



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101935648 A

(43) 申请公布日 2011. 01. 05

(21) 申请号 201010281633. 6

(22) 申请日 2010. 09. 13

(71) 申请人 原平皓(天津)生物技术有限公司

地址 300457 天津市开发区第四大街 80 号
天大科技园 B5

(72) 发明人 李艳萍

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 逯长明

(51) Int. Cl.

C12N 15/10(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 10 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种提取 RNA 的方法和试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及分子生物学领域,公开了一种提取 RNA 的方法和试剂盒。提取 RNA 的方法为样品与裂解液混匀,离心收集上清与 1/2 体积无水乙醇混匀,结合于 0.45 μm 玻璃纤维素膜后,用去蛋白液和漂洗液洗涤,最后洗脱吸附的 RNA。上述方法,还包括裂解细胞与助提剂混匀,离心去除多糖多酚类物质。提取 RNA 的试剂盒包括裂解液、去蛋白液、漂洗液、洗脱液,还包括助提剂。本发明所述方法简单快捷,不使用有毒试剂,适用范围广,加入助提剂有效去除多糖多酚类物质,分离高质量 RNA。本发明所述试剂盒不含有毒试剂、适用范围广,针对富含多糖多酚的植物材料提取 RNA 效果优于国外试剂盒,而且成本低,适用于广大的实验室和科研工作。

1. 一种提取 RNA 的方法,包括:

步骤 1:样品与裂解液混匀,离心,所述裂解液含有浓度为 10 ~ 50mmol/L,pH 值 6.5 ~ 8.0 的 Tris-HCl、3 ~ 5mol/L 异硫氰酸胍和 1% β -巯基乙醇;

步骤 2:取步骤 1 所得上清,与 1/2 体积 RNase-free 的无水乙醇混匀,与 0.45 μ m 玻璃纤维素膜结合;

步骤 3:用去蛋白液和漂洗液洗涤所述玻璃纤维素膜,所述去蛋白液含有浓度为 5 ~ 50mmol/L,pH 值 6.5 ~ 8.0 的 Tris-HCl、0.1 ~ 0.5mol/L 异硫氰酸胍和 5% ~ 20% 的无水乙醇,所述漂洗液含有浓度为 5 ~ 50mmol/L,pH 值 6.5 ~ 8.0 的 Tris-HCl、50 ~ 200mmol/L NaCl 和 50% ~ 80% 的无水乙醇;

步骤 4:洗脱所述玻璃纤维素膜上吸附的 RNA。

2. 根据权利要求 1 所述方法,其特征在于,所述裂解液含有浓度为 25mmol/L,pH 值 7.5 的 Tris-HCl、4mol/L 异硫氰酸胍和 1% β -巯基乙醇。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述方法,其特征在于,步骤 1 还包括所得上清与助提剂混匀,离心,所述助提剂含有浓度为 5 ~ 20% 的聚乙烯吡咯烷酮和 0.5 ~ 2% 的 Tween20。

4. 根据权利要求 3 所述的方法,其特征在于,所述助提剂含有浓度为 20% 的聚乙烯吡咯烷酮和 1% 的 Tween20。

5. 一种提取 RNA 的试剂盒,包括裂解液、去蛋白液、漂洗液,其中,所述裂解液含有浓度为 10 ~ 50mmol/L,pH 值 6.5 ~ 8.0 的 Tris-HCl、3 ~ 5mol/L 异硫氰酸胍和 1% β -巯基乙醇,所述去蛋白液含有浓度为 5 ~ 50mmol/L,pH 值 6.5 ~ 8.0 的 Tris-HCl、0.1 ~ 0.5mol/L 异硫氰酸胍和 5% ~ 20% 的无水乙醇,所述漂洗液含有浓度为 5 ~ 50mmol/L,pH 值 6.5 ~ 8.0 的 Tris-HCl、50 ~ 200mmol/L NaCl 和 50% ~ 80% 的无水乙醇。

6. 根据权利要求 5 所述试剂盒,其特征在于,还包括 0.45 μ m 玻璃纤维素膜。

7. 根据权利要求 5 或 6 所述试剂盒,其特征在于,所述裂解液含有浓度为 25mmol/L,pH 值 7.5 的 Tris-HCl、4mol/L 异硫氰酸胍和 1% β -巯基乙醇。

8. 根据权利要求 5-7 任意一项所述试剂盒,其特征在于,还包括助提剂,所述助提剂含有浓度为 5 ~ 20% 的聚乙烯吡咯烷酮和 0.5 ~ 2% 的 Tween20。

9. 根据权利要求 8 所述试剂盒,其特征在于,所述助提剂含有浓度为 20% 的聚乙烯吡咯烷酮和 1% 的 Tween20。

10. 根据权利要求 5-9 任意一项所述试剂盒,其特征在于,还包括洗脱液,所述洗脱液为 RNase-free 的低盐高 pH 值的溶液。

一种提取 RNA 的方法和试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及分子生物学领域,具体的说是涉及一种提取 RNA 的方法和试剂盒。

背景技术

[0002] 从组织中提取 RNA 是进行分子生物学方面研究的必要前提,提取纯度高、完整性好的 RNA 对于 Northern 杂交分析、mRNA 分离、体外翻译、cDNA 文库的构建、RT-PCR 分离基因、差异显示分析等研究都具有重要的意义。许多材料由于富含酚类化合物和多糖以及含有某些尚无法确定的次生代谢产物,使得这些材料 RNA 的有效分离纯化极其困难,因而阻碍了其分子生物学方面研究的进展。

