

提取 RNA

一、实验目的

将两块六孔板中的T24细胞株及低、中、高耐药T24-RC48细胞株用TRIzol试剂处理，提取RNA，为后续qPCR提供材料基础。

二、实验内容

2.1 实验设计 提取总RNA，向细胞加TRIzol裂解，加氯仿离心分层，取上清加异丙醇沉淀，75%乙醇洗涤，晾干后加RNase-free水溶解。

2.2 样本类型 T24野生型细胞株、低/中/高耐药T24-RC48.

2.3 测定原理。 TRIzol法提取RNA的原理基于试剂中的苯酚和异硫氰酸胍作为强变性剂迅速裂解细胞，释放RNA并抑制内源性RNase活性，阻止RNA降解；苯酚则促进蛋白质变性沉淀。加入氯仿后，通过离心形成三相体系——上层水相(含RNA)、中间层(变性蛋白)及下层有机相(含DNA和脂质)。在酸性条件下，RNA选择性溶解于水相。随后用异丙醇沉淀RNA，经乙醇洗涤去除盐分后即可获得高纯度RNA。

三、材料与试剂

3.1 材料 枪头、1.5ml 离心管：均购自Axygen公司。

移液器：购自Eppendorf公司。

冰盒，2ml EP管，人膀胱移行细胞癌株(T24)

低/中/高度耐药株(笔误), T24-RC48细胞株

3.2 试剂 PBS: 购自美国 Gibco 公司。

TRIzol 试剂: 购自 Thermo Fisher 公司。

异丙醇、75% 乙醇均购自 Sensi Chemi-carb 公司。氯仿。

四、实验仪器 通风橱, 震荡仪

台式常温低速离心机: 购自 Eppendorf 公司

分光光度计: 购自 Thermo Fisher Scientific 公司。

五、实验步骤

5.1 将 T24 细胞株及低、中、高耐药 T24RC48 株接种于两块六孔板(每孔 2ml)

5.2 从 37°C 恒温箱中取出两块六孔板, 放置于通风橱中, 同时置于冰上。

5.3 用移液枪移取 1ml PBS 分别加入实验组八孔中, 轻晃、清洗, 重复 2 遍。

5.4 向每孔中加入 500μl TRIzol reagent 裂解细胞, 搅打直至无明显结块, 再吸取正、低、中、高耐药细胞到编号分别为“正”“低”“中”“高”的 4 支 1ml EP 管中。

5.5 分别向 4 支 EP 管中加入 1/5 TRIzol reagent + 体积的氯仿(三氯甲烷)进行萃取, 震荡仪上震荡 15s, 充分乳化。

5.6 震荡后室温静置 5min, 12000g 4°C 离心 15min, 此时溶液明显分为三层, 上层为水相, 中层为蛋白, 下层为有机相。

5.7 小心吸取上层水相, 200μl * 2 / 每管(吸取部分即可, 不要触及中间层)置于新 EP 管。

5.8 向 EP 管中加入等体积预冷异丙醇, 轻轻混匀, 室温静置 15min 以析出沉淀。

5.9 12000g 4℃离心10min,弃上清,加入1ml预冷的75%乙醇清洗沉淀2次。

5.10 12000g 4℃离心5min,弃上清,离心管室温干燥,让残留的乙醇挥发。

5.11 干燥后的沉淀溶于20μl RNase free水中,放置冰上。

5.12 上机定量RNA浓度与纯度。

六、实验操作照片

图1 加入



#	样品名称	ng/μL	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
1	i 样品 1	719.7	1.91
2	i 样品 2	1302.8	1.93
3	i 样品 3	1015.1	1.91
4	i 样品 4	1115.4	1.92
5	i 样品 5	967.1	1.93

八、结果分析

图2 RNA 定量结果

本次实验基本达到预期,成功实现细胞RNA提取。操作规范,误差小:实验成功获取经 TRIzol试剂处理的细胞样本,从外观上看,处理后样本呈现出均匀的裂解状态,未观察明显杂质或团块。离心后再经裂解、萃取等步骤提取适量RNA样本,为后续 qPCR 提供材料基础。

然而,在实验中也发现一些可改进之处。如: TRIzol试剂的用量和离心数可通过后续RNA质量检测进一步优化。后续将根据这些分析对实验进行改进和完善。