

·技术与方法·

RNA 甲醛琼脂糖凝胶电泳的优化及探讨*

张小林¹ 韩丽君² 李 龙² 林志雄^{1△}

(1 福建医科大学附属第一医院神经外科 福建 福州 350005; 2 厦门大学医学院药理学系 福建 厦门 361005)

摘要 目的:优化 RNA 甲醛琼脂糖凝胶电泳条件。方法:对实验器材进行彻底的 RNase 灭活处理;在原有电泳过程的基础上,增加预电泳、缓冲液液面的处理和制胶过程中未加入溴化乙锭等优化过程。结果:优化后的电泳不仅能验证总 RNA 的完整性,而且能鉴定 RNA 的分子大小。结论:优化的 RNA 甲醛琼脂糖凝胶电泳法操作简单、省时、快速, RNA 条带清晰、定位准确、无弥散及非特异条带。

关键词: RNA; RNase; 电泳; 琼脂糖

中图分类号: R446 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2011)02-351-03

The Optimization and Discussion of RNA Formaldehyde Agarose Gel Electrophoresis*

ZHANG Xiao-lin¹, HAN Li-jun², LI Long², LIN Zhi-xiong^{1△}

(1 Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fujian Fuzhou 350005, China;

2 Department of Pharmacology, the School of Medicine, Xiamen University, Fujian Xiamen 361005, China)

ABSTRACT Objective: To optimize the conditions of the RNA formaldehyde agarose gel electrophoresis. **Methods**: Thoroughly inactivate RNase of experimental equipments; Based on the original electrophoresis process, adding the optimized procedures, such as: pre-electrophoresis, treatment of buffer surface and decreasing ethidium bromide into gel etc. **Results**: The optimized RNA electrophoresis not only verify the integrity of total RNA, but also identify the molecular size of RNA. **Conclusion**: The optimized RNA electrophoresis is simple, time-saving, fast and RNA bands are clear, accurate position, no dispersion and non-specific bands.

Key words: RNA; RNase; electrophoresis; agarose

Chinese Library Classification(CLC): R446 **Document code**: A

Article ID: 1673-6273(2011)02-351-03

前言

构建 cDNA 文库、cRNA 探针的原位杂交、Real-Time PCR、Northern-Blot 和 Dot-Blot 杂交分析等分子生物学实验,都需要纯度高、完整性好的 RNA。RNA 甲醛琼脂糖凝胶电泳是常用的分离 RNA、鉴定 RNA 大小及完整性的电泳方法。本文拟就 RNA 甲醛琼脂糖凝胶电泳的条件优化进行综述并初步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠肝脏组织和脂肪组织, C6 细胞和 SHG44 细胞(中科院上海细胞所), cRNA 探针(美国加州大学欧文分校馈赠)。

1.2 试剂

10xMOPS 缓冲液(Solarbio), DEPC(Solarbio), Trizol(Invitrogen), RNA Ladder(Fermentas), 2X RNA Loading Dye(Fermentas),

agrose(Amresco), 其余试剂均为国产分析纯。

1.3 仪器

DU800 核酸蛋白分析仪(美国贝克曼库尔特公司), DYY-2C 稳压稳流型电泳仪(北京六一仪器厂), DYCP-31DN 型琼脂糖水平电泳仪(北京六一仪器厂), JS-680B 全自动凝胶成像分析仪(上海培清科技公司)。

1.4 Trizol 法提取总 RNA

细胞和组织的总 RNA 的提取过程按照 Trizol 试剂说明书推荐的步骤操作。对提取的 RNA 在 DU800 核酸蛋白分析仪上测 A260 值和 A260/A280 值, 确定所提取总 RNA 的浓度和纯度, A260/A280 比值在 1.8-2.0 为纯的 RNA^[1]。

1.5 烧瓶、烧杯、药匙、量筒的处理

烧瓶、烧杯、药匙和量筒用去污剂清洗后, 去离子水冲洗干净, 放入未灭活的 1% DEPC 水中浸泡过夜, 然后取出上述实验器材, 高压消毒灭活 DEPC, 烘干备用。

1.6 电泳槽和制胶器的处理

* 基金项目: 国家自然科学基金资助(30973083)

作者简介: 张小林(1983-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 脑肿瘤的基础研究与临床治疗;

电话: 0592-2187210 E-mail: syzxl@qq.com

△通讯作者: 林志雄, 男, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 脑肿瘤的基础研究与临床治疗; E-mail: Lzx1967@sina.com