[0003] 常用的 RNA 的提取方法有 TRIZOL 法、异硫氰酸胍法、CTAB-LiCl 法及国内外各生物公司的总 RNA 提取试剂盒等。RNA 提取的经典方法 TRIZOL 法,是一种基于异硫氰酸胍/苯酚/氯仿抽提原理的方法,该法适用范围广,动植物都适用,提取的 RNA 基本无基因组 DNA 的污染,但是该法操作步骤繁琐,提取试剂中使用了苯酚、氯仿等有毒试剂,而且该法不适用于富含多糖多酚材料 RNA 的提取。国外知名生物公司 Qiagen 的 RNeasy Plant Mini Kit 是一种专门针对植物材料进行 RNA 提取的试剂盒,该试剂盒采用的方法是基于异硫氰酸胍裂解的原理,该试剂盒对大部分植物材料都适用,具有提取速度快,纯度高,不使用有毒试剂等优点,但是针对动物材料、微生物材料 RNA 提取效果不理想,尤其是富含多糖的材料,由于多糖和 RNA 不容易分离很容易把吸附柱堵塞,从而造成 RNA 提取的失败。CTAB-LiCl 法常被用来提取富含多糖多酚材料 RNA 的提取,但是由于 CTAB 本身是一个与 SDS 功能相类似的试剂,尽管它可和 RNA 以及 DNA 形成不溶的复合物,有利于去除多糖,但 CTAB 法通常要结合其它操作,如再经 LiCl 沉淀等步骤,使得该法操作繁琐,并且在抽提时使用有毒试剂氯仿。

发明内容

[0004] 本发明目的是提供一种简单快捷、不使用有毒试剂,能从动物、植物和微生物等多种材料中提取高质量的 RNA 的方法。

[0005] 为实现本发明的目的,本发明采用如下技术方案:

[0006] 一种提取 RNA 的方法,包括:

[0007] 步骤 1:样品与裂解液混匀,离心,所述裂解液含有浓度为 10 ~ 50mmol/L, pH 值 6.5 ~ 8.0 的 Tris-HCl、3 ~ 5mol/L 异硫氰酸胍和 1% β -巯基乙醇;

[0008] 步骤 2:取步骤 1 所得上清,与 1/2 体积 RNase-free 的无水乙醇混匀,与 0.45 μ m 玻璃纤维素膜结合;

[0009] 步骤 3:用去蛋白液和漂洗液洗涤所述玻璃纤维素膜,所述去蛋白液含有浓度为 5 ~ 50mmol/L, pH 值 6.5 ~ 8.0 的 Tris-HCl、0.1 ~ 0.5mol/L 异硫氰酸胍和 5% ~ 20% 的无水乙醇,所述漂洗液含有浓度为 5 ~ 50mmol/L, pH 值 6.5 ~ 8.0 的 Tris-HCl、50 ~ 200mmol/L NaCl 和 50% ~ 80% 的无水乙醇;

[0010] 步骤4:洗脱所述玻璃纤维素膜上吸附的RNA。

[0011] 本发明所述提取RNA的方法,步骤1裂解液与样品混匀,为RNA的提取提供了最优的缓冲条件,所述裂解液含有浓度为10~50mmol/L, pH值6.5~8.0的Tris-HCl、3~5mol/L异硫氰酸胍和1% β -巯基乙醇,不含有毒试剂苯酚,既能强烈抑制RNase的活性,又能高效裂解细胞释放RNA。异硫氰酸胍属于解偶剂,是一类强力的蛋白质变性剂,可溶解蛋白质并使蛋白质二级结构消失,导致细胞结构降解,核蛋白迅速与核酸分离。

[0012] 其中,作为优选,所述裂解液含有浓度为25mmol/L, pH值7.5的Tris-HCl、4mol/L异硫氰酸胍和1% β -巯基乙醇。

[0013] 本发明所述提取RNA的方法,步骤1所得上清与1/2体积RNase-free的无水乙醇混匀后与0.45 μ m玻璃纤维素膜结合,乙醇能使RNA被选择性的结合在所述玻璃纤维素膜上,而蛋白、基因组DNA以及其他多糖多酚等代谢产物不结合在所述玻璃纤维素膜上。

[0014] 蛋白质是污染RNA样品的一个重要因素,要获得完整的、高质量的RNA就必须有效地去除蛋白杂质。常规方法大都采用苯酚、氯仿抽提去除蛋白质。本发明所述提取RNA的方法,步骤3利用去蛋白液和漂洗液去除结合在所述玻璃纤维素膜上的蛋白和其他杂质,所述去蛋白液含有浓度为5~50mmol/L、pH值6.5~8.0的Tris-HCl、0.1~0.5mol/L异硫氰酸胍和5%~20%的无水乙醇,所述漂洗液含有浓度为5~50mmol/L、pH值6.5~8.0的Tris-HCl、50~200mmol/L NaCl和50%~80%的无水乙醇。其中,去蛋白液能去除所述玻璃纤维素膜上吸附或未吸附的蛋白或其他杂质,漂洗液可以去除所述玻璃纤维素膜上吸附的蛋白和其他代谢产物如多糖、纤维素、脂类等杂质。

[0015] 其中,作为优选,所述去蛋白液含有浓度为10mmol/L、pH值7.5的Tris-HCl、0.3mol/L异硫氰酸胍和10%的无水乙醇。

[0016] 作为优选,所述漂洗液含有浓度为10mmol/L、pH值7.5的Tris-HCl、100mmol/L NaCl和80%的无水乙醇。

[0017] 本发明所述提取RNA的方法,步骤4洗脱所述玻璃纤维素膜上的RNA,可以用RNase-free的低盐高pH值的溶液洗脱RNA。

[0018] 其中,作为优选,用pH值为7.0~8.5的灭菌的0.1%的DEPC处理水或无核酸酶的无菌蒸馏水洗脱RNA。

[0019] 更优选地,用pH值为8.0的灭菌的0.1%的DEPC处理水或无核酸酶的无菌蒸馏水洗脱RNA。

[0020] 本发明还提供一种不含有苯酚、氯仿等有毒试剂,能从动物、植物和微生物等多种材料中提取高质量的RNA的试剂盒。

[0021] 一种提取RNA的试剂盒,包括裂解液、去蛋白液、漂洗液,其中,所述裂解液含有浓度为10~50mmol/L、pH值6.5~8.0的Tris-HCl、3~5mol/L异硫氰酸胍和1% β -巯基乙醇,所述去蛋白液含有浓度为5~50mmol/L、pH值6.5~8.0的Tris-HCl、0.1~0.5mol/L异硫氰酸胍和5%~20%的无水乙醇,所述漂洗液含有浓度为5~50mmol/L、pH值6.5~8.0的Tris-HCl、50~200mmol/L NaCl和50%~80%的无水乙醇。

