

专题介绍

Northern 印迹检测小 RNA

陆明华 刘默芳*

(中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所 RNA 研究技术平台, 上海 200031)

Northern 印迹是一种常用的 RNA 定性和定量分析方法。与 mRNA 等大分子 RNA 类似, microRNA 等小分子 RNA 也可以通过电泳级分、转膜、杂交等 Northern 印迹操作进行定性、定量的分析。下面与大家分享我们实验室小 RNA Northern 印迹的一些经验。

1 样品制备

因小 RNA 在 total RNA 中所占比例较低, 当检测低丰度小 RNA 时, 可以用商品化的小 RNA 抽提试剂盒获得足够量的 RNA 以保证杂交实验的成功。我们一般使用 20~40 μg 的上样量, 体积在 15 μl 为佳。

2 制胶

制备 20 cm $\times$ 16 cm、浓度为 12%~16% 的 7 mol/L 尿素变性 PAGE 胶, 胶凝聚时间至少要 30 min。凝胶完全后, 在水流下小心拔出梳子, 切除多余的胶, 清除上样空空的胶碎片, 保持上样孔平整。因尿素极易析出, 上样前用电泳缓冲液将上样孔冲洗干净。把胶放入电泳槽后加缓冲液, 200 V $\times$ 30 min 预电泳, 预热凝胶, 同时检查是否漏液。

3 上样电泳

在提取的 RNA 样品中加入 RNA 上样缓冲液 (loading buffer), 80 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5~10 min, 离心, 取上清液加样到预清理好的上样孔中, 作好记录。200 V $\times$ 30 min 电泳后, 将电压升至 500 V, 再电泳 1 h 左右至溴酚蓝接近底部。注意避免目的条带跑出胶, 一般在溴酚蓝刚出胶时结束电泳。

4 剥胶

将胶从玻璃板上小心地剥下, 放在保鲜膜上, 切去多余的部分(上样孔和两侧)。裁剪与胶大小相同的尼龙膜和 6 片 3 mm 的 Whatman 层析滤纸, 将它们浸泡在 0.5 $\times$ TBE 缓冲液中。将湿润的尼龙膜放在胶上, 注意去除气泡, 然后一层一层地在膜上铺三层滤纸, 将这个“三明治”翻转过来, 置于半干电转仪平板上后, 再在胶上一层一层地铺三层滤纸。以塑料管或玻棒在“三明治”上滚动, 赶走气泡, 可再添加一些缓冲液使其更湿润。

5 转膜

盖上电转仪盖子, 以恒定电流 3.3 mA/cm² 转膜 35 min。取出“三明治”, 膜可用针头刺孔或剪刀剪角以标记有 RNA 的那一面。胶可以用 EtBr 染色并拍照, 确认所有小于 200 nt 的 RNA 都被转到了尼龙膜上, PAGE 胶上可能会有较大的 RNA 留下。

6 交联

趁膜还是湿润的, 用 1 000 μJ 的能量进行紫外交联, 然后在 80 $^{\circ}\text{C}$ 烘烤尼龙膜至少 30 min, 使 RNA 完全固定。将膜储存在洁净密封袋中, 直到探针准备好。

7 探针制备

以 T4 Poly Nucleotide Kinase 和 [γ -³²P]ATP 将合成的单链 DNA/RNA 探针进行 ³²P 末端标记。标记后用 Sephadex G-25/G-50 柱除去未反应的 [γ -³²P]ATP。探针的制备可以在预杂交时进行, 如果使用的是地高辛探针则可跳过这一步。

8 预杂交、杂交

将 25 ml 预杂交液预热, 将 1 mg 鱼精 DNA 煮沸 5 min 变性后加入预杂交液中。把膜卷成圆筒放入杂交管中, 确定膜在杂交管中是展开且平整的, 然后倒入预杂交液, 50 $^{\circ}\text{C}$ 预杂交至少 2 h, 也可过夜。杂交液的成分与预杂交液相同, 只是在其中加入了标记的探针。将预杂交液倒掉之后即可加入含有探针的杂交液进行杂交。杂交温度一般控制在 40~50 $^{\circ}\text{C}$, 可以根据探针的大小进行调整, 杂交时间至少在 2 h 以上。