(收稿日期: 2010-10-21 接受日期: 2010-11-19)

电泳槽及制胶器用去污剂清洗后,去离子水冲洗干净,放入3%的H₂O₂中浸泡10min,然后用灭活的1%DEPC水冲洗干净,放入超净台中紫外线下照射过夜。

1.7 RNA的甲醛琼脂糖凝胶电泳

按照文献^[2]报道的方法进行甲醛琼脂糖凝胶电泳,并在此基础上进行如下优化:①.预电泳10min;②.缓冲液的液面在预电泳之前是略低于胶面,而在sample及Ladder上样电泳5min后是略高于液面;③.制胶过程中未加入溴化乙锭。详细步骤如下:①.配制1.5%甲醛琼脂糖凝胶30ml;21.6ml高压消毒的DEPC水与0.45g琼脂糖粉末混合后摇匀,微波炉中彻底融化琼脂糖,然后加入3ml 10xMOPS缓冲液并混匀。当琼脂糖溶液冷却至约60℃时,在通风橱中加入5.4ml新鲜的37%甲醛并充分混匀。②.插好梳子,缓慢灌胶,小心除去梳子周围及凝胶中的气泡。待胶凝固后,小心拔出梳子。③.RNA样品的处理:4μl的RNA sample或RNA Ladder与等体积的2X RNA Loading Dye混匀,70℃加热10min,冰浴3min,凝胶上样前短暂离心。④.将胶放入电泳槽中,加入灭活的1%DEPC水稀释的1xMOPS缓冲液,液面略低于胶面。⑤.100V预电泳10min。⑥.上样于胶槽中,100V电泳5min,让sample及Ladder进入凝胶后,再加入1xMOPS缓冲液,让液面略高于胶面。⑦.100V电泳约1h。然后在紫外灯下观察电泳结果,并在凝胶成像分析仪上拍照。

2 结果分析

2.1 cRNA探针的电泳结果

地高辛标记的CB1 cRNA探针由体外转录合成,其分子量大小为494bp。CB1 cRNA探针电泳后出现的条带与RNA Ladder 500bp分子量的条带非常接近,说明RNA甲醛琼脂糖凝胶电泳可以鉴定RNA分子量的大小。由此可知,RNA甲醛琼脂糖凝胶电泳也可以验证合成的RNA探针是不是目的探针。(图1)

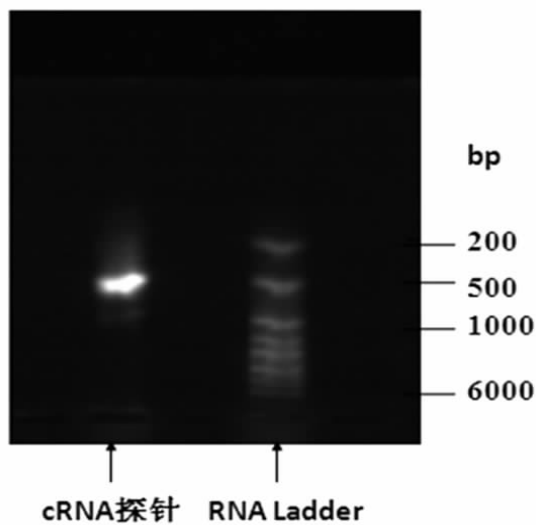


图1 cRNA探针的甲醛琼脂糖凝胶电泳

Fig.1 The RNA formaldehyde agarose gel electrophoresis of cRNA probe

2.2 组织总RNA的电泳结果

真核生物有4种rRNA,它们分子大小分别是5S、5.8S、18S

和28S,分别具有约120、160、1900和4700个核苷酸^[3]。小鼠肝脏和脂肪组织经1.5%的甲醛琼脂糖凝胶电泳后,显示出三条清晰明显的条带。对照RNA Ladder的分子量,这三个条带分别为:5S、18S和28S rRNA,且28S rRNA条带的亮度约为18S rRNA的两倍,说明RNA甲醛琼脂糖凝胶可以鉴定提取组织RNA的完整性。(图2)