[0022] 本发明所述提取RNA的试剂盒,所述裂解液为RNA的提取提供了最优的缓冲条件,既能强烈抑制RNase的活性,又能高效裂解细胞释放RNA。其中,作为优选,所述裂解液含有浓度为25mmol/L、pH值7.5的Tris-HCl、4mol/L异硫氰酸胍和1% β -巯基乙醇。

[0023] 本发明所述提取 RNA 的试剂盒,所述去蛋白液能去除所述玻璃纤维素膜上吸附或未吸附的蛋白或其他杂质。其中,作为优选,所述去蛋白液含有浓度为 10mmol/L、pH 值 7.5 的 Tris-HCl, 0.3mol/L 异硫氰酸胍和 10% 的无水乙醇。

[0024] 本发明所述提取 RNA 的试剂盒,所述漂洗液可以去除所述玻璃纤维素膜上吸附的蛋白和其他代谢产物如多糖、纤维素、脂类等杂质。其中,作为优选,所述漂洗液含有浓度为 10mmol/L、pH 值 7.5 的 Tris-HCl, 100mmol/L NaCl 和 80% 的无水乙醇。

[0025] 本发明所述提取 RNA 的试剂盒,还包括 0.45 μ m 玻璃纤维素膜,所述 0.45 μ m 玻璃纤维素膜在乙醇作用下可以选择性吸附 RNA。所述 0.45 μ m 玻璃纤维素膜可以固定于离心柱中,组成 0.45 μ m 玻璃纤维素膜吸附柱。

[0026] 本发明所述提取 RNA 的试剂盒,还包括洗脱液,所述洗脱液为 RNase-free 的低盐高 pH 值的溶液,能够把吸附在所述玻璃纤维素膜上的 RNA 洗脱下来。

[0027] 其中,作为优选,所述洗脱液为 pH 值为 7.0 ~ 8.5 的灭菌的 0.1% 的 DEPC 处理水或无核酸酶的无菌蒸馏水。

[0028] 更优选地,所述洗脱液为 pH 值为 8.0 的灭菌的 0.1% 的 DEPC 处理水或无核酸酶的无菌蒸馏水洗脱 RNA。

[0029] 许多材料富含酚类化合物、多糖以及某些尚无法确定的次生代谢产物,在完整的细胞内这些物质在空间上与核酸是分离的,但在提取 RNA 过程中,当组织被研磨、细胞破碎后,这些物质就会与 RNA 相互作用。酚类化合物被氧化后会与 RNA 不可逆地结合,导致 RNA 活性丧失;在用苯酚、氯仿抽提时 RNA 易丢失,或形成不溶性复合物;而多糖会形成难溶的胶状物,与 RNA 共沉淀下来;萜类化合物和 RNase 会分别造成 RNA 的化学降解和酶解。由于多糖多酚类物质与 RNA 相互作用,使得 RNA 的分离纯化极其困难,阻碍了其分子生物学方面研究的进展。

[0030] 因此本发明另一个目的是提供一种适用于富含多糖多酚和次生代谢产物材料的提取 RNA 的方法。

[0031] 一种提取 RNA 的方法,包括:

[0032] 步骤 1:样品与裂解液混匀,离心,上清中加入助提剂混匀,离心,所述裂解液含有浓度为 10 ~ 50mmol/L, pH 值 6.5 ~ 8.0 的 Tris-HCl、3 ~ 5mol/L 异硫氰酸胍和 1% β -巯基乙醇,所述助提剂含有浓度为 5 ~ 20% 的聚乙烯吡咯烷酮和 0.5 ~ 2% 的 Tween20;

[0033] 步骤 2:取步骤 1 所得上清,与 1/2 体积 RNase-free 的无水乙醇混匀,与 0.45 μ m 玻璃纤维素膜结合;

[0034] 步骤 3:用去蛋白液和漂洗液洗涤所述玻璃纤维素膜,所述去蛋白液含有浓度为 5 ~ 50mmol/L, pH 值 6.5 ~ 8.0 的 Tris-HCl、0.1 ~ 0.5mol/L 异硫氰酸胍和 5% ~ 20% 的无水乙醇,所述漂洗液含有浓度为 5 ~ 50mmol/L, pH 值 6.5 ~ 8.0 的 Tris-HCl、50 ~ 200mmol/L NaCl 和 50% ~ 80% 的无水乙醇;

[0035] 步骤 4:洗脱所述玻璃纤维素膜上吸附的 RNA。

[0036] 本发明在所述样品与裂解液混匀离心所得上清中加入助提剂混匀,所述助提剂含有浓度为 5 ~ 20% 的聚乙烯吡咯烷酮和 0.5 ~ 2% 的 Tween20,能和核酸中的多糖多酚特异性结合,离心后能最大限度的去除多糖多酚类物质,从而有效地从富含多糖多酚和次生代谢产物的材料中分离到高质量的 RNA。其中,作为优选,所述助提剂含有浓度为 20% 的聚乙

烯吡咯烷酮和 1% 的 Tween20。

[0037] 本发明通过分别采用经典 TRIZOL 法、异硫氰酸胍 / β -巯基乙醇裂解法和本发明所述提取 RNA 的方法提取禾本科绿草、芦荟、牡丹、红宝石花、松针、冬青材料中的 RNA, 发现本发明所述提取 RNA 的方法针对富含多糖多酚的植物材料提取 RNA 的效果明显优于经典 TRIZOL 法和异硫氰酸胍 / β -巯基乙醇裂解法。

