃ 180 转/分摇床上过夜的培养。取 2ml 过夜培养的菌液，加入到 37℃下保温的 100ml LB 培养基，并在 37℃ 180 转/分摇床上培养 3~4 小时，其 600nm 10 的吸光度值达到约 0.8。取 10 个 1.5ml 离心管，每个离心管中加入 1ml 的该大肠杆菌培养菌液，室温下 8000g 以上离心 1 分钟，然后倒掉液体；再如上重复一次离心，吸去残余液体，得到大肠杆菌单细胞沉淀。

在 0℃ 下，向各个单细胞沉淀的离心管中分别加入 200 $\mu\text{l}$  甲酰胺进行悬浮；

(2) 向各个离心管中分别加入：

15 0  $\mu\text{l}$  5M NaCl (对照组)、5  $\mu\text{l}$  5M NaCl、10  $\mu\text{l}$  5M NaCl、15  $\mu\text{l}$  5M NaCl、20  $\mu\text{l}$  5M NaCl、25  $\mu\text{l}$  5M NaCl、30  $\mu\text{l}$  5M NaCl、40  $\mu\text{l}$  5M NaCl、50  $\mu\text{l}$  5M NaCl、75  $\mu\text{l}$  5M NaCl，混匀，于 80℃下孵育 10 分钟，以破裂细菌细胞，然后将离心管室温下放置 2 分钟；

20 (3) 向步骤 (2) 获得的各个产物中加入起沉淀作用的 700 $\mu\text{l}$  含有 3.57 M NaCl, 1.14 M KCl 的水溶液，蜗旋震荡混匀，在室温下，16000g 离心 1 min，将上清液倒入另一离心管中；

(4) 向上清液中加入 500 $\mu\text{l}$  异丙醇混匀，在 25℃ 下，12000g 离心 2 min，倒掉上相液体、下相液体及介于上下两相之间的可见的残余杂质固体，得到位于离心管底部的白色 RNA 沉淀。

用 1ml 体积百分浓度为 70% 的乙醇水溶液，洗涤白色 RNA 沉淀，在室温，16000g 离心 10s，倒掉洗涤液后，干燥沉淀。加入 150 $\mu\text{l}$  的注射用水（无 RNases 污染）溶解沉淀。

琼脂糖凝胶电泳：与实施例 1 中的琼脂糖凝胶电泳方法相同。

琼脂糖凝胶电泳分析结果：如图 3-1 所示，使用 200  $\mu\text{l}$  甲酰胺溶液和 10~50  $\mu\text{l}$  5M NaCl 溶液来悬浮细胞沉淀，所得到的 RNA 样品的 23s rRNA 和 16s rRNA 条带边缘清晰。另外，用 200  $\mu\text{l}$  甲酰胺溶液和 20~30  $\mu\text{l}$  5M NaCl 溶液来悬浮细胞沉淀，可获得很高的 RNA 产量。

分光光度计测定：与实施例 3 中的分光光度计测定方法相同。

分光光度计分析结果：如图 3-2 显示，不存在 NaCl 的情况下，也能产生少量 RNA；但随着加入的 5M NaCl 水溶液体积的增高，所提取的大肠杆菌的 RNA 产量越来越大，使用 200  $\mu\text{l}$  甲酰胺溶液和 20 $\mu\text{l}$  5M NaCl 溶液来悬浮细胞沉淀，可获得最高的 RNA 产量。使用 200  $\mu\text{l}$  甲酰胺 和 10 $\mu\text{l}$ -50 $\mu\text{l}$  5M NaCl 溶液来悬浮细胞沉淀，所得到的 RNA 样品的 OD260/OD280 皆在 2.1~2.25 之间（图 3-3 显示），表明其无蛋白污染，没有或者只有极微

量 DNA 污染。

实施例 4 归纳：该实施例说明使用 200  $\mu\text{l}$  甲酰胺溶液和 10~50  $\mu\text{l}$  5M NaCl 溶液来悬浮细胞沉淀，并在 80°C 下孵育，可以对大肠杆菌细胞进行裂解和有效分开蛋白-RNA 复合物，产生裸露的 RNA 分子。用 200  $\mu\text{l}$  甲酰胺溶液和 20  $\mu\text{l}$  5M NaCl 溶液来悬浮细胞沉淀，可获得最高的 RNA 产量，并且无蛋白污染和 RNases 污染。将上面的结果与实施例 3 归纳相比较，可以得出：通过加热作用，在甲酰胺中的钠离子 ( $\text{Na}^+$ ) 可以有效地分开细菌之蛋白-RNA 复合物，产生裸露的完整 RNA 分子。

实施例 5 用白菜幼叶的甲酰胺匀浆液和不同体积的 5M NaCl (解离剂) 之混合液的 RNA 提取

从生物材料中分离纯化 RNA 的方法，包括如下步骤：

(1) 在冰上 Dounce 匀浆器中加入 3ml 4°C 储存的甲酰胺和 300mg 的白菜幼叶 (购自市场)，并进行匀浆 20s；

(2) 在室温下，取 6 个 1.5ml 离心管，每个离心管中加入 200  $\mu\text{l}$  的白菜幼叶的甲酰胺匀浆液，并分别加入 20  $\mu\text{l}$ 、30  $\mu\text{l}$ 、40  $\mu\text{l}$ 、50  $\mu\text{l}$ 、60  $\mu\text{l}$ 、75  $\mu\text{l}$  5M NaCl 水溶液，涡旋震荡混匀；

将离心管进行 90°C 下孵育 10 分钟。然后将离心管于室温下放置 5 分钟；

(3)~(4) 同实施例 2。

用 1ml 体积百分浓度为 70% 的乙醇水溶液，洗涤白色 RNA 沉淀，在室温，16000g 离心 10s，倒掉洗涤液后，干燥沉淀。加入 150 $\mu\text{l}$  的注射用水 (无 RNases 污染) 溶解沉淀。

琼脂糖凝胶电泳：与实施例 1 中的琼脂糖凝胶电泳方法相同。

琼脂糖凝胶电泳分析结果：如图 4-1 所示，使用 200  $\mu\text{l}$  的白菜幼叶之甲酰胺匀浆液和 20~75  $\mu\text{l}$  5M NaCl 水溶液来悬浮细胞沉淀，所得到的 RNA 样品的 26s rRNA 和 18s rRNA 条带边缘清晰、且两者亮度比例接近 2:1。另外，用 200  $\mu\text{l}$  的白菜幼叶之甲酰胺匀浆液和 40~60  $\mu\text{l}$  5M NaCl 水溶液混合后所提取的 RNA 溶液，具有最亮的 18s rRNA 和 26s rRNA 电泳带谱，即其是具有最高的 RNA 得率。

分光光度计测定：与实施例 3 中的分光光度计测定方法相同。

分光光度计分析结果：如图 4-2 显示，随着加入到 200  $\mu\text{l}$  的白菜幼叶之甲酰胺匀浆液的 5M NaCl 的增高，所提取的大白菜幼叶的 RNA 得率越来越大，但使用 200  $\mu\text{l}$  的白菜幼叶之甲酰胺匀浆液和 50  $\mu\text{l}$  5M NaCl 溶液来进行 90°C 孵育，可获得最高的 RNA 得率。所有的 RNA 样品的 OD260/OD280 皆在 2.1~2.25 之间，如图 4-3 显示，表明其无蛋白污染，没有或者只有极微量 DNA 污染。

实施例 5 归纳：该实施例说明使用 200  $\mu\text{l}$  的白菜幼叶之甲酰胺匀浆液溶液和 10~50  $\mu\text{l}$  5M NaCl 水溶液来悬浮细胞沉淀，并在 90°C 下孵育，可以有效地分开真核细胞的蛋白-RNA 复合物，产生裸露的 RNA 分子。用 200  $\mu\text{l}$  的白菜幼叶之甲酰胺匀浆液和 50  $\mu\text{l}$  5M NaCl 水溶液来进行 90°C 的孵育，可获得最高的 RNA 产量，并且无蛋白污染和 RNases 污染。

## 实施例 6 小鼠肝脏 RNA 的提取 (1)

从生物材料中分离纯化 RNA 的方法，包括如下步骤：

(1) 在冰上 Downce 匀浆器中加入 2ml 4°C 储存的甲酰胺溶液和 200mg 的新鲜的小鼠  
5 (京白 1 号，购自中国医学科学院血液学研究所) 肝脏，并进行匀浆 20s；

(2) 在室温下，在 1.5ml 离心管加入 200 μl 步骤 (1) 获得的小鼠肝脏的甲酰胺匀浆  
10 液和 50 μl 5M NaCl 水溶液，涡旋震荡混匀；然后将离心管 90°C 下孵育 10 分钟，将离心管  
于室温下放置 2 分钟；

(3) 向步骤 (2) 获得的 200μl 产物中加入起沉淀作用的 700μl 含有 3.57 M NaCl, 1.14  
15 M KC1 的水溶液，涡旋震荡混匀，在室温下，16000g 离心 5 min，将上清液倒入另一离心  
管中；

(4) 向上清液中加入 500μl 异丙醇混匀，在 25°C 下，16000g 离心 10 min，倒掉上相  
液体、下相液体及介于上下两相之间的可见的残余杂质固体，可得到位于离心管底部的白  
色 RNA 沉淀。

用 1ml 体积百分浓度为 70% 的乙醇水溶液，洗涤白色 RNA 沉淀，在室温，16000g  
15 离心 10s，倒掉洗涤液后，干燥沉淀。加入 150μl 的注射用水（无 RNases 污染）溶解沉淀。