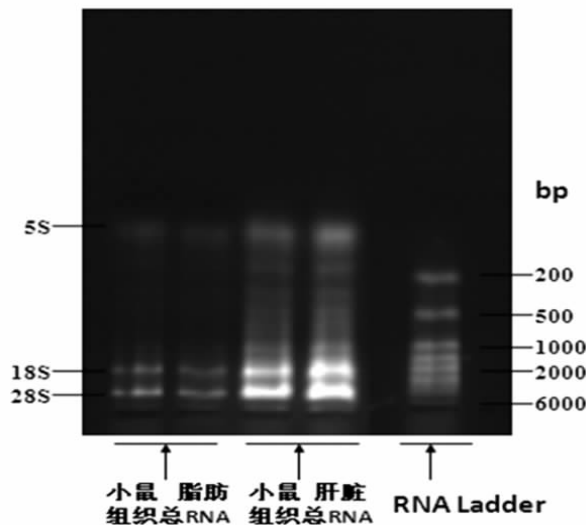


图2 小鼠肝脏和脂肪组织总RNA的甲醛琼脂糖凝胶电泳

Fig.2 The RNA formaldehyde agarose gel electrophoresis of mouse liver and fat tissue total RNA

2.3 细胞总RNA的电泳结果

按照Trizol法提取C6细胞和SHG44细胞的总RNA,经核酸蛋白分析仪分析后,A260/A280比值均在1.8-2.0,说明RNA的纯度很高。细胞总RNA经甲醛琼脂糖凝胶电泳后,分离出四条很明显的条带,对照RNA Ladder的分子量,这四个条带分别为:5S、5.8S、18S和28S rRNA,且28S rRNA条带的亮度约为18S rRNA的两倍,说明RNA甲醛琼脂糖凝胶可以验证提取细胞RNA的完整性。(图3)

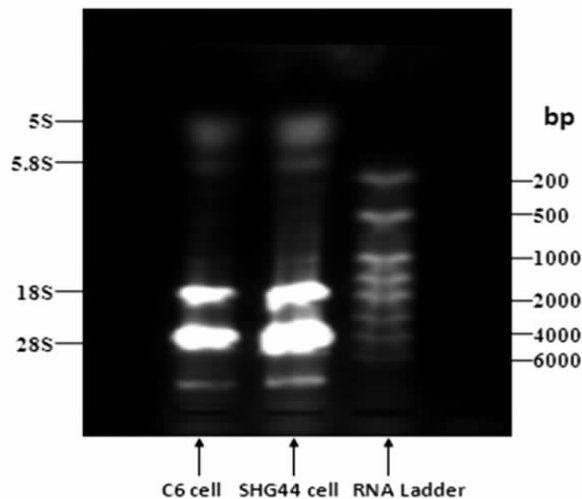


图3 C6和SHG44细胞总RNA的甲醛琼脂糖凝胶电泳

Fig.3 The RNA formaldehyde agarose gel electrophoresis of C6 cell and SHG44 cell total RNA

3 讨论

RNA 电泳是常用的分子生物学实验技术,分为非变性电泳和变性电泳。由于 RNA 分子内部相互作用, RNA 分子可能会形成非常难以分解的二级结构或三级结构,从而改变 RNA 迁移率,因此 RNA 非变性电泳只能用于鉴定 RNA 的完整性。RNA 只有在完全变性的情况下,其迁移速率才与分子量成线性关系。因此,如果要精确鉴定 RNA 分子的大小和完整性,必须使用 RNA 变性电泳^[2]。目前,最常用的变性电泳为甲醛琼脂糖凝胶电泳^[5]。

随着分子生物学技术的迅猛发展以及在生命科学领域的广泛应用,以 RNA 为研究对象的实验与日俱增,但它极易受到 RNase 的降解。在进行 RNA 操作时要特别注意外源性 RNase 的污染,尤其是无 RNase 抑制剂存在的条件下,故 RNA 甲醛琼脂糖电泳也不例外。因此,在 RNA 操作过程中必须对所有实验材料进行彻底的 RNase 灭活处理,故 RNA 实验所用的 Ep 管、Tip 头均为 Axygen 公司的,无 DNase 和 RNase。制胶用的烧瓶、烧杯、药匙和量筒等都用了 1% DEPC 浸泡过夜,高压消毒后备用。RNase 的本质为 RNA^[6],而紫外线可以使 RNA 变性^[7],对于电泳槽和制胶器等塑料制品不能高压,用灭活的 DEPC 水冲洗干净后,再在紫外线下照射过夜来灭活 RNase。RNase 存在于各种环境中,人和动物的汗液、唾液和血液中含有大量的 RNase^[8],因此, RNA 电泳的大部分操作在超净台内完成,并且全程戴手套,必要时还要换手套。需要在外操作的操作步骤,操作时避免说话或者戴口罩。