[0038] 本发明还提供一种适用于富含多糖多酚和次生代谢产物的材料提取 RNA 的试剂盒。

[0039] 一种提取 RNA 的试剂盒, 包括裂解液、助提剂、去蛋白液、漂洗液, 其中, 所述裂解液含有浓度为 10 ~ 50mmol/L、pH 值 6.5 ~ 8.0 的 Tris-HCl, 3 ~ 5mol/L 异硫氰酸胍和 1% β -巯基乙醇, 所述助提剂含有浓度为 5 ~ 20% 的聚乙烯吡咯烷酮和 0.5 ~ 2% 的 Tween20, 所述去蛋白液含有浓度为 5 ~ 50mmol/L、pH 值 6.5 ~ 8.0 的 Tris-HCl, 0.1 ~ 0.5mol/L 异硫氰酸胍和 5% ~ 20% 的无水乙醇, 所述漂洗液含有浓度为 5 ~ 50mmol/L、pH 值 6.5 ~ 8.0 的 Tris-HCl, 50 ~ 200mmol/L NaCl 和 50% ~ 80% 的无水乙醇。

[0040] 本发明所述提取 RNA 的试剂盒, 所述助提剂含有浓度为 5 ~ 20% 的聚乙烯吡咯烷酮和 0.5 ~ 2% 的 Tween20, 能够与核酸中的多糖多酚特异性结合, 离心后能最大限度的去除多糖多酚类物质, 从而有效地从富含多糖多酚和次生代谢产物的材料中分离得到高质量的 RNA。其中, 作为优选, 所述助提剂含有浓度为 20% 的聚乙烯吡咯烷酮和 1% 的 Tween20。

[0041] 本发明所述提取 RNA 的方法简单快捷, 不使用有毒试剂、适用范围广, 除了应用于植物材料 RNA 提取外, 同样适用于动物组织、丝状真菌、细菌 RNA 的提取。本发明所述提取 RNA 的方法, 在裂解细胞中加入助提剂能有效地从富含多糖多酚和次生代谢产物的材料中分离得到高质量的 RNA。本发明所述提取 RNA 的试剂盒不含有毒试剂、适用范围广, 针对富含多糖多酚的植物材料提取 RNA 时效果优于国外 RNA 提取试剂盒, 而且成本低, 适用于广大的实验室和科研工作。

附图说明

[0042] 图 1 示按照本发明实施例 4 所述提取 RNA 的方法, 从植物、细菌、酵母、动物材料中提取的 RNA 的 1% 琼脂糖凝胶电泳图; 泳道 1-5 的被检测物质分别为从仙人掌、JM109 大肠杆菌、酵母 AH109 菌株、小鼠肝脏组织、小鼠肾脏组织中提取的 RNA。

[0043] 图 2 示按照经典 TRIZOL 法、异硫氰酸胍 / β -巯基乙醇裂解法 (Qiagen 方法) 和本发明实施例 7 所述提取 RNA 的方法, 从禾本科绿草、芦荟、牡丹、红宝石花、松针、冬青材料中提取的 RNA 的 1% 琼脂糖凝胶电泳图;

[0044] 泳道 1、4、7、10、13、16 的被检测物质分别为按照 TRIZOL 法从绿草、芦荟、牡丹、红宝石花、松针、冬青植物材料中提取的 RNA;

[0045] 泳道 2、5、8、11、14、17 的被检测物质分别为按照异硫氰酸胍 / β -巯基乙醇裂解法 (Qiagen 方法) 从绿草、芦荟、牡丹、红宝石花、松针、冬青植物材料中提取的 RNA;

[0046] 泳道 3、6、9、12、15、18 的被检测物质分别为按照本发明实施例 7 所述提取 RNA 的方法从绿草、芦荟、牡丹、红宝石花、松针、冬青植物材料中提取的 RNA。

[0047] 图 3 示按照本发明实施例 7 所述提取 RNA 的方法, 从丝状真菌中提取的 RNA 的 1% 琼脂糖凝胶电泳图。

具体实施方式

[0048] 本发明实施例公开了一种提取 RNA 的方法和试剂盒。本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明。本发明的方法和产品已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和产品进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0049] 为实现本发明的目的,本发明采用如下技术方案:

[0050] 本发明所述简单快捷、不使用有毒试剂,能从动物、植物和微生物等多种材料中提取高质量的 RNA 的方法,包括:

[0051] 步骤 1:样品与裂解液混匀、离心,以去除未裂解的细胞残渣。所述裂解液含有浓度为 10 ~ 50mmol/L、pH 值 6.5 ~ 8.0 的 Tris-HCl, 3 ~ 5mol/L 异硫氰酸胍和 1% β -巯基乙醇;

[0052] 步骤 2:吸取步骤 1 离心后所得上清,与 1/2 体积 RNase-free 的无水乙醇混匀,加入到 0.45 μ m 玻璃纤维素膜吸附柱中,离心,弃流出液;

[0053] 步骤 3:吸附柱中加入去蛋白液,离心弃流出液,然后吸附柱中加入漂洗液,离心弃流出液,然后再离心以去除残留的乙醇,所述去蛋白液含有浓度为 5 ~ 50mmol/L、pH 值 6.5 ~ 8.0 的 Tris-HCl, 0.1 ~ 0.5mol/L 异硫氰酸胍和 5% ~ 20% 的无水乙醇,所述漂洗液含有浓度为 5 ~ 50mmol/L、pH 值 6.5 ~ 8.0 的 Tris-HCl, 50 ~ 200mmol/L NaCl 和 50% ~ 80% 的无水乙醇;

[0054] 步骤 4:在吸附柱中加入洗脱液,室温放置,离心,收集流出液即为所提植物 RNA,所述洗脱液为 RNase-free 的低盐高 pH 值的溶液。

[0055] 本发明所述不含有苯酚、氯仿等有毒试剂,能从动物、植物和微生物等多种材料中提取高质量的 RNA 的试剂盒,包括裂解液、去蛋白液、漂洗液,其中,所述裂解液含有浓度为 10 ~ 50mmol/L、pH 值 6.5 ~ 8.0 的 Tris-HCl, 3 ~ 5mol/L 异硫氰酸胍和 1% β -巯基乙醇,所述去蛋白液含有浓度为 5 ~ 50mmol/L、pH 值 6.5 ~ 8.0 的 Tris-HCl, 0.1 ~ 0.5mol/L 异硫氰酸胍和 5% ~ 20% 的无水乙醇,所述漂洗液含有浓度为 5 ~ 50mmol/L、pH 值 6.5 ~ 8.0 的 Tris-HCl, 50 ~ 200mmol/L NaCl 和 50% ~ 80% 的无水乙醇。