琼脂糖凝胶电泳：与实施例 1 中的琼脂糖凝胶电泳方法相同。

琼脂糖凝胶电泳分析结果：所得到的 RNA 样品的 28s rRNA 和 18s rRNA 条带边缘清  
晰、且两者亮度比例接近 2:1。

分光光度计测定：与实施例 3 中的分光光度计测定方法相同。

分光光度计分析结果：所提取小鼠肝脏 RNA 的得率为 5.2μg/mg，所得的 RNA 溶液的  
260nm 吸光度与 280nm 吸光度的比值为 2.22。

实施例 6 归纳：使用本发明的方法，可以很好地提取动物组织 RNA。

## 实施例 7 小鼠肝脏 RNA 的提取(2)

从生物材料中分离纯化 RNA 的方法，包括如下步骤：

(1)~(4) 同实施例 6；

用 1ml 体积百分浓度为 70% 的乙醇水溶液，洗涤白色 RNA 沉淀，在室温，16000g 离  
心 10s，倒掉洗涤液后，倒扣离心管于滤纸干燥沉淀；再加入 1ml 体积百分浓度为 95%  
30 的乙醇水溶液浸泡 RNA 沉淀，并该离心管盖上盖后，于室温下浸泡 30 天，离心，倒掉 95%  
乙醇液体，倒扣离心管于滤纸上晾干 RNA 沉淀；最后加入 150μl 的注射用水（无 RNases  
污染）溶解沉淀。

琼脂糖凝胶电泳：与实施例 1 中的琼脂糖凝胶电泳方法相同。

琼脂糖凝胶电泳分析结果：所得到的 RNA 样品的 28s rRNA 和 18s rRNA 条带边缘清  
晰、且两者亮度比例接近 2:1；该结果与实施例 6 的分光光度计分析结果接近。

分光光度计测定：与实施例 3 中的分光光度计测定方法相同。

分光光度计分析结果：所提取小鼠肝脏 RNA 的得率为 5.4μg/mg，所得的 RNA 溶液的

260nm 吸光度与 280nm 吸光度的比值为 2.24；该结果与实施例 6 的分光光度计分析结果接近。

实施例 7 归纳：使用本发明的方法所提取的 RNA 沉淀，就是在室温，体积百分浓度为 95% 的乙醇水溶液中浸泡保存，仍无分解。

5

### 实施例 8 小鼠肝脏 RNA 的提取（3）

从生物材料中分离纯化 RNA 的方法，包括如下步骤：

(1) 在冰上 Downce 匀浆器中加入 2ml 4℃ 储存的甲酰胺与 0.5ml 5M NaCl 水溶液的混合液混匀，再加入 200mg 的新鲜的小鼠（京白 1 号）肝脏，匀浆 1min，

10 (2) 在室温下，在 1.5ml 离心管加入 250 μl 步骤 (1) 获得的小鼠肝脏的甲酰胺匀浆液，然后将离心管 90℃ 下孵育 10 分钟，将离心管于室温下放置 2 分钟；

(3) ~ (4) 同实施例 6；

用 1ml 体积百分浓度为 70% 的乙醇水溶液，洗涤白色 RNA 沉淀，在室温，16000g 离心 10s，倒掉洗涤液后，干燥沉淀。加入 150μl 的注射用水（无 RNases 污染）溶解沉淀。

15 分光光度计测定：与实施例 3 中的分光光度计测定方法相同。

分光光度计分析结果：所提取小鼠肝脏 RNA 的得率为 4.95μg/mg，所得的 RNA 溶液的 260nm 吸光度与 280nm 吸光度的比值为 2.15；该结果与实施例 6 的分光光度计分析结果接近。

琼脂糖凝胶电泳：与实施例 1 中的琼脂糖凝胶电泳方法相同。

20 琼脂糖凝胶电泳分析结果：所得到的 RNA 样品的 28s rRNA 和 18s rRNA 条带边缘清晰、且两者亮度比例接近 2:1；该结果与实施例 6 的分光光度计分析结果接近。

实施例 8 归纳：用甲酰胺和 5M NaCl 水溶液按照 4: 1 的体积比匀浆小鼠肝脏，用于提取 RNA，也获得了高质量和高得率的 RNA 样品。

### 25 实施例 9 小鼠小肠 RNA 的提取

从生物材料中分离纯化 RNA 的方法，包括如下步骤：

(1) 在 1.5ml 离心管中加入 1ml 4℃ 储存的甲酰胺和 100mg 的新鲜的、用生理盐水洗净的小鼠（京白 1 号）小肠，在 37℃ 下用电泳匀浆器进行三次（20000rpm、20 秒匀浆）；

(2) 同实施例 6；

30 (3) 向步骤 (2) 获得的 200μl 产物中加入起沉淀作用的 700μl 含有 3.57 M NaCl, 1.14 M KCl 的水溶液，蜗旋震荡混匀，在室温下，2000g 离心 30 min，将上清液倒入另一离心管中；

(4) 同实施例 6

用 1ml 体积百分浓度为 70% 的乙醇水溶液，洗涤白色 RNA 沉淀，在室温，16000g 离心 10s，倒掉洗涤液后，干燥沉淀。加入 100μl 的注射用水（无 RNases 污染）溶解沉淀。

琼脂糖凝胶电泳：与实施例 1 中的琼脂糖凝胶电泳方法相同。

琼脂糖凝胶电泳分析结果：所得到的 RNA 样品的 28s rRNA 和 18s rRNA 条带边缘清晰、且两者亮度比例接近 2:1。

分光光度计测定：与实施例 3 中的分光光度计测定方法相同。

分光光度计分析结果：所提取小鼠小肠 RNA 的得率为 1.21 $\mu\text{g}/\text{mg}$ ，所得的 RNA 溶液 5 的 260nm 吸光度与 280nm 吸光度的比值为 2.22。

实施例 9 归纳：使用本发明的方法，能高效地提取小鼠小肠的 RNA。

#### 实施例 10 使用 5M NaCl 水溶液的解离时间和油菜幼叶 RNA 得率之间的关系

从生物材料中分离纯化 RNA 的方法，包括如下步骤：

10 (1) 在冰上 Dounce 匀浆器中加入 5ml 4°C 储存的甲酰胺和 500mg 的新鲜的油菜 (*Brassica campestris L.*) 幼叶，并进行充分的匀浆；

(2) 在室温下，在 7 个 1.5ml 离心管分别加入 200  $\mu\text{l}$  的白菜幼叶的甲酰胺匀浆液和 50  $\mu\text{l}$  5M NaCl 水溶液，涡旋震荡混匀；然后将离心管进行 1、2、5、10、15、20、30 分钟、87.5°C 下孵育；然后将离心管于室温下放置 2 分钟；

15 (3) ~ (4) 同实施例 6。

用 1ml 体积百分浓度为 70% 的乙醇水溶液，洗涤白色 RNA 沉淀，在室温，16000g 离心 10s，倒掉洗涤液后，干燥沉淀。加入 100 $\mu\text{l}$  的注射用水（无 RNases 污染）溶解沉淀。

分光光度计测定：与实施例 3 中的分光光度计测定方法相同。

分光光度计分析结果：如图 5 所示所提取油菜幼叶 RNA 的得率会随着孵育时间的增长而增大，但在接近孵育时间到达 10 分钟时，所得 RNA 得率已经接近最高得率。

实施例 10 归纳：使用 5M NaCl 水溶液用于解离剂作用提取 RNA，所使用的孵育（解离）时间为 10 分钟之后，所得到的 RNA 得率已经接近最大得率。

#### 实施例 11 用于解离作用的 13.5M LiCl 水溶液体积和山楂树幼叶 RNA 得率之间的关系

25 从生物材料中分离纯化 RNA 的方法，包括如下步骤：

(1) 在冰上 Dounce 匀浆器中加入 7ml 4°C 储存的甲酰胺和 700mg 的新鲜的山楂 (*Crataegus pinnatifida*) 树幼叶，并进行充分的匀浆；

(2) 取 3 组 1.5ml 离心管，每组皆为 9 个离心管；在室温下，分别在每组的 9 个 1.5ml 离心管中加入 200  $\mu\text{l}$  的山楂树幼叶的甲酰胺匀浆液和 0、4、7、9、10、11、15、20、25  $\mu\text{l}$  30 13.5M LiCl 水溶液，涡旋震荡混匀；将这三组离心管分别在 55、75、85°C 下进行 2 分钟 孵育；然后将离心管于室温下放置 2 分钟；

(3) ~ (4) 同实施例 6。

用 1ml 体积百分浓度为 70% 的乙醇水溶液，洗涤白色 RNA 沉淀，在室温，16000g 离心 10s，倒掉洗涤液后，干燥沉淀。加入 100 $\mu\text{l}$  的注射用水（无 RNases 污染）溶解沉淀。

35 分光光度计测定：与实施例 3 中的分光光度计测定方法相同。

分光光度计分析结果：如图 6 所示，在不同的孵育(解离)温度下提取山楂树幼叶 RNA，

使用  $10\mu\text{l}$   $13.5\text{M LiCl}$  水溶液和  $200\mu\text{l}$  的幼叶匀浆液混合液用于解离作用，可以获得最大的 RNA 得率。

实施例 11 归纳：使用 1 份体积  $13.5\text{M LiCl}$  水溶液和 20 份体积的山楂树幼叶匀浆液混合液，在某一特定温度下进行孵育（解离）作用，可以获得最大的 RNA 得率。

5

实施例 12 使用  $13.5\text{M LiCl}$  水溶液的解离时间和山楂树幼叶 RNA 得率之间的关系

(1) 在冰上 Downce 匀浆器中加入  $7\text{ml}$   $4^\circ\text{C}$  储存的甲酰胺和  $700\text{mg}$  的新鲜的山楂 (*Crataegus pinnatifida*) 树幼叶，并进行充分的匀浆；

10 (2) 取 3 组  $1.5\text{ml}$  离心管，在室温下，分别在每组的 6 个  $1.5\text{ml}$  离心管中加入  $200\mu\text{l}$  的山楂树幼叶的甲酰胺匀浆液和  $10\mu\text{l}$   $13.5\text{M LiCl}$  (解离剂)，涡旋震荡混匀；然后将这三组离心管分别在  $55$ 、 $75$ 、 $85^\circ\text{C}$  下进行  $0$ 、 $1$ 、 $2$ 、 $5$ 、 $10$ 、 $20$  分钟孵育；然后将离心管于室温下放置 2 分钟；

