

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间：2025 年 6 月 20 日 18:00 — 2025 年 6 月 20 日 24:00

18.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 实验提供材料基础。

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。规范操作可获高质量 RNA，用于后续分子生物学研究，若操作不当，如 RNA 降解等，会影响实验准确性与可靠性。

2.2 样本类型

T24 野生型细胞株、低/中/高度耐药 T24-RC48 细胞株。

2.3 测定原理

TRIzol 法提取 RNA 的原理基于试剂中苯酚和异硫氰酸胍的协同作用：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，防止 RNA 降解；苯酚则促使蛋白质变性沉淀。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。该方法通过化学变性、相分离和选择性沉淀实现了 RNA 的高效分离与纯化。

三、材料与试剂

3.1 材料

枪头、15ml 离心管：均购自 Axygen 公司

移液器：购自 Eppendorf 公司

冰盒

2ml EP 管

人膀胱移行细胞癌细胞株（T24）

低/中/高度耐药 T24-RC48 细胞株

3.2 试剂

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 6 月 20 日 18:00 — 2025 年 6 月 20 日 24:00

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 Chemical 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 T24-RC48 细胞株接种于两块六孔板中, 每种细胞接种 2 孔。

5.2 从 37°C 恒温箱中取出两板六孔板, 放置在通风橱中, 同时置于冰上。

5.3 用移液枪移取 1ml PBS 分别加入实验组八个孔中, 轻轻摇晃、清洗, 重复两遍。

5.4 向每孔中加入 500 μ l TRIzol reagent 裂解细胞, 吹打直至无明显结块, 再吸取正、低、中、高耐药细胞到编号分别为“正”“低”“中”“高”的 4 个 2ml EP 管中。

5.5 分别向 4 个 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, 200 μ l *2/每管(吸取部分即可, 不要触及中间蛋白层)置于新 EP 管中。

5.8 向 EP 管中加入等体积预冷的异丙醇, 颠倒混匀, 室温静置 15min 以析出沉淀。

5.9 12000g 4°C 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°C 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 20 μ l RNase free 水中, 放置冰上。

5.12 上机定量 RNA 浓度与纯度。

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 6 月 20 日 18:00 — 2025 年 6 月 20 日 24:00

六、实验操作照片



图 1 加入异丙醇离心后观察沉淀

七、实验结果

实验所提取的 RNA 浓度均大于 700ng/μl，A260/A280 值均在 1.9-2.1 之间。

#	样品名称	ng/μL	A260/A280
1	样品 1	719.7	1.91
2	样品 2	1302.8	1.93
3	样品 3	1015.1	1.91
4	样品 4	1115.4	1.92
5	样品 5	967.1	1.93

图 2 RNA 定量结果

八、结果分析

本次实验基本达到了预期目的，成功实现了细胞的 RNA 提取。实验流程规范，操作误

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间：2025 年 6 月 20 日 18:00 — 2025 年 6 月 20 日 24:00

差较小：实验成功获取了经 TRIzol 试剂处理的细胞样本，从外观上看，处理后的样本呈现出均匀的裂解状态，未观察到明显的细胞团块或杂质残留。经过离心操作，样本分层清晰，分为三层，上层为水相，中层为蛋白，下层为有机相，符合预期的裂解分离效果。再经过裂解，萃取，析出，洗涤等步骤提取到适量 RNA 样本。提取的 RNA 样本浓度适中，纯度较高，为后续 RNA 的逆转录提取提供了良好材料基础。

然而，在实验过程中也发现一些可改进之处。例如，TRIzol 试剂的用量和离心参数虽符合常规操作，但可通过后续 RNA 质量检测进一步优化，以提高 RNA 提取效率和质量。后续将依据这些分析对实验进行改进和完善。