[0056] 其中,作为优选,所述试剂盒还包括 0.45 μ m 玻璃纤维素膜和洗脱液,所述洗脱液为 RNase-free 的低盐高 pH 值的溶液。

[0057] 本发明所述适用于富含多糖多酚和次生代谢产物材料的提取 RNA 的方法,包括:

[0058] 步骤 1:样品与裂解液混匀,离心,上清中加入助提剂混匀,离心,所述裂解液含有浓度为 10 ~ 50mmol/L、pH 值 6.5 ~ 8.0 的 Tris-HCl, 3 ~ 5mol/L 异硫氰酸胍和 1% β -巯基乙醇,所述助提剂含有浓度为 5 ~ 20% 的聚乙烯吡咯烷酮和 0.5 ~ 2% 的 Tween20;

[0059] 步骤 2:吸取步骤 1 离心后所得上清,与 1/2 体积 RNase-free 的无水乙醇混匀,加入到 0.45 μ m 玻璃纤维素膜吸附柱中,离心,弃流出液;

[0060] 步骤 3:吸附柱中加入去蛋白液,离心弃流出液,然后吸附柱中加入漂洗液,离心弃流出液,然后再离心以去除残留的乙醇,所述去蛋白液含有浓度为 5 ~ 50mmol/L、pH 值 6.5 ~ 8.0 的 Tris-HCl, 0.1 ~ 0.5mol/L 异硫氰酸胍和 5% ~ 20% 的无水乙醇,所述漂洗液

含有浓度为 5 ~ 50mmol/L、pH 值 6.5 ~ 8.0 的 Tris-HCl, 50 ~ 200mmol/L NaCl 和 50% ~ 80% 的无水乙醇;

[0061] 步骤 4: 在吸附柱中加入洗脱液, 室温放置, 离心, 收集流出液即为所提植物 RNA, 所述洗脱液为 RNase-free 的低盐高 pH 值的溶液。

[0062] 本发明所述适用于富含多糖多酚和次生代谢产物的材料提取 RNA 的试剂盒, 包括裂解液、助提剂、去蛋白液、漂洗液, 其中, 所述裂解液含有浓度为 10 ~ 50mmol/L、pH 值 6.5 ~ 8.0 的 Tris-HCl, 3 ~ 5mol/L 异硫氰酸胍和 1% β -巯基乙醇, 所述助提剂含有浓度为 5 ~ 20% 的聚乙烯吡咯烷酮和 0.5 ~ 2% 的 Tween20, 所述去蛋白液含有浓度为 5 ~ 50mmol/L、pH 值 6.5 ~ 8.0 的 Tris-HCl, 0.1 ~ 0.5mol/L 异硫氰酸胍和 5% ~ 20% 的无水乙醇, 所述漂洗液含有浓度为 5 ~ 50mmol/L、pH 值 6.5 ~ 8.0 的 Tris-HCl, 50 ~ 200mmol/L NaCl 和 50% ~ 80% 的无水乙醇。

[0063] 其中, 作为优选, 所述试剂盒还包括 0.45 μ m 玻璃纤维素膜和洗脱液, 所述洗脱液为 RNase-free 的低盐高 pH 值的溶液。

[0064] 本发明所述提取 RNA 的方法简单快捷, 不使用有毒试剂, 适用范围广, 除了应用于植物材料 RNA 的提取外, 同样适用于动物组织、丝状真菌、细菌 RNA 的提取。本发明所述提取 RNA 的方法, 在裂解细胞中加入助提剂能有效地从富含多糖多酚和次生代谢产物的材料中分离得到高质量的 RNA。本发明所述提取 RNA 的试剂盒不含有毒试剂、适用范围广, 针对富含多糖多酚的植物材料提取 RNA 时效果优于国外 RNA 提取试剂盒, 而且成本低, 适用于广大的实验室和科研工作。

[0065] 为了进一步理解本发明, 下面结合实施例对本发明提取 RNA 的方法和试剂盒进行详细说明。

[0066] 实施例 1: 本发明所述提取 RNA 的试剂盒

[0067] 本发明所述提取 RNA 的试剂盒包括裂解液、去蛋白液、漂洗液。

[0068] 裂解液含有 3M 的异硫氰酸胍、10mM pH 值为 6.5 的 Tris-HCl、1% 的 β -巯基乙醇。具体配制方法为: 称取异硫氰酸胍 35.45g, 加入足够的 RNase-free 蒸馏水进行充分溶解, 然后加入 pH 为 6.5、浓度为 1M 的 Tris-HCl 1.0ml, 充分混匀, 定容到 99ml, 加入 1ml β -巯基乙醇。

[0069] 去蛋白液含有 0.1M 的异硫氰酸胍、5mM pH 值为 7.5 的 Tris-HCl、5% 的无水乙醇。称取 1.18g 异硫氰酸胍, 加入 RNase-free 的蒸馏水充分溶解, 然后加入 pH 为 6.5、浓度为 1M 的 Tris-HCl 0.5ml, 最后加入 10ml RNase-free 的无水乙醇, 定容到 100ml, 充分混匀。

[0070] 漂洗液含有 5mM 的 pH 值为 6.5 的 Tris-HCl、50mM 的 NaCl、50% 的无水乙醇。量取 pH 值为 6.5、浓度为 1M 的 Tris-HCl 0.5ml, 再量取 5M 的 NaCl 1ml, 加入适量的 RNase-free 的蒸馏水混匀, 再加入 50ml 的 RNase-free 的无水乙醇, 定容到 100ml, 充分混匀。