(3) ~ (4) 同实施例 6；

15 用  $1\text{ml}$  体积百分浓度为  $70\%$  的乙醇水溶液，洗涤白色 RNA 沉淀，在室温， $16000\text{g}$  离心  $10\text{s}$ ，倒掉洗涤液后，干燥沉淀。加入  $100\mu\text{l}$  的注射用水 (无 RNases 污染) 溶解沉淀。

分光光度计测定：与实施例 3 中的分光光度计测定方法相同。

分光光度计分析结果：如图 7 所示，在不同的孵育(解离)温度下提取山楂树幼叶 RNA，所提取幼叶 RNA 的得率会随着孵育时间的增长而增大，但在接近孵育时间到达 2 分钟时，所得 RNA 得率已经接近最高得率。

20 实施例 12 归纳：在不同的孵育(解离)温度下使用  $13.5\text{M LiCl}$  水溶液用于提取 RNA，所使用的孵育（解离）时间为 2 分钟之后，所得到的 RNA 得率已经接近最大得率。

实施例 13 使用  $13.5\text{M LiCl}$  水溶液的解离温度和杨树幼叶 RNA 得率之间的关系

(1) 在冰上 Downce 匀浆器中加入  $7\text{ml}$   $4^\circ\text{C}$  储存的甲酰胺和  $700\text{mg}$  的新鲜的杨树 (*Populus bonatii Lev*) 幼叶，并进行充分的匀浆；

25 (2) 在室温下，在 8 个  $1.5\text{ml}$  离心管中加入  $200\mu\text{l}$  的杨树幼叶的甲酰胺匀浆液和  $10\mu\text{l}$   $13.5\text{M LiCl}$  水溶液，涡旋震荡混匀；然后将离心管分别在  $29$ 、 $37$ 、 $45$ 、 $55$ 、 $65$ 、 $75$ 、 $85$ 、 $95^\circ\text{C}$  下进行 2 分钟孵育；

(3) ~ (4) 同实施例 6；

30 用  $1\text{ml}$  体积百分浓度为  $70\%$  的乙醇水溶液，洗涤白色 RNA 沉淀，在室温， $16000\text{g}$  离心  $10\text{s}$ ，倒掉洗涤液后，干燥沉淀。加入  $100\mu\text{l}$  的注射用水 (无 RNases 污染) 溶解沉淀。

琼脂糖凝胶电泳：与实施例 1 中的琼脂糖凝胶电泳方法相同。

35 琼脂糖凝胶电泳分析结果：在  $29\sim85^\circ\text{C}$  下进行孵育（解离）作用的 RNA 之  $26\text{s rRNA}$ ， $18\text{s rRNA}$  的条带边缘光滑整齐，所以没有分解。而在  $95^\circ\text{C}$  下进行孵育（解离）作用的 RNA 之  $26\text{s rRNA}$ ， $18\text{s rRNA}$  的条带模糊不清楚，表明该 RNA 样品已经被分解了。

分光光度计测定：与实施例 3 中的分光光度计测定方法相同。

分光光度计分析结果：如图 8 所示，在不同的孵育(解离)温度下提取山杨树幼叶 RNA，所提取幼叶 RNA 的得率会随着孵育温度的增长而增大，但在到达 85℃孵育（解离）时，所得 RNA 得率已经接近最高得率。

实施例 13 归纳：在不同的孵育(解离)温度下使用 13.5M LiCl 水溶液提取 RNA，在到 5 达 85℃孵育（解离）时，所得 RNA 得率已经接近最高得率，而且其没有被分解。

实施例 14 油菜幼叶匀浆液的解离作用之后之冷却时间和 RNA 得率的关系。

(1) 在冰上 Downce 匀浆器中加入 7ml 4℃ 储存的甲酰胺和 700mg 的新鲜的油菜 (Brassica campestris L.) 幼叶，并进行充分的匀浆；

10 (2) 取 2 组 1.5ml 离心管，在室温下，分别在每组的 4 个 1.5ml 离心管中加入 200 μl 的油菜幼叶的甲酰胺匀浆液和 50 μl 5 M NaCl 水溶液，涡旋震荡混匀；然后将这 2 组离心管分别在 90℃ 下进行 10 分钟孵育；然后将离心管于室温下或者冰浴放置 0、2、5、10 分钟的时间；

(3) ~ (4) 同实施例 6；

15 用 1ml 体积百分浓度为 70% 的乙醇水溶液，洗涤白色 RNA 沉淀，在室温，16000g 离心 10s，倒掉洗涤液后，干燥沉淀。加入 100μl 的注射用水（无 RNases 污染）溶解沉淀。

分光光度计测定：与实施例 3 中的分光光度计测定方法相同。

20 分光光度计分析结果：如图 9 所示，匀浆混合液在解离作用之后的过长放置时间，会导致所提取 RNA 的得率的降低，而在解离作用之后的 5 分钟内放置，所提取 RNA 的得率的降低极其微小；在低温下（如 0℃）的解离作用后冷却更容易导致 RNA 得率的降低。

实施例 14 归纳：在解离作用之后，匀浆混合液不宜放置时间超过 5 分钟；放置的温度为室温（25℃）较好。

实施例 15 用本发明方法和 Trizol 试剂法分别提取小鼠肝脏 RNA 样品中的 β-actin mRNA 25 之 RT-PCR 扩增比较

1. 按照实施例 6 步骤 (1) - (4) 提取小鼠（京白一号）肝脏的 RNA；用 1ml 体积百分浓度为 70% 的乙醇水溶液，洗涤白色 RNA 沉淀，在室温，16000g 离心 10s，倒掉洗涤液后，干燥沉淀。加入 50μl 的注射用水（无 RNases 污染）溶解来自约 20mg 的小鼠肝脏的 RNA 沉淀；

30 2. 按照 Invitrogen 公司之 Trizol 说明书提取 50mg 的小鼠肝脏 RNA，将所得 RNA 沉淀溶解于 50 μl 无 RNases 污染的水中；

3. 按照 KaTaRa 公司的说明书，用 AMV 逆转录酶合成上述两个 RNA 样品中的第一条 cDNA；

35 4. 按照下表加入合成的 cDNA 溶液和各种溶液；其中 primer f 和 primer r 是用于扩增 β-actin 之 cDNA 的一对引物，分别为：

β-actin F 5' atcatgttgagaccttcaaca 3' ；

$\beta$ -actin R5' catctttgctgaagtcca 3' ;

所扩增的 DNA 产物长度为 318bp;

扩增条件如下: 进行 94°C 下 2 分钟初始变性; 进行 35 循环的 94°C 30 秒变性、62°C 30 秒淬火和 72°C 30 秒的延伸反应; 进行 72°C 下 2 分钟终止延伸反应。

5 表 1

组成	体积/ $\mu$ l
cDNA	2
10×PCR Buffer	2.5
dNTPs (10mM)	0.5
primer f(20pmol/ $\mu$ l)	0.25
primer r(20pmol/ $\mu$ l)	0.25
Taq 酶 (2 $\mu$ / $\mu$ l)	0.5
Sybr Green I(10 $\times$ )	1
ddH2O	18

琼脂糖凝胶电泳: 取 1  $\mu$ l 上述 RT-PCR 扩增产物在 1.2% 的非变性琼脂糖凝胶(1xTAE 电泳缓冲液)中电泳。

琼脂糖凝胶电泳分析结果: 如图 10 所示, 使用本发明方法从约 20mg 小鼠肝脏中所得的 RNA 样品进行  $\beta$ -actin mRNA 扩增, 所得的 DNA 产物片断, 与使用 Trizol 试剂方法从 10 50mg 小鼠肝脏中所得的 RNA 样品对应的 DNA 产物片断进行比较, 其亮度, 前者为后者的两倍。

实施例 15 归纳: 使用本发明的方法所提取小鼠肝脏 RNA, 与用 Trizol 试剂法所提取小鼠肝脏 RNA 的样品相比, 具有更好的酶学效果。

15 实施例 16 用本发明方法和 Trizol 试剂方法分别提取油菜幼叶 RNA 样品中的  $\beta$ -actin mRNA 之 RT-PCR 扩增比较

1. 按照实施例 14 步骤 (1) - (4) 提取油菜 (*Brassica campestris* L.) 幼叶的 RNA; 用 1ml 体积百分浓度为 70% 的乙醇水溶液, 洗涤白色 RNA 沉淀, 在室温, 16000g 离心 10s, 倒掉洗涤液后, 干燥沉淀。加入 50 $\mu$ l 的注射用水 (无 RNases 污染) 溶解来自约 20mg 20 的油菜幼叶的 RNA 沉淀;

2. 按照 Invitrogen 公司之 Trizol 说明书提取 50mg 的油菜幼叶的 RNA, 将所得 RNA 沉淀溶解于 50  $\mu$ l 无 RNases 污染的水中;

3. 按照 KaTaRa 公司的说明书, 用 AMV 逆转录酶合成上述两个 RNA 样品中的第一条 cDNA;

25 4. 按照下表加入合成的 cDNA 溶液和各种溶液; 其中 primer f 和 primer r 是用于扩增

$\beta$ -actin 之 cDNA 的一对引物，分别为：

$\beta$ -actin F 5' ggaatggtaaggctggtt 3'；

$\beta$ -actin R 5' tcccggtctgcggtagtg 3'；

表 2

组成	体积/ $\mu$ l
cDNA	2
10×PCR Buffer	2.5
dNTPs (10mM)	0.5
primer f(20pmol/ $\mu$ l)	0.25
primer r(20pmol/ $\mu$ l)	0.25
Taq 酶 (2 $\mu$ / $\mu$ l)	0.5
Sybr Green I(10 $\times$ )	1
ddH <sub>2</sub> O	18

5 所扩增的 DNA 产物长度为 578bp；

扩增条件如下：进行 94℃下 2 分钟初始变性；进行 35 循环的 94℃ 30 秒变性、62℃30 秒淬火和 72℃ 30 秒的延伸反应；进行 72℃下 2 分钟终止延伸反应。

