

抽取冷凍組織 RNA 作業流程

一、設備

- 1.低溫離心機 (Eppendorf Centrifuge 5415 R)
- 2.陶珠型組織均質機 (MagNA Lyser instrument)
- 3.超微量分光光度計 (Thermo Nanodrop 2000)
- 4.-80°C 冰箱
- 5.純水系統(Milli-Q® Integral)
- 6.微量吸管 (pipetman)
- 7.化學排煙櫃 (chemical hood)
- 8.微量電子天平(JADEVER SKY300)
- 9.微波爐
- 10.軌道型震盪器(LAB.ROTATOR ANALOG-TYPE 2800A)
- 11.多功能凝膠成像系統(Alphamager HP)
12. 迷你電泳槽 (Mini Gel Migration Through)

二、試劑

1. TRIzol™ Reagent (PRO TECH Cat no.15596018)
2. 氯仿 (chloroform)
3. 100%異丙醇 (100% isopropanol)
4. 75%乙醇 (75% EtOH)
5. 滅過菌的二次水(ddH₂O)簡稱二次水(ddH₂O)
6. UltraPure™ TAE Buffer, 10X (Thermo Cat no.15558042)
7. 瓊脂凝膠粉末 Agarose-Molecular Biology Grade(Invitrogen Cat no.75510-019)
8. 溴化乙錠(EtBr)

三、耗材

- 1.1.5ml 微量離心管(Eppendorf)
- 2.陶珠型微量離心管 (MagNA Lyser Green Beads)
- 3.乾冰
- 4.1L 滅過菌的血清瓶
- 5.量筒(50ml 及 1L)
- 6.秤藥紙(12X12)
- 7.藥勺
- 8.500ml 滅過菌三角錐型瓶
- 9.保鮮膜
- 10.保冰桶
- 11.保麗龍箱
- 12.filter tip(1000ul、200ul、10ul)

五、抽取 RNA (全程需在化學排煙櫃(chemical hood)裡進行)

1. 準備 1 管陶珠型微量離心管(MagNA Lyser Green Beads)及 2 支 1.5ml 微量離心管 (Eppendorf)，分別在蓋子及側邊寫上編號。
2. 用 1ml 微量吸管 (pipetman)吸取 1 ml Trizol 加入已寫好編號的陶珠型微量離心管 (MagNA Lyser Green Beads)中，放置於裝有碎冰的保冰桶裡。
3. 從 -80°C 冰箱取出裝有冷凍組織的微量離心管(eppendorf)，並放置於裝有乾冰的保麗龍箱內。
4. 冷凍組織不能解凍，且迅速倒入裝有 Trizol 陶珠型微量離心管(MagNA Lyser Green Beads)中，Trizol 一定要蓋過組織。上下搖晃，放置於裝有碎冰的保冰桶裡。
5. 將陶珠型微量離心管(MagNA Lyser Green Beads)放入陶珠型組織均質機(MagNA Lyser instrument)，以 6500 rpm 40 秒，打碎組織，最多打到五次。