[0071] 实施例 2: 本发明所述提取 RNA 的试剂盒

[0072] 本发明所述提取 RNA 的试剂盒包括裂解液、去蛋白液、漂洗液, 洗脱液和玻璃纤维素膜。其中, 裂解液含有 5M 的异硫氰酸胍、50mM pH 值为 8.0 的 Tris-HCl、1% 的 β -巯基乙醇; 去蛋白液含有 0.5M 的异硫氰酸胍、50mM pH 值为 8.0 的 Tris-HCl、20% 的无水乙醇; 漂洗液含有 20mM 的 pH 值为 8.0 的 Tris-HCl、200mM 的 NaCl、80% 的无水乙醇; 洗脱液为 pH 值 8.0 灭菌的 0.1% 的 DEPC 处理水; 玻璃纤维素膜为 0.45 μ m, Whatman 公司, GF/B 型。配

置方法同实施例 1。

[0073] 实施例 3:本发明所述提取 RNA 的试剂盒

[0074] 本发明所述提取 RNA 的试剂盒包括裂解液、去蛋白液、漂洗液,洗脱液和玻璃纤维素膜吸附柱。其中,裂解液含有 4M 的异硫氰酸胍、25mM pH 值为 7.5 的 Tris-HCl、1% 的 β -巯基乙醇;去蛋白液含有 0.3M 的异硫氰酸胍、10mM pH 值为 7.5 的 Tris-HCl、10% 的无水乙醇;漂洗液含有 10mM 的 pH 值为 7.5 的 Tris-HCl、100mM 的 NaCl、80% 的无水乙醇;洗脱液为 pH 值 7.5 无核酸酶的无菌蒸馏水;玻璃纤维素膜吸附柱为 0.45 μ m 玻璃纤维素膜,Whatman 公司,GF/B 型,1.5mL 离心柱。配置方法同实施例 1。

[0075] 实施例 4:本发明所述提取 RNA 的方法

[0076] 用实施例 3 所述试剂盒提取 RNA。样品加入裂解液,充分混匀,室温放置 5min 使其充分裂解,然后 12,000rpm 离心 10min 以去除未裂解的细胞残渣。吸取离心后的上清,加入上清 1/2 体积 RNase-free 的无水乙醇,充分混匀。加入到玻璃纤维素膜吸附柱中,12,000rpm 离心 30s,弃流出液。吸附柱中加入去蛋白液,12,000rpm 离心 30s,弃流出液。然后吸附柱中加入漂洗液,12,000rpm 离心 30s,弃流出液。再加入漂洗液洗涤一次,弃流出液,然后再 12,000rpm 离心 2min 以去除残留的乙醇。转移吸附柱到一个干净的 RNase-free 的离心管中,在吸附柱中加入洗脱液,室温放置 1min,12,000rpm 离心 1min,收集流出液。收集的流出液再加入到吸附柱中重复洗脱一次,收集流出液,流出液即为所提植物 RNA。

[0077] 实施例 5:本发明所述提取 RNA 的试剂盒

[0078] 本发明所述提取 RNA 的试剂盒包括裂解液、助提剂、去蛋白液、漂洗液,洗脱液和玻璃纤维素膜吸附柱。其中,裂解液含有 4M 的异硫氰酸胍、25mM pH 值为 7.5 的 Tris-HCl、1% 的 β -巯基乙醇;助提剂含有 20% 的聚乙烯吡咯烷酮和 1% 的 Tween20;去蛋白液含有 0.3M 的异硫氰酸胍、10mM pH 值为 7.5 的 Tris-HCl、10% 的无水乙醇;漂洗液含有 10mM 的 pH 值为 7.5 的 Tris-HCl、100mM 的 NaCl、80% 的无水乙醇;洗脱液为 pH 值 7.5 无核酸酶的无菌蒸馏水;玻璃纤维素膜吸附柱为 0.45 μ m 玻璃纤维素膜,Whatman 公司,GF/B 型,1.5mL 离心柱。助提剂具体配制方法为:称取 2 克聚乙烯吡咯烷酮(PVP10),加蒸馏水进行充分溶解,然后用尖端剪除 0.5cm 的吸头吸取 100 μ l 的 Tween20,充分搅拌混匀,定容到 10ml。其他试剂配置方法同实施例 1。

[0079] 实施例 6:本发明所述提取 RNA 的试剂盒

[0080] 本发明所述提取 RNA 的试剂盒包括裂解液、助提剂、去蛋白液、漂洗液,洗脱液和玻璃纤维素膜。其中,裂解液含有 3M 的异硫氰酸胍、25mM pH 值为 8.0 的 Tris-HCl、1% 的 β -巯基乙醇;助提剂含有 10% 的聚乙烯吡咯烷酮和 2% 的 Tween20;去蛋白液含有 0.3M 的异硫氰酸胍、10mM pH 值为 8.0 的 Tris-HCl、10% 的无水乙醇;漂洗液含有 10mM 的 pH 值为 8.0 的 Tris-HCl、100mM 的 NaCl、50% 的无水乙醇;洗脱液为 pH 值 8.0 灭菌的 0.1% 的 DEPC 处理水;玻璃纤维素膜为 0.45 μ m 玻璃纤维素膜,Whatman 公司,GF/B 型。配置方法同实施例 4。

[0081] 实施例 7:本发明所述提取 RNA 的方法

[0082] 用实施例 5 所述试剂盒提取 RNA。样品加入裂解液和助提剂,充分混匀,室温放置 5min 使其充分裂解,然后 12,000rpm 离心 10min 以去除未裂解的细胞残渣。吸取离心后的上清,加入上清 1/2 体积 RNase-free 的无水乙醇,充分混匀。加入到玻璃纤维素膜吸附柱

中,12,000rpm 离心 30s,弃流出液。吸附柱中加入去蛋白液,12,000rpm 离心 30s,弃流出液。然后吸附柱中加入漂洗液,12,000rpm 离心 30s,弃流出液。再加入漂洗液洗涤一次,弃流出液,然后再 12,000rpm 离心 2min 以去除残留的乙醇。转移吸附柱到一个干净的 RNase-free 的离心管中,在吸附柱中加入洗脱液,室温放置 1min,12,000rpm 离心 1min,收集流出液。收集的流出液再加入到吸附柱中重复洗脱一次,收集流出液,流出液即为所提植物 RNA。