琼脂糖凝胶电泳：取 1  $\mu$ l 上述 RT-PCR 扩增产物在 1.2% 的非变性琼脂糖凝胶(1xTAE 电泳缓冲液)中电泳。

10 琼脂糖凝胶电泳分析结果：如图 11 所示，使用本发明方法从约 20mg 油菜幼叶中所得的 RNA 样品进行  $\beta$ -actin mRNA 扩增，所得的 DNA 产物片断，与使用 Trizol 试剂方法从 50mg 油菜幼叶中所得的 RNA 样品对应的 DNA 产物片断进行比较，其亮度，前者为后者的数倍。

实施例 16 归纳：使用本发明提取油菜幼叶 RNA 的样品，与用 Trizol 试剂所提取油菜幼叶 RNA 的样品相比，具有更好的酶学效果。

本发明的方法中单价阳离子盐优选氯化钠和氯化锂，但实验证明，单价阳离子盐还可以选用氯化铷、氯化铯、乙酸锂、乙酸钠、乙酸钾、乙酸铷、乙酸铯、盐酸胍、硫氰酸胍、氯化铵、乙酸铵至少一种也可以进行 RNA 的提取。

20 实验证明，沉淀剂还可以选用氯化铷、氯化铯、乙酸锂、乙酸钠、乙酸钾、乙酸铷、乙酸铯、盐酸胍、硫氰酸胍、氯化铵和乙酸铵至少一种。

### 实施例 17 多种动植物组织的提取

从生物材料中分离纯化 RNA 的方法，包括如下步骤：

(1) 在冰上 4 个 1.5ml 离心管中加入 1ml 4℃ 储存的甲酰胺，再分别加入 100mg 的新鲜的杨树成熟叶和小鼠（京白 1 号，购自中国医学科学院血液学研究所）心脏、小鼠肺脏、

与小鼠大腿肌肉，并进行 26500rpm 的 20s 电动匀浆处理；

(2) 在室温下，在 4 个 1.5ml 离心管皆加入 50  $\mu$ l 5M NaCl 水溶液，再分别加入 200  $\mu$ l 步骤(1)获得的四种脱水生物样品，然后涡旋震荡混匀；将离心管 90℃ 下孵育 10 分钟，将离心管于室温下放置 2 分钟；

5 (3) ~ (4) 同实施例 6；

用 1ml 体积百分浓度为 70% 的乙醇水溶液，洗涤白色 RNA 沉淀，在室温，16000g 离心 10s，倒掉洗涤液后，干燥沉淀。加入 50 $\mu$ l 的注射用水（无 RNases 污染）溶解沉淀。

琼脂糖凝胶电泳：与实施例 1 中的琼脂糖凝胶电泳方法相同。

琼脂糖凝胶电泳分析结果：所得到的 RNA 样品的 28s rRNA（或者 26s rRNA）和 18s rRNA 条带边缘清晰、且两者亮度比例接近 2:1。

分光光度计测定：与实施例 3 中的分光光度计测定方法类似。

分光光度计分析结果：从各组织中所提取 RNA 样品的得率和纯度分析如表 3 所示。

表 3

组织材料	得率 ( $\mu$ g/mg)	OD260/OD280nm
杨树成熟叶片	0.453	1.914286
小鼠心脏	0.88	2.096774
小鼠肺脏	1.184	1.902174
小鼠大腿肌肉	0.609	2.093023

实施例 17 归纳：使用本发明的方法，可以很好地提取多种动、植物组织 RNA。

15

#### 实施例 18 脱水生物样品中小鼠肝脏质量与甲酰胺体积之比例和 RNA 样品得率的关系

从生物材料中分离纯化 RNA 的方法，包括如下步骤：

(1) 在冰上 7 个 1.5ml 离心管中加入 1ml 4℃ 储存的甲酰胺后，再分别分别加入 10mg、25mg、50mg、100mg、200mg、400mg、800mg 的新鲜小鼠（京白 1 号，购自中国医学科学院血液学研究所）肝脏组织，并进行 26500rpm 的 20s 电动匀浆处理；由于使用 800mg 小鼠肝脏的处理所得到的液体粘稠而弃用；

(2) 在室温下，在 6 个 1.5ml 离心管分别加入 50  $\mu$ l 5M NaCl 水溶液，再分别加入 200  $\mu$ l 步骤(1)获得的 6 种脱水生物样品，然后涡旋震荡混匀；将离心管 90℃ 下孵育 10 分钟，将离心管于室温下放置 2 分钟；

25 (3) ~ (4) 同实施例 6；

用 1ml 体积百分浓度为 70% 的乙醇水溶液，洗涤白色 RNA 沉淀，在室温，16000g 离心 10s，倒掉洗涤液后，干燥沉淀。加入 150 $\mu$ l 的注射用水（无 RNases 污染）溶解沉淀。

琼脂糖凝胶电泳：与实施例 1 中的琼脂糖凝胶电泳方法相同。

琼脂糖凝胶电泳分析结果：除了 400mg 小鼠肝脏组织+1ml 甲酰胺匀浆处理组所得 RNA 之带谱呈弥散状态外，其余所得到的 RNA 样品的 28s rRNA 和 18s rRNA 条带边缘清晰、且两者亮度比例接近 2:1。

分光光度计测定：与实施例 3 中的分光光度计测定方法类似。

5 分光光度计分析结果：从各组织中所提取 RNA 样品的得率分析如图 12 所示。

实施例 18 归纳 在本发明中，按照 1ml 甲酰胺和小于 20mg 小鼠肝脏组织的比例进行匀浆来按照提取 RNA，所得 RNA 样品没有分解；使用 1ml 甲酰胺和 5mg 小鼠肝脏组织的比例进行匀浆，可以获得最大的 RNA 得率。

10 实施例 19 本发明中沉淀剂体积用量、异丙醇体积用量和产生盐颗粒析出及液体分相情况的相关关系

从生物材料中分离纯化 RNA 的方法，包括如下步骤：

(1) 在冰上 1 个 10ml 离心管中加入 4ml 4℃ 储存的甲酰胺和 0.4g 新鲜的杨树幼叶，并进行 26500rpm 的 3 次 20s 电动匀浆处理；

15 (2) 在室温下，按照表 4 和表 5 取 15 个 1.5ml 离心管，每个离心管中皆加入 50 μl 5M NaCl 水溶液和 200 μl 步骤 (1) 获得的脱水生物样品，然后涡旋震荡混匀；将离心管 90℃ 下孵育 10 分钟，将离心管于室温下放置 2 分钟；

(3) 按照表 4、表 5，向步骤 (2) 获得的 250μl 产物中加入起沉淀作用的含有 3.57 M NaCl 水，1.14 M KCl 的水溶液（沉淀剂），涡旋震荡混匀，在室温下，16000g 离心 5 min，  
20 将上清液倒入另一离心管中；

(4) 按照表 4、表 5，向步骤 (3) 获得的上清液中加入异丙醇，涡旋震荡混匀混匀，然后在室温下静置，以观察离心管中的液体是否分为上下两相液体，以及是否产生盐颗粒析出，结果如表 4 和表 5 所示；在 25℃ 下，16000g 离心 10 min，倒掉液体及及可能悬浮于液体中的可见的残余杂质固体，可得到位于离心管底部的白色 RNA 沉淀。

25 用 1ml 体积百分浓度为 70% 的乙醇水溶液，洗涤白色 RNA 沉淀，在室温，16000g 离心 10s，倒掉洗涤液后，干燥沉淀。加入 150μl 的注射用水（无 RNases 污染）溶解沉淀；产生盐颗粒析出的离心管，在加入 1ml 乙醇水溶液后剧烈震荡，析出的盐颗粒被溶解而除了。

琼脂糖凝胶电泳：与实施例 1 中的琼脂糖凝胶电泳方法相同。

30 琼脂糖凝胶电泳分析结果：根据 RNA 样品的电泳图谱中 26s rRNA 和 18s rRNA 条带边缘是否清晰来判断所提取 RNA 是否分解。其结果如表 4、表 5 所示。

实施例 19 归纳 从表 4、表 5 可知道，加入异丙醇后产生上下两相液体的处理能获得不分解的 RNA 产物；其原因是包括具有 RNase 活性的酶的所有蛋白，介于上下两相之间而被除去了。

表 4

管号	1	2	3	4	5	6	7
沉淀剂 ( $\mu$ l)	700	700	700	700	700	700	700
异丙醇 ( $\mu$ l)	200	300	400	500	600	700	800
单价阳离子盐颗粒析出	否	否	否	否	是	是	是
产生上下两相液体	否	是	是	是	是	是	是
RNA 电泳结果	分解	不分解	不分解	不分解	不分解	不分解	不分解

注解：沉淀剂为含有 3.57 M NaCl, 1.14 M KCl 的水溶液。

表 5

管号	8	9	10	11	12	13	14	15
沉淀剂 ( $\mu$ l)	300	400	500	600	700	800	900	1000
异丙醇 ( $\mu$ l)	500	500	500	500	500	500	500	500
单价阳离子盐颗粒 析出	是	是	是	否	否	否	否	否
产生上下两相液体	否	是	是	是	是	是	是	是
RNA 电泳结果	分解	不分解						

注解：沉淀剂为含有 3.57 M NaCl, 1.14 M KCl 的水溶液。

5

### 实施例 20

从生物材料中分离纯化 RNA 的方法，包括如下步骤：

(1) 同实施例 6 步骤 (1);

10 在室温下，在 5 个 1.5ml 离心管分别加入 200  $\mu$ l 步骤 (1) 获得的小鼠肝脏的脱水生物样品和 50  $\mu$ l、100 $\mu$ l、150 $\mu$ l、200 $\mu$ l 和 250 $\mu$ l 的 3M NaCl 水溶液，涡旋震荡混匀；然后将离心管 90°C 下孵育 10 分钟，将离心管于室温下放置 2 分钟；

(3) - (4) 同实施例 6 步骤 (3) - (4);

用 1ml 体积百分浓度为 70% 的乙醇水溶液，洗涤白色 RNA 沉淀，在室温，16000g 离心 10s，倒掉洗涤液后，干燥沉淀。加入 150 $\mu$ l 的注射用水（无 RNases 污染）溶解沉淀。

