

DNA-Free 的总 RNA 提取技术

简介

由于 DNA 与 RNA 的相似性，在 RNA 纯化产物中总是会或多或少存在基因组 DNA 污染。对 Northern 杂交，cDNA 文库构建等应用，微量的基因组 DNA 污染并不会影响到实验结果，但是在 RT-PCR 或定量 RT-PCR 中，痕量的基因组 DNA 污染都可能会带来假阳性或干扰定量的结果，这是因为污染的 DNA 和反转录的 cDNA(RT) 都会成为 PCR 的模板，因此去除 RNA 产物中基因组 DNA 污染在定量 RT-PCR 等相关表达分析中有着极其重要的意义。目前彻底去除基因组 DNA 最为可靠的方法是采用 DNase I 消化。由于 DNase 很容易变性，高温(65°C)，低浓度的表面活性剂(SDS, CTAB)，盐离子(NaCl, 盐酸胍)都会抑制或变性 DNase，使之失活。目前 DNase 只能在 RNA 纯化后，才能加入 DNase 消化去除 DNA。消化后还需进一步纯化去除 DNase 和降解的 DNA。这种做法不仅复杂，而且很容易引起 RNA 降解和产量的损失。Magen 公司 HiPure Total RNA Plus Kits 系列采用硅胶柱纯化方式和独特的 DNase 膜上消化方法，可快速地从培养细胞，动物组织，细菌中快速提取无 DNA 污染总 RNA。独特的 DNase 膜上消化方式可允许在 RNA 纯化前插入 DNase 消化。消化后再加入洗涤液洗涤去除 Dnase 和降解的 DNA 片段，最后再洗脱出 RNA。整个过程无需接触酚氯仿，也可需用到异丙醇沉淀，在 40 分钟就可完成多个样品的抽提工作。得到的 RNA 无 DNA 污染，无 DNase 污染，可直接 RT-PCR 和荧光定量 RT-PCR。该产品系列包括：

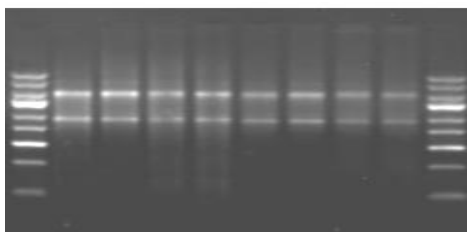
名称	样品类型
HiPure Total RNA Plus Kit	动物软组织和细胞
HiPure Total RNA Micro Plus Kit	动物软组织和细胞
HiPure Total RNA 96 Plus Kit	动物软组织和细胞
HiPure Fibrous RNA Plus Kit	难裂解组织样品
AllPure FFPE RNA Plus Kit	石蜡包埋组织样品

实验结果

1. 从常规样品和 gDNA-Rich 的样品提取 RNA

取 10mg 常规样品(鸡肝，鸡肾)和 gDNA-Rich 样品(鸡肾,鸡肺)，用 HiPure Total RNA Plus Kit 进行提取，提取后用 1.0%琼脂糖凝胶电泳分析(结果如下)。由电泳图可知，使用试剂盒得到的 RNA 在电泳时检测不到基因组 DNA 污染，RNA 完整不发生降解。

M | 鸡肝 | 鸡肾 | 鸡肾 | 鸡肺 | M



M: CL5000 DNA Marker

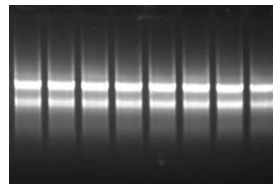
取纯化的 RNA 用 Nanodrop 2000 测量 OD 读数，结果如下。由数据可知，使用 HiPure Total RNA Plus Kit 得到的 RNA 纯度高，OD260/OD280=2.0-2.1, OD260/230=1.8-2.5, RNA 得率高。

样品	浓度 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	260/280	260/230	产量 μg
Liver	0.219	2.1	1.98	43.8
	0.205	2.11	1.72	41
Kidney	0.0634	2.16	2.41	12.68
	0.0629	2.15	2.47	12.58
Spleen	0.0698	2.11	1.27	13.96
	0.0654	2.09	2.18	13.08
Lung	0.0294	2.15	1.85	5.88
	0.029	2.13	1.74	5.8

2. DNA 污染情况

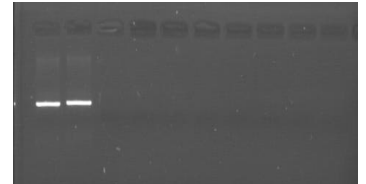
取较大的组织样品：鸡心（20mg），鸡肝（20mg），鸡脾（15mg），鸡肺（20mg）用 HiPure Total RNA Plus Kit 进行提取，提取时插入 DNase 进行膜上消化，最后用 DEPC 水洗脱出 RNA。取 1 μg RNA 作为 PCR 模板，扩增 B-actin 基因以检测是否存在 DNA 污染。结果表明，处理 15-20mg 富含基因组 DNA 样品（鸡肝，鸡脾，鸡肺）时，得到的 RNA 都可以彻底去除 DNA 的污染。

鸡心 鸡肝 鸡脾 鸡肺



(RNA 电泳图)

阳性 鸡心 鸡肝 鸡脾 鸡肺



(RNA 直接 PCR 结果)

3. Total RNA 荧光 RT-PCR 定量结果

取纯化的 RNA 进行梯度稀释后(1 μg , 0.1 μg , 0.01 μg , 0.001 μg)，用一步法荧光定量 RT-PCR 试剂盒检测 B-actin 的基因的结果。结果表明，纯化的 RNA 梯度曲线理想，不存在抑制因子。