

UL-1000 超微量可见分光光度计测定 RNA 质量应用方案

简介

核糖核酸(缩写为 RNA ,即 Ribonucleic Acid) ,存在于生物细胞以及部分病毒、类病毒中的遗传信息载体。RNA 由核糖核苷酸经磷酸二酯键缩合而成长链状分子。一个核糖核苷酸分子由磷酸 ,核糖和碱基构成。RNA 的碱基主要有 4 种 ,即 A 腺嘌呤、G 鸟嘌呤、C 胞嘧啶、U 尿嘧啶 ,其中 ,U(尿嘧啶)取代了 DNA 中的 T。

原理细胞中的 RNA 可以分为信使 RNA、转运 RNA 和核糖体 RNA 三大类 ,不同组织总 RNA 提取的实质就是将细胞裂解 ,释放出 RNA ,并通过不同方式去除蛋白 ,DNA 等杂质 ,最终获得高纯度 RNA 产物的过程。

仪器及试剂

美析 UL-1000 超微量可见分光光度计

离心管 离心机 电泳槽 凝胶板

细胞样品

RNA 提取试剂盒 荧光定量 PCR Mix TRIZOL dNTP 氯仿 逆转录酶 MMLV 异丙醇 Taq 酶 DEPC 水 ddH₂O TE MgCl₂ 琼脂糖 溴化乙锭 MOPS 甲醛 乙酸钠 EDTA EB 溴酚兰

样品 RNA 的抽提

1. 取冻存已裂解的细胞 ,室温放置 5 分钟使其完全溶解。
2. 两相分离 每 1 ml 的 TRIZOL 试剂裂解的样品中加入 0.2 ml 的氯仿 ,盖紧管盖。手动剧烈振荡管体 15 秒后 ,15 到 30℃孵育 2 到 3 分钟。4℃下 12 000 rpm 离心 15 分钟。离心后混合液体将分为下层的红色酚氯仿相 ,中间层以及无色水相上层。RNA 全部被分配于水相中。水相上层的体积大约是匀浆时加入的 TRIZOL 试剂的 60%。
3. RNA 沉淀 将水相上层转移到一干净无 RNA 酶的离心管中。加等体积异丙醇混合以沉

淀其中的 RNA，混匀后 15 到 30℃ 孵育 10 分钟后，于 4℃ 下 12 000 rpm 离心 10 分钟。

此时离心前不可见的 RNA 沉淀将在管底部和侧壁上形成胶状沉淀块。

4. RNA 清洗 移去上清液，每 1 ml TRIzol 试剂裂解的样品中加入至少 1 ml 的 75% 乙醇（75% 乙醇用 DEPC H₂O 配制），清洗 RNA 沉淀。混匀后，4℃ 下 7 000 rpm 离心 5 分钟。

5. RNA 干燥 小心吸去大部分乙醇溶液，使 RNA 沉淀在室温空气中干燥 5-10 分钟。

6. 溶解 RNA 沉淀 溶解 RNA 时，先加入无 RNA 酶的水 40 μl 用枪反复吹打几次，使其完全溶解，获得的 RNA 溶液保存于 -80℃ 待用。

RNA 质量检测

1. 紫外吸收法测定

先用稀释用的 TE 溶液将紫外分光光度计调零。然后取少量 RNA 溶液用 TE 稀释（1:100）后，读取其在分光光度计 260nm 和 280nm 处的吸收值，测定 RNA 溶液浓度和纯度。

（1）浓度测定

A₂₆₀ 下读值为 1 表示 40 μg RNA/ml。样品 RNA 浓度(μg/ml)计算公式为：A₂₆₀ × 稀释倍数 × 40 μg/ml。具体计算如下：

RNA 溶于 40 μl DEPC 水中，取 5 μl，1:100 稀释至 495 μl 的 TE 中，测得 A₂₆₀ = 0.21

RNA 浓度 = 0.21 × 100 × 40 μg/ml = 840 μg/ml 或 0.84 μg/μl

取 5 μl 用来测量以后，剩余样品 RNA 为 35 μl，剩余 RNA 总量为：

35 μl × 0.84 μg/μl = 29.4 μg

（2）纯度检测

RNA 溶液的 A₂₆₀/A₂₈₀ 的比值即为 RNA 纯度，比值范围 1.8 到 2.1。

2. 变性琼脂糖凝胶电泳测定

（1）制胶

1 g 琼脂糖溶于 72 ml 水中，冷却至 60℃，10 ml 的 10 x MOPS 电泳缓冲液和 18 ml 的 37% 甲醛溶液(12.3 M)。

10x MOPS 电泳缓冲液

浓度 成分

0.4 M MOPS, pH 7.0

0.1 M 乙酸钠

0.01 M EDTA

灌制凝胶板，预留加样孔至少可以加入 25 μ l 溶液。胶凝后取下梳子，将凝胶板放入电泳槽内，加足量的 1xMOPS 电泳缓冲液至覆盖胶面几个毫米。

(2) 准备 RNA 样品

取 3 μ gRNA 加 3 倍体积的甲醛上样染液，加 EB 于甲醛上样染液中至终浓度为 10 μ g/ml。

加热至 70℃孵育 15 分钟使样品变性。

(3) 电泳

上样前凝胶须预电泳 5 min，随后将样品加入上样孔。5-6 V/cm 电压下 2 h，电泳至溴酚兰指示剂进胶至少 2-3 cm。

(4) 紫外透射光下观察并拍照

28S 和 18S 核糖体 RNA 的带非常亮而浓（其大小决定于用于抽提 RNA 的物种类型），上面一条带的密度大约是下面一条带的 2 倍。还有可能观察到一个更小稍微扩散的带，它由低分子量的 RNA（tRNA 和 5S 核糖体 RNA）组成。在 18S 和 28S 核糖体带之间可以看到一片弥散的 EB 染色物质，可能是由 mRNA 和其它异型 RNA 组成。RNA 制备过程中如果出现 DNA 污染，将会在 28S 核糖体 RNA 带的上面出现，即更高分子量的弥散迁移物质或者带，RNA 的降解表现为核糖体 RNA 带的弥散。用数码照相机拍下电泳结果。

结果计算

RNA 得率有很强的组织特异性,不同组织 RNA 的丰度和 RNA 提取的难易程度共同决定了该种组织的 RNA 得率。一般来说,可通过分光光度计测定 RNA 溶液在 260nm 处的吸光值来计算 RNA 的含量。RNA 溶液在 260、320、230、280nm 下的吸光度分别代表了核酸、溶液浑浊度、杂质浓度和蛋白等有机物的吸收值。用标准样品测得在波长 260nm 处, 1ug/mlRNA 钠吸光度 0.025(光程为 1cm) ,即 $OD_{260}=1$ 时 样品中 RNA 浓度为 40ug/ml。通常分光光度计 OD_{260} 的读数要介于 0.15-1.0 之间才是可靠的。因此 RNA 提取结束后,要根据大概产量稀释到适当浓度范围,再用分光光度计检测。按下面的共识计算总 RNA 浓度:

总 RNA 浓度 (ug/ml) = $OD_{260} \times \text{稀释倍数} \times 40\text{ug/ml}$