15 琼脂糖凝胶电泳：与实施例 1 中的琼脂糖凝胶电泳方法相同。

琼脂糖凝胶电泳分析结果：使用 50  $\mu$ l-200 $\mu$ l 3M NaCl 水溶液到 200 $\mu$ l 生物脱水样品中混合而提取的 RNA 样品，其 28s rRNA 和 18s rRNA 条带边缘清晰、且两者亮度比例接近 2:1。

实施例 20 归纳：使用本发明的方法，可以很好地提取动物组织 RNA。

5

### 实施例 21

从生物材料中分离纯化 RNA 的方法，包括如下步骤：

(1) 在冰上 Dounce 匀浆器中加入 1ml 4℃ 储存的甲酰胺溶液和 100mg 的新鲜的小鼠脾脏（京白 1 号，购自中国医学科学院血液学研究所），并进行匀浆 20s；

10 (2) 在室温下，在 4 个 1.5ml 离心管加入 160  $\mu$ l 步骤 (1) 获得的小鼠肝脏的脱水生物样品和 40 $\mu$ l 质量体积比分别为 10%、20%、30%、40% 十二烷基硫酸钠的甲酰胺溶液，以及 50  $\mu$ l 5M NaCl 水溶液，涡旋震荡混匀；然后将离心管 90℃ 下孵育 10 分钟，将离心管于室温下放置 2 分钟；

(3) - (4) 同实施例 6 步骤 (3) - (4)；

15 用 1ml 体积百分浓度为 70% 的乙醇水溶液，洗涤白色 RNA 沉淀，在室温，16000g 离心 10s，倒掉洗涤液后，干燥沉淀。加入 150 $\mu$ l 的注射用水（无 RNases 污染）溶解沉淀。

琼脂糖凝胶电泳：与实施例 1 中的琼脂糖凝胶电泳方法相同。

琼脂糖凝胶电泳分析结果：所得的四种 RNA 样品，其 28s rRNA 和 18s rRNA 条带边缘清晰、且两者亮度比例接近 2:1。

20 实施例 21 归纳：使用本发明的方法，可以很好地提取动物组织 RNA。

实验证明用 3M NaCl 水溶液、10M LiCl 水溶液或 13.5M LiCl 水溶液替代本实施例中 5M NaCl 水溶液，也可以获得高质量的 RNA。

### 实施例 22

从生物材料中分离纯化 RNA 的方法，包括如下步骤：

(1) 将新鲜的小鼠脾脏（京白 1 号，购自中国医学科学院血液学研究所）用生理盐水冲洗于一个 10ml 离心管中，然后将获得的细胞悬液平均分装于 5 个 1.5ml 离心管中，室温下 5000g 离心 10min，然后吸去液体，再次离心，吸去离心管中的残余液体，得到单细胞沉淀；在室温下，在 5 个 1.5ml 离心管加入 160  $\mu$ l 甲酰胺进行悬浮；

30 (2) 在室温下，在上面的 5 个 1.5ml 离心管加入 40  $\mu$ l 质量浓度比分别为 5%、10%、20%、30%、40% 十二烷基硫酸钠的甲酰胺溶液，悬浮，然后分别加入 50  $\mu$ l 5M NaCl 水溶液涡旋震荡混匀；然后将离心管 90℃ 下孵育 10 分钟，将离心管于室温下放置 2 分钟；

(3) - (4) 同实施例 6 步骤 (3) - (4)；

用 1ml 体积百分浓度为 70% 的乙醇水溶液，洗涤白色 RNA 沉淀，在室温，16000g 离心 10s，倒掉洗涤液后，干燥沉淀。加入 150 $\mu$ l 的注射用水（无 RNases 污染）溶解沉淀。

琼脂糖凝胶电泳：与实施例 1 中的琼脂糖凝胶电泳方法相同。

琼脂糖凝胶电泳分析结果：所得的 5 种 RNA 样品，其 28s rRNA 和 18s rRNA 条带边缘清晰、且两者亮度比例接近 2:1。

实施例 22 归纳：使用本发明的方法，可以很好地提取动物单细胞的 RNA。

实验证明，采用一次性用 200 $\mu$ l 甲酰胺替代本实施例中的步骤（1）和步骤（2）中所 5 用的甲酰胺和十二烷基硫酸钠的甲酰胺溶液，十二烷基硫酸钠的浓度做相应的改变，也可以获得高质量的 RNA。

实验证明，用本发明的方法并采用电动匀浆器对细胞进行破坏，也可以从植物的组织器官、真菌的组织器官、革兰氏阳性菌培养细胞、真菌培养细胞、植物培养细胞、血液细 10 胞或精液细胞获得高质量的 RNA。

实验证明，用本发明的方法及其衍生方法所获得的 RNA 也属于本发明的保护范围。

### 实施例 23

从生物材料中分离纯化 RNA 的方法，包括如下步骤：

（1）在冰上 5 个 Downtce 匀浆器中分别加入 2ml 4℃ 储存的甲酰胺溶液和 200mg 的新 15 鲜的杨树幼叶，并进行 20s、1min、5min、10min 和 20min 匀浆；

（2）-（4）同实施例 6；

用 1ml 体积百分浓度为 70% 的乙醇水溶液，洗涤白色 RNA 沉淀，在室温，16000g 离心 10s，倒掉洗涤液后，干燥沉淀。加入 150 $\mu$ l 的注射用水（无 RNases 污染）溶解沉淀。

分光光度计测定：与实施例 3 中的分光光度计测定方法相同。

20 分光光度计分析结果：20s、1min、5min、10min 和 20min 匀浆所 RNA 的得率为 1.2 $\mu$ g/mg，2.2 $\mu$ g/mg，2.8 $\mu$ g/mg，3.1 $\mu$ g/mg，3.2 $\mu$ g/mg。

归纳：组织匀浆越充分，得到的 RNA 的得率越高。

### 实施例 24

从生物材料中分离纯化 RNA 的方法，包括如下步骤：

（1）在冰上 1 个 Downtce 匀浆器中分别加入 2ml 4℃ 储存的甲酰胺溶液和 200mg 的新 25 鲜的杨树幼叶，并进行 5min 匀浆；

（2）在冰浴中的一个 1.5ml 离心管中，分别加入 30  $\mu$ l 13.5M LiCl 水溶液和 200  $\mu$ l 来自步骤（1）中的脱水生物样品，涡旋震荡混匀；然后将离心管 0℃ 冰浴中下孵育 12 小时；

30 （3）-（4）同实施例 6 步骤（3）-（4）；

用 1ml 体积百分浓度为 70% 的乙醇水溶液，洗涤白色 RNA 沉淀，在室温，16000g 离心 10s，倒掉洗涤液后，干燥沉淀。加入 150 $\mu$ l 的注射用水（无 RNases 污染）溶解沉淀。

琼脂糖凝胶电泳：与实施例 1 中的琼脂糖凝胶电泳方法相同。

琼脂糖凝胶电泳分析结果：所得的 RNA 样品，其 26ss rRNA 和 18s rRNA 条带边缘清 35 晰、且两者亮度比例接近 2:1。

归纳：低温长时间孵育，得到高质量的 RNA。

## 权利要求

1. 从生物材料中分离纯化 RNA 的方法，其特征是包括如下步骤：

(1) 用下述两种方法之一种制备脱水生物样品：

方法一：将组织器官加入到体积比为 1000: 0~1000 的甲酰胺与 3M-13.5M 单价阳离子盐水溶液的混合液中，在 0~25℃ 匀浆 5s~20min，得到脱水生物样品；所述组织器官和所述混合液的比例为 0.5~200mg: 1ml，所述组织器官为动物、植物或真菌的组织器官；

方法二：将单细胞沉淀中加入到体积比为 1000: 0~1000 的甲酰胺与 3M-13.5M 单价阳离子盐水溶液的混合液中，在 0~25℃ 悬浮或在 0~37℃ 匀浆 20s~20min，得到脱水生物样品；所述单细胞沉淀来自革兰氏阳性菌培养细胞、革兰氏阴性菌培养细胞、真菌培养细胞、动物培养细胞、植物培养细胞、血液细胞或精液细胞；

(2) 按体积比为 200: 0~200，将所述脱水生物样品与 3M-13.5M 单价阳离子盐水溶液混合或按体积比为 160: 50: 40 将所述脱水生物样品、3M-13.5M 单价阳离子盐水溶液和质量浓度为 5%-40% 的十二烷基硫酸钠的甲酰胺溶液混合，在 0~95℃ 孵育 0.5~120 min，在 0~40℃ 放置 0~10 min；

(3) 按体积比为 200: 400~1000 向步骤 (2) 获得的产物中加入起沉淀作用的 3.3M-5M 的单价阳离子盐水溶液，混匀，在 4~25℃ 下，2000~16000g 离心 0.15~30 min，将上清液倒入另一离心管中；

(4) 按体积比为 900: 300~800 的比例，向上清液中加入异丙醇，混匀，在 4~37℃ 下，2000~16000g 离心 1~30 min，倒掉上相液体、下相液体及介于上下两相之间的可见的残余杂质固体，得到位于离心管底部的白色 RNA 沉淀。

2. 根据权利要求 1 所述的从生物材料中分离纯化 RNA 的方法，其特征是所述还包括下述步骤：用体积百分浓度为 70%-80% 的乙醇水溶液洗涤白色 RNA 沉淀，在 4~37℃，2000~16000g 离心 10~60s，倒掉洗涤液后，干燥沉淀。