[0083] 实施例 8:本发明所述提取 RNA 的方法提取仙人掌 RNA

[0084] 参照实施例 4 所述方法,用实施例 3 所述试剂盒提取仙人掌 RNA。称取 0.1g 仙人掌,迅速剪成小块分别放入研钵中,加入 1ml 裂解液,室温下迅速研磨成匀浆,室温放置 5min 后,室温离心 10min 后取上清,在上清液中加入 1/2 体积的 RNase-free 的无水乙醇,充分混匀;把混合液加入到玻璃纤维素膜吸附柱中,12,000rpm 离心 30s,弃流出液;在吸附柱中加入 500 μ l 去蛋白液,室温放置 2min,12,000rpm 离心 30s,弃流出液;在吸附柱中加入 500 μ l 漂洗液,12,000rpm 离心 30s,弃流出液,重复漂洗一次,再 12,000rpm 离心 2min;转移吸附柱到一个干净的 RNase-free 的离心管中,在吸附柱的中间部位加入 100 μ l 洗脱液,室温放置 1min,12,000rpm 离心 1min,收集的流出液再加入到吸附柱中重复洗脱一次,收集流出液,流出液即为所提仙人掌的总 RNA。1%琼脂糖凝胶电泳检测,结果如图 1 所示。

[0085] 实施例 9:本发明所述提取 RNA 的方法提取细菌 RNA

[0086] 参照实施例 4 所述方法,用实施例 3 所述试剂盒提取细菌 RNA。离心收集 1-2ml 大肠杆菌菌液 ($10^8 \sim 10^9$ 细胞) 到一个 1.5ml 离心管,尽可能去除上清,在细胞沉淀中加入 100 μ l 含有 1mg/ml 溶菌酶的 TE,37℃温育 15min,期间每隔 5min 涡旋振荡一次;加入 350 μ l 裂解液,充分涡旋混匀,12,000rpm 离心 3min,转移上清到一个新离心管,再加入上清 1/2 体积 RNase-free 的无水乙醇,充分混匀;把混合液加入到玻璃纤维素膜吸附柱中,12,000rpm 离心 30s,弃流出液;在吸附柱中加入 500 μ l 去蛋白液,室温放置 2min,12,000rpm 离心 30s,弃流出液;在吸附柱中加入 500 μ l 漂洗液,12,000rpm 离心 30s,弃流出液,重复漂洗一次,再 12,000rpm 离心 2min;转移吸附柱到一个干净的 RNase-free 的离心管中,在吸附柱的中间部位加入 100 μ l 洗脱液,室温放置 1min,12,000rpm 离心 1min,收集的流出液再加入到吸附柱中重复洗脱一次,收集流出液,流出液即为所提细菌的总 RNA。1%琼脂糖凝胶电泳检测,结果如图 1 所示。

[0087] 实施例 10:本发明所述提取 RNA 的方法提取酵母 RNA

[0088] 参照实施例 4 所述方法,用实施例 3 所述试剂盒提取酵母 RNA。收集 1ml (约 10^7 细胞) 处于对数生长期的酵母培养物到 1.5ml 离心管中,9,000rpm 离心 30s,尽可能去除上清,加入 100 μ l 缓冲液 SE (1M 山梨醇,0.1M Na_2EDTA ,14mM β -巯基乙醇),轻柔吹打充分重悬细胞;根据酵母量加入约 50U lyticase,充分颠倒混匀,37℃温育 10-30min 消化细胞壁,中间可颠倒数次帮助消化,然后加入 350 μ l 裂解液剧烈涡旋吹打混匀,12,000rpm 离心 3min,转移上清到一个新离心管,加入上清 1/2 体积 RNase-free 的无水乙醇,立即吹打混匀;把混合液加入到玻璃纤维素膜吸附柱中,12,000rpm 离心 30s,弃流出液;在吸附柱中加入 500 μ l 去蛋白液,室温放置 2min,12,000rpm 离心 30s,弃流出液;在吸附柱中加入 500 μ l 漂洗液,12,000rpm 离心 30s,弃流出液,重复漂洗一次,再 12,000rpm 离心 2min;转移吸附柱到一个干净的 RNase-free 的离心管中,在吸附柱的中间部位加入 100 μ l 洗脱液,室温放置 1min,12,000rpm 离心 1min,收集的流出液再加入到吸附柱中重复洗脱一次,收集

流出液,流出液即为所提酵母的总 RNA。1%琼脂糖凝胶电泳检测,结果如图 1 所示。

[0089] 实施例 11:本发明所述提取 RNA 的方法提取小鼠肝脏和肾脏 RNA

[0090] 参照实施例 4 所述方法,用实施例 3 所述试剂盒提取小鼠肝脏和肾脏 RNA。称取小鼠肾脏或肝脏组织 0.1g,在液氮中迅速研磨成细粉,把研磨好的细粉转入到装有 350 μ l 裂解液的 1.5ml 离心管中,涡旋振荡成匀浆液,将匀浆液 12,000rpm 离心 3min,转移上清到一个新离心管,加入上清 1/2 体积 RNase-free 的无水乙醇,此时可能出现沉淀,但是不影响提取过程,立即吹打混匀;把混合液加入到玻璃纤维素膜吸附柱中,12,000rpm 离心 30s,弃流出液;在吸附柱中加入 500 μ l 去蛋白液,室温放置 2min,12,000rpm 离心 30s,弃流出液;在吸附柱中加入 500 μ l 漂洗液,12,000rpm 离心 30s,弃流出液,重复漂洗一次,再 12,000rpm 离心 2min;转移吸附柱到一个干净的 RNase-free 的离心管中,在吸附柱的中间部位加入 100 μ l 洗脱液,室温放置 1min,12,000rpm 离心 1min,收集的流出液再加入到吸附柱中重复洗脱一次,收集流出液,流出液即为所提肾脏组织的总 RNA。1%琼脂糖凝胶电泳检测,结果如图 1 所示。