注意：如有需進行一次以上的打碎，則每完成一次就要放置在裝有碎冰的保冰桶裡降溫 2-3 分鐘後，再進行下一次。

6. 用 1ml 微量吸管(pipetman)吸取陶珠型微量離心管(MagNA Lyser Green Beads)中的全部組織均質液至第 1 支新的微量離心管(eppendorf)，室溫靜置 5 分鐘。
7. 加入 200 ul 氯仿 (chloroform)，上下搖晃 15 秒，室溫靜置 2 分鐘。
8. 放入預冷的低溫離心機(4°C)中，12,000 xg 離心，15 分鐘。
9. 取上清液並移至第 2 支新的微量離心管(eppendorf)中。
注意：上清液只要吸約八成即可，不可吸到下層沉澱物。
10. 加入 500 ul 100%異丙醇(100% isopropanol)，上下倒置均勻，室溫靜置 15 分鐘。
11. 放入預冷的低溫離心機(4°C)中，12,000 xg 離心，10 分鐘。
12. 倒掉 100%異丙醇(100% isopropanol)，留下片狀沉澱物(pellet)。
13. 放入預冷的低溫離心機(4°C)中，12,000 xg 離心，20 秒，再用 200ul 微量吸管 (pipetman)將殘留的 100% 異丙醇(100% isopropanol)吸乾淨。
14. 加入 1 ml 75%乙醇(75% EtOH)於微量離心管(Eppendorf)中。
15. 放入預冷的低溫離心機(4°C)中，7,500 xg 離心，5 分鐘。
16. 倒掉 75%乙醇(75% EtOH)，留下片狀沉澱物(pellet)。
17. 放入預冷的低溫離心機(4°C)中，7,500 xg 離心，20 秒，再用 200ul 微量吸管(pipetman)將殘留的 75% 乙醇 (75% EtOH)吸乾淨，空氣中乾燥(air dry) 3 - 5 分鐘。
18. 依據片狀沉澱物(pellet)大小加入 60~120 ul 滅過菌的二次水(ddH₂O)回溶片狀沉澱物 (pellet)。
19. 使用超微量分光光度計(Nanodrop)測濃度及 260/280、260/230 的 O.D 值。(OD260 值 ÷ OD280 值 = 應介於 1.8-2.0)。

六、進行水平電泳以鑑定 RNA 品質

一、製作瓊脂凝膠(2%gel)

- (1) 配製 1X TAE Buffer:以 1L 量筒將 100ml UltraPure™ TAE Buffer(10X)倒入 1L 血清瓶中，再加入 900ml 的二次水(ddH₂O)，上下搖晃，混合均勻，存放於室溫。
- (2) 以 50ml 的量筒將 30ml 的 1X TAE Buffer 倒入已滅菌的三角錐型瓶裡

(3) 秤藥紙放置微量電子天平秤中歸零，以藥勺舀取 **Agarose(瓊脂凝膠粉末) 0.3g**，倒入裝有 **1X TAE Buffer** 的三角錐型瓶混合。

(4) 將三角錐型瓶蓋上保鮮膜，以 **filter tip** 將保鮮膜戳多個小洞，放進微波爐，微波 **30** 秒，然後加以搖晃均勻。

注意：此步驟需要重覆至瓊脂凝膠粉末(Agarose)完全溶解於 1X TAE Buffer 中，呈現完全透明才行。(至少重複三次)

(5) 將裝有混合均勻的瓊脂凝膠(**Agarose**)溶液從微波爐取出，放置軌道型震盪器，**3** 分鐘。

(6) 用 **2ul** 微量吸管(**pipetman**)吸取 **0.3ul EtBr** 加入三角錐型瓶中，混合均勻。

(7) 倒入製膠台，冷卻 **1** 小時凝固成瓊脂凝膠(**gel**)。

二、進行水平電泳

(8) 將凝固的瓊脂凝膠(**gel**)的放入迷你電泳槽中，並倒入 **450ml TAE Buffer(1X)**。

(9) 將 **2ug RNA** 與 **2ul 6X Loading dye** 混合，再加入滅過菌的二次水(**ddH₂O**)使總體積為 **10ul**。

(10) 用 **10ul** 微量吸管(**pipetman**)將上述混和均勻液體全部注入迷你電泳槽中瓊脂凝膠(**gel**)的 **well** 裡。

(11) 以電壓 **85 伏特(電流 500 mA)**進行水平電泳 **35** 分鐘

(12) 將瓊脂凝膠(**gel**)從迷你電泳槽中取出至多功能凝膠成像系統確認 **18s** 與 **28s** 橫紋條帶。存檔並列印拍照保存。

20.將冷凍組織 **RNA** 保存於**-80°C** 冰箱。

Reference:

1. Chomczynski, P. and Sacchi, N. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid GuanidineThiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. Anal Biochem. 1987;162:156-159.

2. Sambrook, J., Fritsch, R. F., and Maniatis, R. Molecular Cloning. Cold Spring

Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989).

抽 RNA Procedure 也可以參考下列網址

<http://www.bio-protech.com.tw/upload/20181115042308.pdf>