3. 根据权利要求 1 所述的从生物材料中分离纯化 RNA 的方法，其特征是所述组织器官和所述混合液的比例为 5~100mg:1ml。

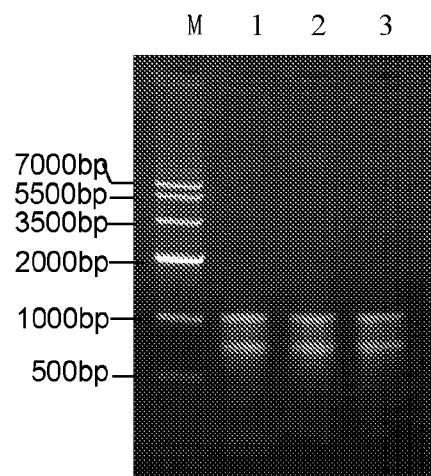
4. 根据权利要求 1 所述的从生物材料中分离纯化 RNA 的方法，其特征是所述单价阳离子盐为氯化锂、氯化钠和氯化钾至少一种。

5. 根据权利要求 4 所述的从生物材料中分离纯化 RNA 的方法，其特征是所述单价阳离子盐为氯化钠或氯化锂。

6. 根据权利要求 1 所述的从生物材料中分离纯化 RNA 的方法，其特征是所述起沉淀作用单价阳离子盐为氯化锂、氯化钠和氯化钾至少一种。

7. 根据权利要求 6 所述的从生物材料中分离纯化 RNA 的方法，其特征是所述起沉淀作用单价阳离子盐为氯化钠和氯化钾。

8. 根据权利要求 1 所述的从生物材料中分离纯化 RNA 的方法，其特征是所述步骤 (4) 为：按体积比为 700: 400~600 的比例，向上清液中加入异丙醇，混匀，在 20~25℃ 下，8000~12000g 离心 2 min，倒掉上相液体、下相液体及介于上下两相之间的可见的残余杂质固体，可得到位于离心管底部的白色 RNA 沉淀。



1. 2%琼脂糖凝胶电泳

图 1

甲酰胺溶液中的SDS浓度 (%)