[0091] 实施例 12:本发明所述提取 RNA 的方法提取富含多糖多酚次生代谢产物的材料 RNA

[0092] 参照实施例 7 所述方法,用实施例 5 所述试剂盒提取富含多糖多酚次生代谢产物的材料 RNA。称取 0.1g 新鲜的绿草、芦荟、牡丹、红宝石花、松针、冬青等植物各三份,迅速剪成小块分别放入研钵中,第一份用实施例 7 所述方法提取 RNA,加入 1ml 裂解液和 100 μ l 助提剂,室温下迅速研磨成匀浆,第二份加入 1ml 经典 Trizol 试剂直接研磨成匀浆,第三份加入 1ml 异硫氰酸胍/ β -巯基乙醇裂解法的裂解液直接研磨成匀浆。室温放置 5min 后,经典 TRIZOL 法和异硫氰酸胍/ β -巯基乙醇裂解法按照常规的操作步骤进行 RNA 的提取。第三份用实施例 7 所述方法提取 RNA,在上清液中加入 1/2 倍体积的 RNase-free 的无水乙醇,充分混匀;把混合液加入到玻璃纤维素膜吸附柱中,12,000rpm 离心 30s,弃流出液;在吸附柱中加入 500 μ l 去蛋白液,室温放置 2min,12,000rpm 离心 30s,弃流出液;在吸附柱中加入 500 μ l 漂洗液,12,000rpm 离心 30s,弃流出液,重复漂洗一次,12,000rpm 离心 2min;转移吸附柱到一个干净的 RNase-free 的离心管中,在吸附柱的中间部位加入 100 μ l 洗脱液,室温放置 1min,12,000rpm 离心 1min,收集的流出液再加入到吸附柱中重复洗脱一次,收集流出液,流出液即为所提各种材料的总 RNA。1%琼脂糖凝胶电泳检测,结果如图 2 所示。

[0093] 实施例 13:本发明所述提取 RNA 的方法提取丝状真菌 RNA

[0094] 参照实施例 7 所述方法,用实施例 5 所述试剂盒提取丝状真菌 RNA。称取 0.1g 丝状真菌菌丝,在液氮中迅速研磨成细粉,把研磨好的细粉转入到装有 500 μ l 裂解液的 1.5ml 离心管中,加入 50 μ l 助提剂,涡旋振荡成匀浆液,将匀浆液 12,000rpm 离心 3min,转移上清到一个新离心管,加入上清 0.5 倍体积的 RNase-free 的无水乙醇,立即吹打混匀;把混合液加入到玻璃纤维素膜吸附柱中,12,000rpm 离心 30s,弃流出液;在吸附柱中加入 500 μ l 去蛋白液,室温放置 2min,12,000rpm 离心 30s,弃流出液;在吸附柱中加入 500 μ l 漂洗液,12,000rpm 离心 30s,弃流出液,重复漂洗一次,再 12,000rpm 离心 2min;转移吸附柱到一个干净的 RNase-free 的离心管中,在吸附柱的中间部位加入 100 μ l 洗脱液,室温放置 1min,12,000rpm 离心 1min,收集的流出液再加入到吸附柱中重复洗脱一次,收集流出液,流出液即为所提丝状真菌菌丝的总 RNA。1%琼脂糖凝胶电泳检测,结果如图 3 所示。

[0095] 以上实施例的说明只是用于帮助理解本发明的方法及其核心思想。应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以对本发明进行若干改进和修饰,这些改进和修饰也落入本发明权利要求的保护范围内。

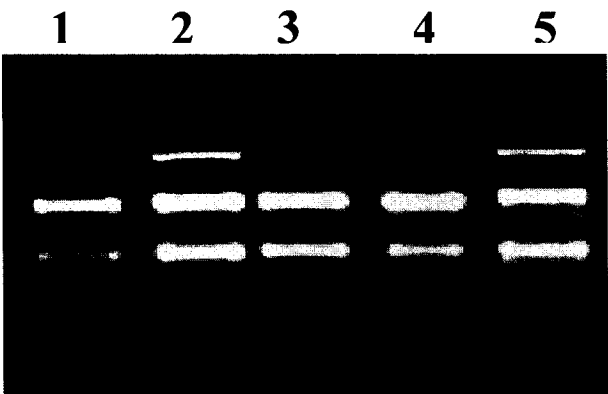


图 1

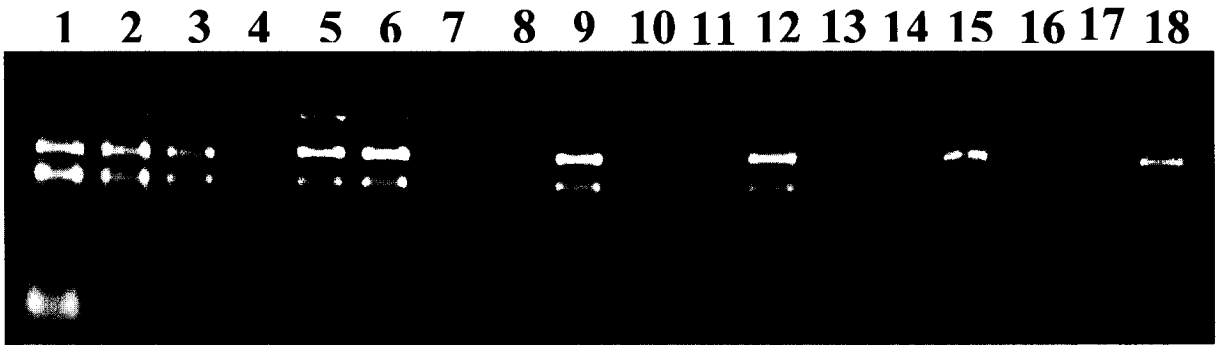


图 2



图 3