配制琼脂糖凝胶时要特别注意附在烧杯壁上的琼脂糖的溶解,融化后的琼脂糖是清澈透明的,煮沸时蒸发体积减少要用缓冲液补充。预电泳 10min 的目的是为了减少非特异 RNA 条带的出现,有利于分离和纯化。同时,可根据电泳仪是否冒泡判断电泳仪装置是否有误。RNA 样品是在 MOPS 缓冲液略低于胶面而不是在高过胶面^[9]时加进齿槽,避免了加样时 RNA 的扩散、加样后 RNA 从齿槽逸出造成 RNA 的弥散及定位不良等现象。电泳 5min 让 RNA 样品进入凝胶后再加 MOPS 缓冲液略高过胶面,是为了确保加到每个槽中的 RNA 量及定位的准确性,从而有利于 RNA 的鉴定和纯化。

溴化乙锭(ethidium bromide, EB)是强诱变剂,剧毒,取用时须戴手套^[10]。因 Fermentas 公司提供的 2X RNA Loading Dye 含有足够的 EB 用来染色 RNA 并在紫外线下观测,因此在制胶过程中无需加入溴化乙锭,也无需单独的溴化乙锭染色过程,大大减少了 EB 的使用量。这样不仅减少了对环境的污染,也极大地降低了工作人员接触 EB 的机会。

RNA 甲醛琼脂糖凝胶电泳不仅可以鉴定 RNA 的完整性,

而且也可以鉴定 RNA 的分子大小。该电泳经过本实验室优化后,操作简捷,重复性好,无论是从组织中提取的 RNA,还是从培养细胞中提取的 RNA,以及体外转录的 RNA 探针,都能得到条带清晰、定位准确、无弥散的 RNA 条带,故笔者认为该电泳方法可推广使用。

参考文献(References)

- [1] 饶国洲,李昂,景娟,等.高纯化 RNA 分离方法的建立与应用[J].现代检验医学杂志,2005,20(6):4-6
Rao Guo-zhou, Li Ang, JING Juan, et al. Method for separating RNA of high purity [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2005,20(6):4-6
- [2] Bryant S, Manning DL. Formaldehyde gel electrophoresis of total RNA [J]. Methods Mol Biol, 1998,86:69-72
- [3] 潘敏慧,万永继,鲁成.核糖体 RNA 研究进展[J].蚕学通讯,2001,21(3):10-15
Pan Min-hui, Wan Yong-ji, Lu Chen. Advances in ribosomal RNA research[J]. Newsletter of Sericultural Science, 2001, 21(3):10-15
- [4] 李萍,熊凡,富青,等.一种简便的 RNA 完整性检测方法[J].湖北中医学院学报,2005,7(3):39-40
Li Ping, Xiong Fan, Fu Qing, et al. A simple method for detecting RNA integrity [J]. Journal of Hubei College of Traditional Chinese Medicine, 2005,7(3):39-40
- [5] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. Second Edition. Beijing: Science Press, 1992:366-369
- [6] 翁屹,刘锐. RNA 酶的发现与启示[J].医学与哲学(人文社会医学版),2010,31(1):69-70
Weng Yi, Liu Rui. The found and revelation of RNA polymerase[J]. Medicine and Philosophy (Humanistic & Social Medicine Edition), 2010,31(1):69-70
- [7] Wurtmann EJ, Wolin SL. RNA under attack: cellular handling of RNA damage[J]. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2009,44(1):34-49
- [8] 熊毅,朱伟,刘棋,等.样品中 RNA 酶去除试验研究[J].动物医学进展,2006,27(3):93-95
Xiong Yi, Zhu Wei, Liu Qi, et al. Experimental research on eliminate RNase enzyme from samples [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2006,27(3):93-95
- [9] 药立波,常智杰.医学分子生物学实验技术[M].北京:人民卫生出版社,2002:106-108
Yao Li-bo, Chang Zhi-jie. Medical molecular biology techniques [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002:106-108
- [10] 常冰梅,张栋,李美宁,等.一种新型核酸染料在琼脂糖凝胶电泳中的应用[J].现代预防医学,2010,37(19):3717-3720
Chang Bing-mei, Zhang dong, Li Mei-ning, et al. Application of the nucleic acid dye stuff in agarose gel electrophoresis [J]. Modern Preventive Medicine, 2010,37(19):3717-3720