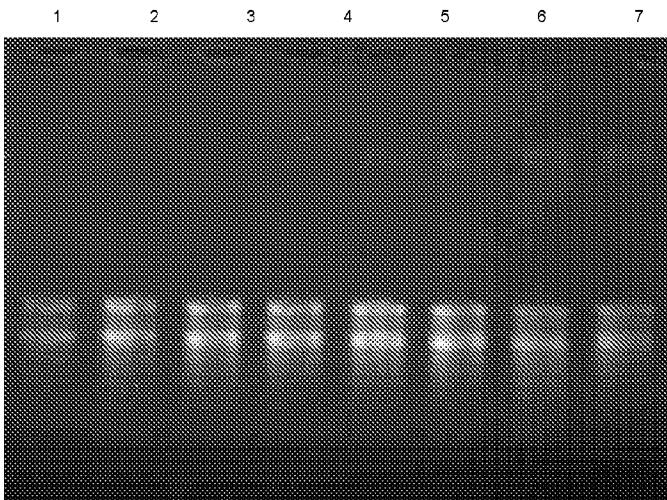


图 2-1

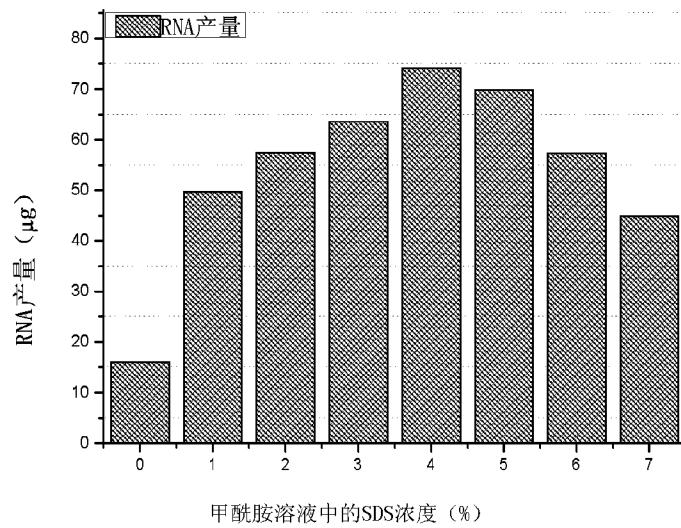


图 2-2

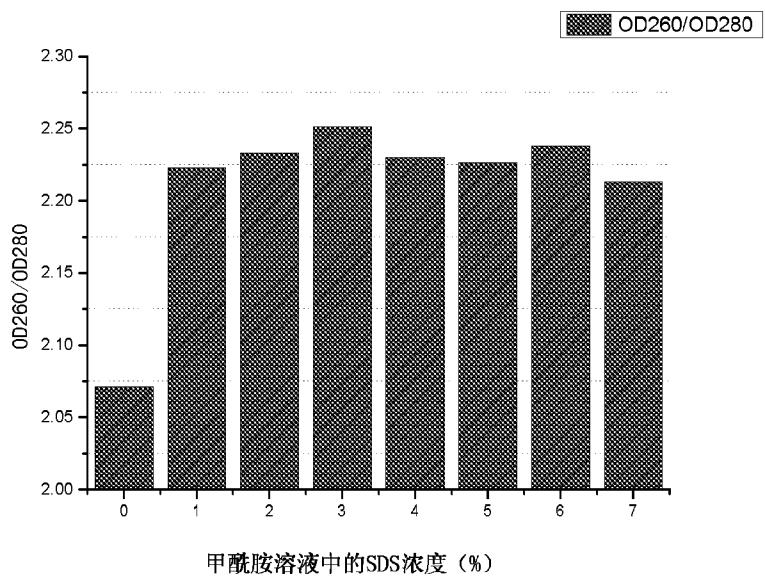


图 2-3

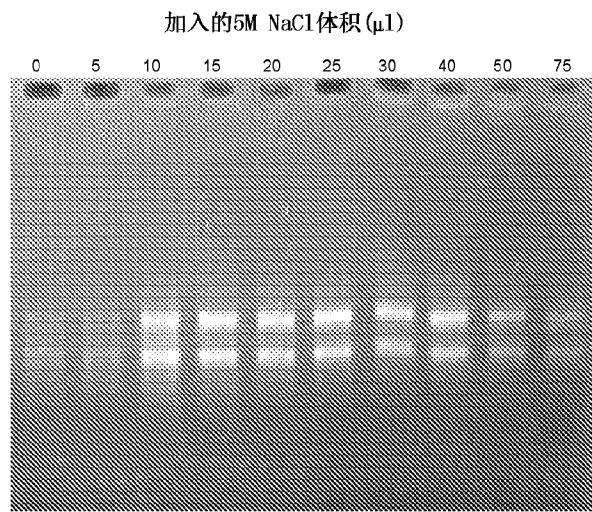


图 3-1

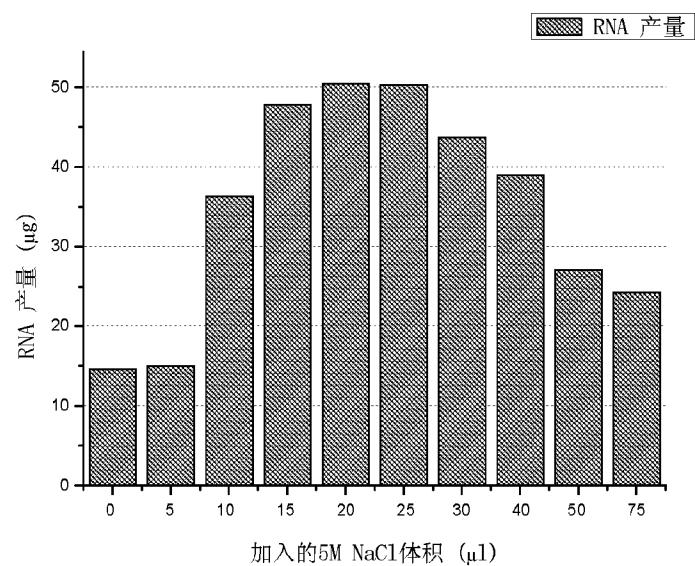


图 3-2

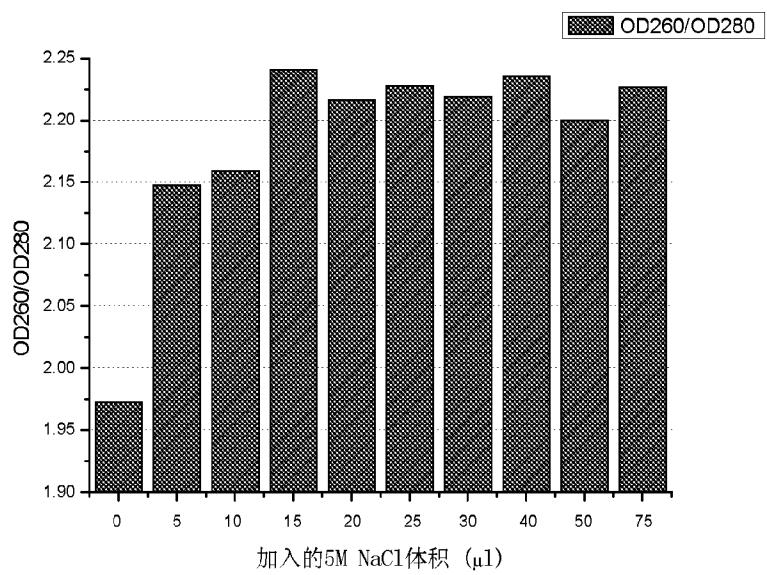


图 3-3

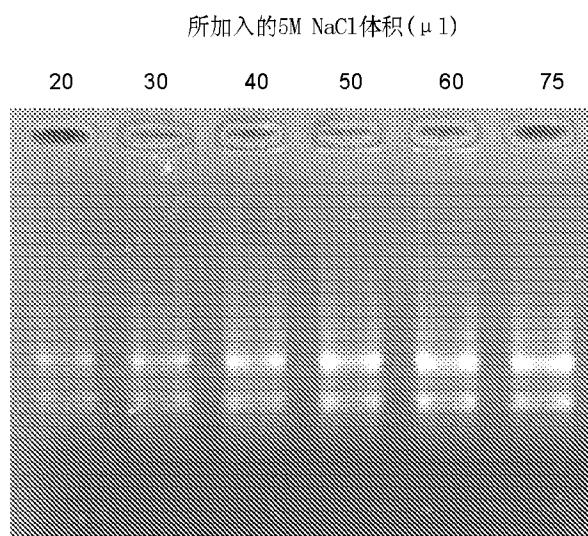


图 4-1

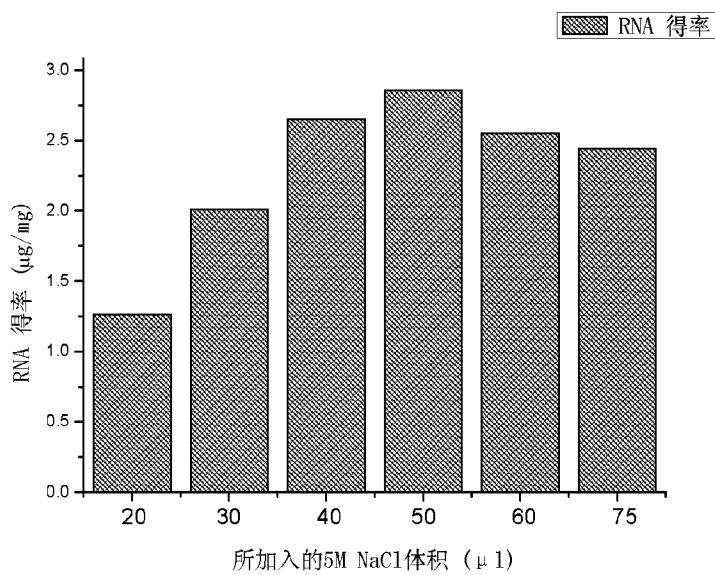


图 4-2

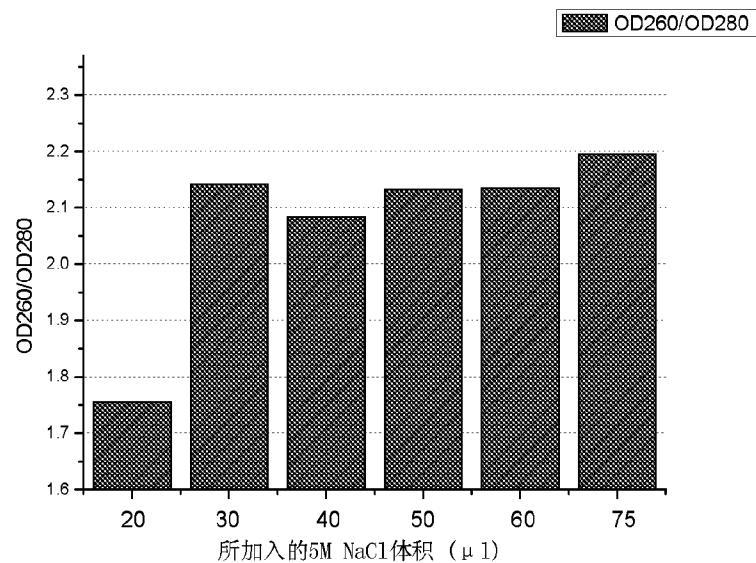


图 4-3

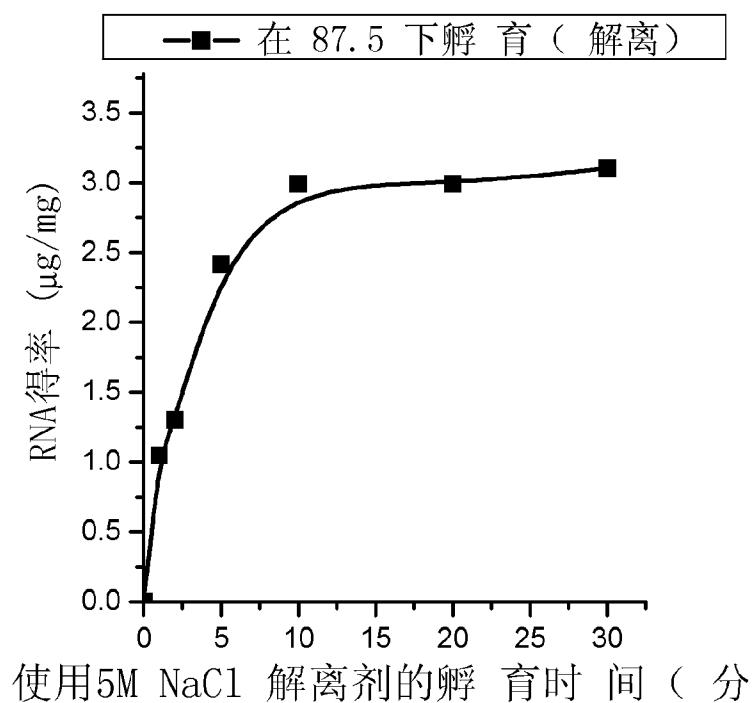


图 5

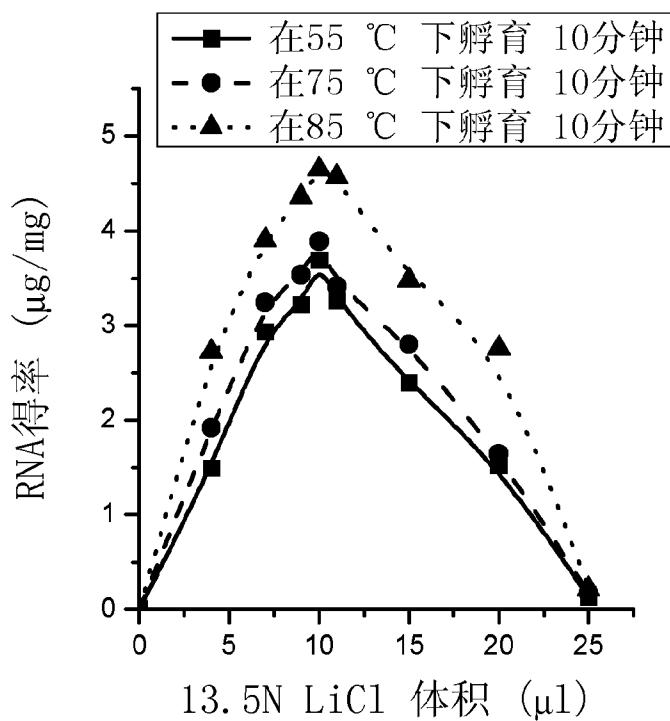
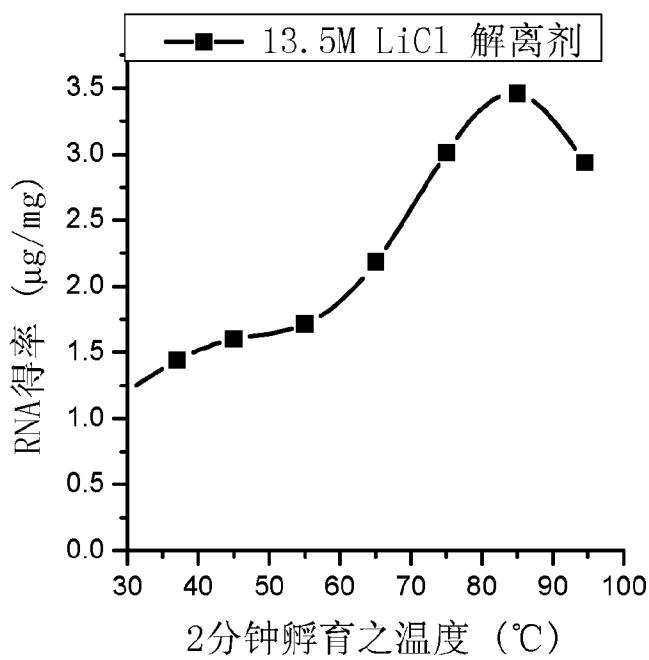
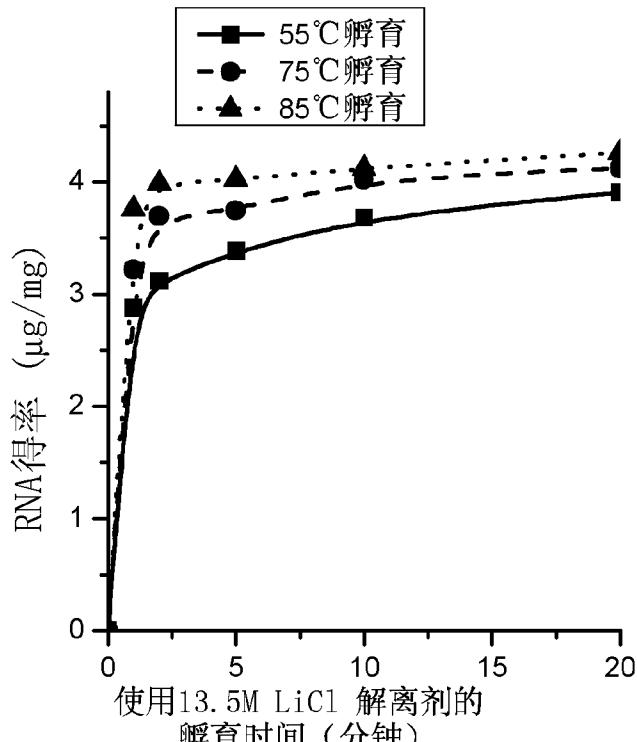