9 洗涤、曝光

* 通讯作者。Tel: 021-54921146, Fax: 021-54921011, E-mail: mliu@sibs.ac.cn

在杂交的同时,开始配制 Wash Solution [Non-Stringent Wash Solution (NSWS)和 Stringent Wash Solution(SWS)]。杂交完成后将放射性杂交液倒入专门的废液缸中,分别用 40 ml 预热的 NSWS 10 min 洗两次和 30 min 洗两次,最后用 80 ml SWS 洗 5 min。取出膜,用保鲜膜包好固定在片匣中, RNA 那面朝上,压磷屏曝光过夜。

对地高辛探针杂交,在用 SWS 洗完后用 Maleic Acid Buffer 洗膜 2 min, Blocking Solution 封闭 60 min, 1:5 000 在 Blocking Solution 中加入 anti-AP, 摇 45 min, Wash Solution 洗 15 min 两次, Detection Buffer 摇 3 min, 将膜铺到保鲜膜上,均匀地滴几滴 CDP-STAR, 包好压 X 光片。

10 探针剥离

用 80 ml 1% SDS 在 85 °C 旋转洗涤 30 min, 剥离效果可以压磷屏或 X 光片检测,如有需要可增加一次 10 min 的洗涤。使用 GeneScreen Plus 尼龙膜并正确交联, RNA 在膜上结合较牢固,多次洗涤信号损失也很小。对多探针多次杂交,检测顺序一般从低丰度到高丰度的 RNA。从预杂交开始,保持膜湿润、不起皱,杂交膜可在室温或 -20 °C 稳定保存数月。

附:实验仪器设备和材料试剂

【仪器】

垂直电泳槽及相关配件、半干电转仪、紫外交联仪、杂交炉、水浴锅等。

【材料】

GeneScreen Plus 尼龙膜(PerkinElmer)、Whatman 层析滤纸、磷屏、X 光片等。

【常规试剂】

尿素、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氢氧化钠、

磷酸、SDS、氯化钠、三水柠檬酸钠、Ficoll 400、PVP、BSA、DEPC、鲑鱼精 DNA、无水乙醇、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 等。

【配制试剂】

20×SSC: 175 g NaCl + 88 g 二水柠檬酸三钠,加水 800 ml,调 pH 至 7.0,定容至 1 L,灭菌后 4 °C 保存,易产生絮状沉淀,用前摇匀;

50×Denhardt solution (亦有商品化试剂可购买): 5 g Ficoll 400 + 5 g PVP + 5 g BSA,加 DEPC 水至 500 ml,分装后 -20 °C 保存;

10% SDS: 100 g SDS + 900 ml DEPC 水,摇匀,室温保存;

5×TBE: Tris-base 54 g + 27.5 g 硼酸 + 20 ml 0.5 mol/L pH 8.0 EDTA,加水至 1 L,灭菌后 4 °C 保存

PAGE 变性胶(15%): 18.75 ml 40% Acrylamide + 5 ml 5×TBE + 10 ml H_2O + 21 g urea + 400 μl 10% AP + 40 μl TEMED 室温放置 1 h 左右凝固,如需过夜则放置 4 °C;

Non-Stringent Wash Solution (NSWS): 30 ml 20×SSC + 100 ml 10% SDS + 5 ml 1 mol/L pH 7.5 NaH_2PO_4 + 20 ml 50×Denhardt solution + 45 ml H_2O ,现用现配;

Stringent Wash Solution (SWS): 10 ml 20×SSC + 20 ml 10% SDS + 170 ml H_2O ,现用现配;

杂交液(预杂交液): 12.5 ml 20×SSC + 1 ml Na_2HPO_4 + 35 ml 10% SDS + 1.5 ml Denhardt solution + 煮沸 5 min 的 DNA 1 mg (50 μl) 鱼精

注:所有含 SDS 的溶液若产生沉淀需要加热使 SDS 溶解后使用,最好事先预热到 37 °C,避免 SDS 沉淀。地高辛方法中所用试剂配方可参考罗氏相应试剂盒(CDP-Star)说明书。