图 6



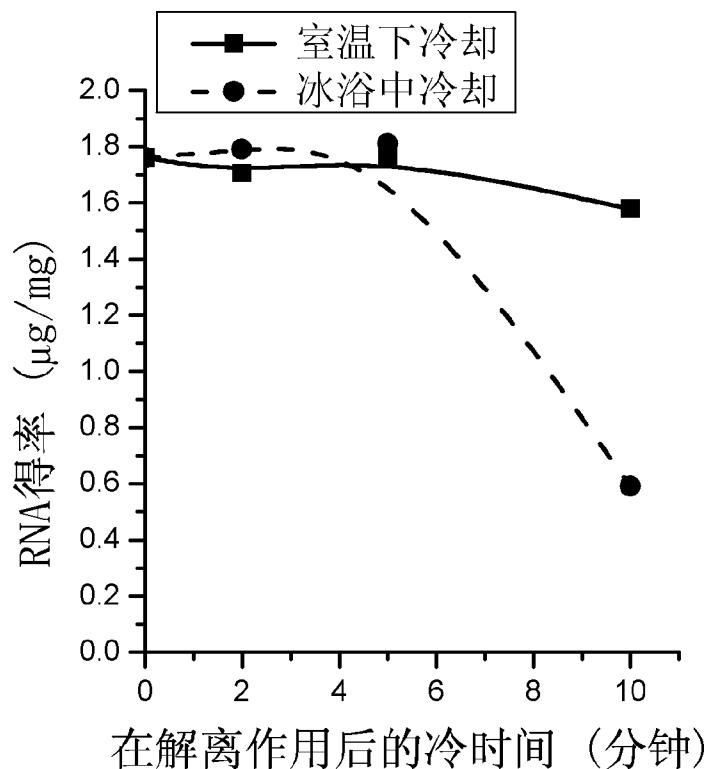


图 9

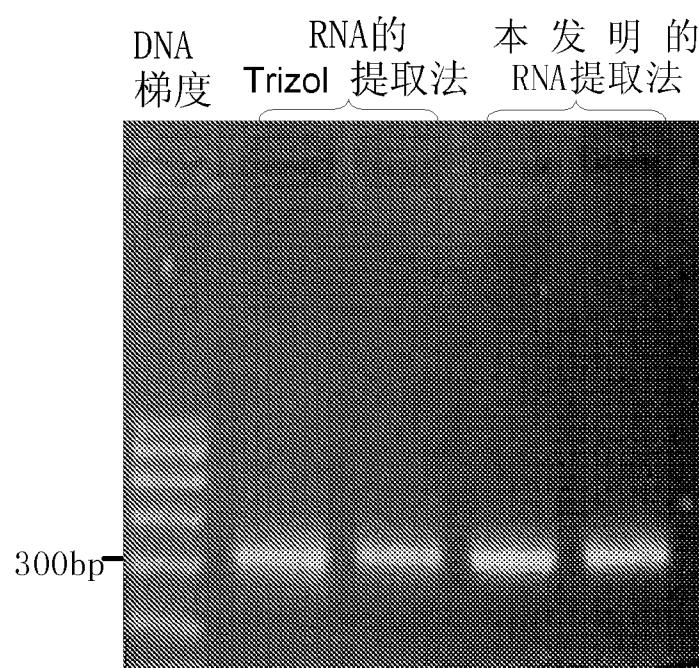


图 10

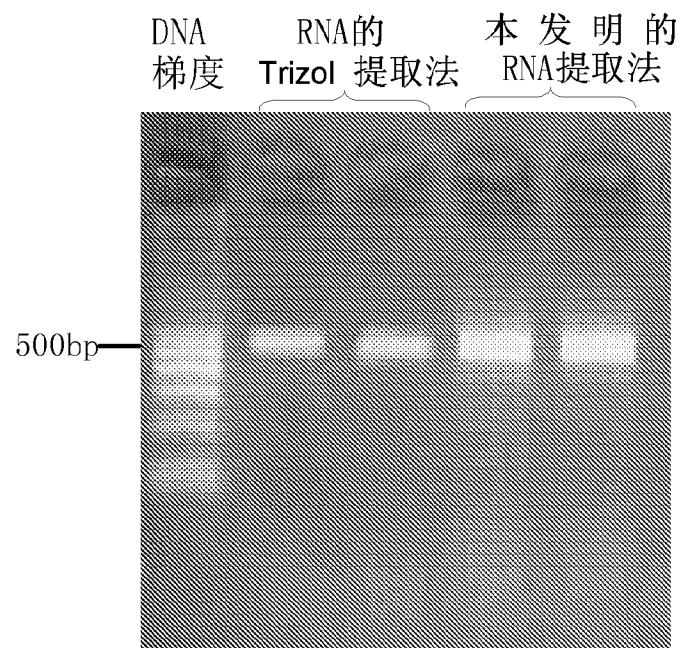


图 11

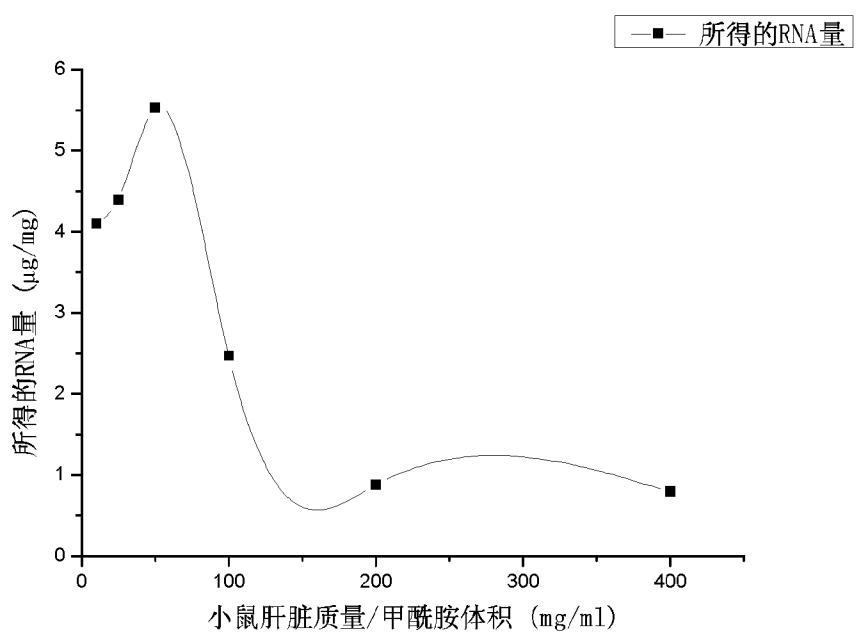


图 12

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/CN2012/071598**

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See the extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC:C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Databases: DWPI, SIPOABS, CNABS, CNTXT, ISI WEB OF KNOWLEDGE(BIOSIS, EMBASE, MEDLINE), CNKI

Search terms: RNA, Monovalent Cation?, sodium, potassium, lithium, Na, K, Li, formylamine, methanamide, formamide, isopropyl alcohol, isopropanol

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN102250876A(XUEJING LI), 23 Nov.2011(23.11.2011), see claims 1-8	1-8
A	JP6165676A(WAKO PURE CHEM IND LTD),14 Jun.1994(14.06.1994), see the whole document	1-8
A	ROBERT W.HOLLEY et al., A Simplified Procedure for the Preparation of Tyrosine-and Valine-Acceptor Fractions of Yeast "Soluble Ribonucleic Acid", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Vol.236, No.1, pp.200-202, 31 Jan.1961(31.01.1961), see the whole document	1-8
A	Mao Junting et al., Extraction and Stability Test of High Quality Total RNA in Duck Liver Tissues, Guizhou Agricultural Sciences, ISSN 1001-3601, Vol.37, No.9, pp.140-141, 31 Dec.2009(31.12.2009). see the whole document	1-8
A	Tang Zuhui et al., Method for Isolation of RNA From Monascus, Jiangxi Science, ISSN 1001-3679, Vol.20, No.2, pp.118-120, 30 Jun.2002(30.06.2002), see the whole document	1-8

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 07 May 2012(07.05.2012)	Date of mailing of the international search report 31 May 2012(31.05.2012)
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10)62019451	Authorized officer PAN, Junyu Telephone No. (86-10)62411086

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.  
**PCT/CN2012/071598**

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN102250876A	23.11.2011	None	
JP6165676A	14.06.1994	None	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

**PCT/CN2012/071598****A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

C12N15/10(2006.01)i

**A. 主题的分类**

见附加页

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

**B. 检索领域**

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: C12N

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

数据库: DWPI,SIPOABS,CNABS,CNTXT,ISI WEB OF KNOWLEDGE(BIOSIS, EMBASE, MEDLINE),CNKI

检索词: RNA, 甲酰胺, 单价阳离子, 一价阳离子, 钠, 钾, 锂, 异丙醇, Monovalent Cation?, sodium, potassium, lithium, Na, K, Li, formylamine, methanamide, formamide, isopropyl alcohol, isopropanol

**C. 相关文件**

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN102250876A(李学敬), 23. 11 月 2011(23.11.2011), 参见权利要求 1-8	1-8
A	JP6165676 A(WAKO PURE CHEM IND LTD), 14.6 月 1994(14.06.1994), 参见全文	1-8
A	ROBERT W. HOLLEY et al., A Simplified Procedure for the Preparation of Tyrosine- and Valine-Acceptor Fractions of Yeast "Soluble Ribonucleic Acid", THE JOURNAL OP BIOLOGICAL CHEMISTRY, 第236卷, 第1期, 第200—202页, 31.1月1961(31.01.1961), 参见全文	1-8
A	毛君婷等, 高质量鸭肝脏组织总 RNA 的提取及稳定性测试, 贵州农业科学, ISSN 1001-3601, 第 37 卷, 第 9 期, 第 140-141 页, 31.12 月 2009(31.12.2009), 参见全文	1-8
A	汤祖辉等, 红曲霉 RNA 的提取方法, 江西科学, ISSN 1001-3679, 第 20 卷, 第 2 期, 第 118-120 页, 30.6 月 2002 (30.06.2002), 参见全文	1-8

 其余文件在 C 栏的续页中列出。 见同族专利附件。

## \* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&amp;” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期 07.5 月 2012 (07.05.2012)	国际检索报告邮寄日期 <b>31.5 月 2012 (31.05.2012)</b>
ISA/CN 的名称和邮寄地址: 中华人民共和国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号: (86-10)62019451	受权官员 <b>潘俊宇</b> 电话号码: (86-10) <b>62411086</b>

**国际检索报告**  
关于同族专利的信息

**国际申请号  
PCT/CN2012/071598**

检索报告中引用的专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN102250876A	23.11.2011	无	
JP6165676 A	14.06.1994	无	

A 主题的分类:

C12N15/10(2006.01)i