

## Small RNA 分离及 PAGE-northern

沈建强, 龙湍, 熊立仲\*

作物遗传改良国家重点实验室, 华中农业大学, 武汉

\*通讯作者邮箱: [lizhongx@mail.hzau.edu.cn](mailto:lizhongx@mail.hzau.edu.cn)

引用格式: 沈建强, 龙湍, 熊立仲. (2018). Small RNA 分离及 PAGE-northern. *Bio-101* e1010117. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010117.

**实验原理:** 根据变性 PAGE 胶, 分离小片段 RNA, 然后用同位素标记探针检测目的小 RNA。

**实验目的:** 用来验证植物中小 RNA 的存在, 检测小 RNA 大小, 以及表达量分析。

**关键词:** Small RNA, PAGE-northern, 变性 PAGE

### 材料与试剂

1. 玻璃板
2. 各种规格 RNase free 枪头
3. 海绵
4. 滤纸
5. 保鲜膜
6. 冰槽
7. 丙烯酰胺:甲叉双丙烯酰胺=29:1 (BioRad, catalog number: 161-0156)
8. N,N,N',N'-四甲基乙二胺(TEMED) (BioRad, catalog number: 161-0800)
9. 10%过硫酸铵(AP) (Sigma, catalog number: A7460)
10. 尿素 (Sigma, catalog number: U6504)
11. 0.1%溴酚蓝
12. 0.1%二甲苯青
13. 8 M 尿素
14. 尼龙膜 (Amershan, catalog number: RPN3038)
15. T4 寡核苷酸激酶 (Takara)

16.  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP (PerkinElmer, catalog number: BLU002Z250UC)
17. Tris (Sigma)
18. 硼酸 (Sigma)
19. EDTA (FLUKA)
20. DEPC (Sigma, catalog number: D5758)
21. 无水乙醇和 75%乙醇
22. 0.01% DEPC 水
23. EB
24. 氯化钠 (Sigma)
25. 柠檬酸钠 (Sigma)
26. 磷酸二氢钠 (Sigma)
27. 磷酸氢二钠 (Sigma)
28. PEG8000 (Sigma)
29. SDS (BBI)
30. 100x Denhardt's Solution (Invitrogen)
31. 鲑精 DNA (Sigma)
32. 8 M 尿素上样缓冲液 (见溶液配方)
33. 5x TBE 缓冲液 (见溶液配方)
34. 预杂交液/杂交液 (见溶液配方)
35. 非严谨洗膜液 (见溶液配方)
36. 严谨洗膜液配方 (见溶液配方)

## 仪器设备

1. 量筒
2. 电泳槽
3. 梳子
4. 电泳仪
5. 转膜槽
6. 移液器

7. 搅拌子
8. 暗夹
9. BioRad Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System (BioRad, catalog number: 164-8003)
10. 真空干燥箱 (SHEL LAB)
11. 杂交炉 (UVP, model: HB-1000 Hybridizer)
12. 紫外线交联仪 (UVP, model: CL-1000 Ultraviolet Crosslinker)
13. 超声波仪 (Bioruptor™, model: UCD-200)
14. 磷屏扫描仪 (FUJIFILM, model: FLA-5100)
15. 离心机
16. -20 °C 冰箱

## 实验步骤

### 一、低分子量 RNA 分离

1. 100-500 µg 总 RNA 加入等体积 1.5 M 氯化钠溶液和 15% PEG8000, 置于冰上 30-60 min。
2. 4 °C, 16,000 x g 离心 20 min, 吸上清, 加入 2.5 倍体积预冷无水乙醇。 -20 °C 沉淀过夜。
3. 4 °C, 16,000 x g 离心 20 min, 弃上清, 用 75%乙醇清洗沉淀。干燥, 加入适量 DEPC 水溶解。

### 二、PAGE-northern

1. 把电泳槽, 玻璃板, 梳子, 转膜槽清洗干净, 并且浸泡在 DEPC 水 (未经灭菌的) 中过夜。
2. 按 Mini-PROTEAN 系统操作手册固定制胶用的玻璃板, 准备 15%变性 PAGE 胶。

5x TBE	2 ml
30% PAGE	5 ml
尿素	4.8 g
ddH <sub>2</sub> O	3 ml

待尿素溶解后，加入 100  $\mu$ l 10% AP 和 10  $\mu$ l TEMED，混合均匀，灌胶。插上梳子，室温凝固 45-60 min。

- 待胶凝固后，组装电泳槽，加入 1x TBE，100 V 预电泳 40-60 min，用移液器将胶孔吹洗干净。
- 将 30  $\mu$ g 总 RNA 稀释到 15  $\mu$ l DEPC 水中，加入 5  $\mu$ l 8 M 尿素上样缓冲液，80  $^{\circ}$ C 变性 10 min，立即置于冰上 3 min。
- 短暂离心后用 20  $\mu$ l 移液器点样，30 V 电泳 90 min，然后调电压至 60 V，电泳至溴酚蓝跑到胶的底部。
- 将跑好的凝胶于 EB 中浸泡 5 min，用 DEPC 水漂洗后，于凝胶成像系统中观察 RNA 质量。
- 将转膜用的海绵，滤纸，尼龙膜，PAGE 胶于 1x TBE 润湿清洗。然后按照海绵-滤纸-PAGE 胶-尼龙膜-滤纸-海绵的顺序，在转膜夹中将转膜三明治叠好，夹紧。将夹好的三明治放入转膜槽，加入冰槽，放入搅拌子，注入 1x TBE 缓冲液至浸没转膜三明治。将转膜槽置于搅拌器上搅拌，20 V 转膜 120 min。
- 拆除转膜装置，将尼龙膜 RNA 承载面朝上，在紫外线交联仪中 1800 J 交联两次，80  $^{\circ}$ C 烘膜 4 h。
- 将烘干的尼龙膜放入杂接管，加入 60  $^{\circ}$ C 预热的杂交液 20 ml，并且加入 100  $\mu$ l 10 mg/ml 超声波打断后的鲑精 DNA(ssDNA)，于 45-50  $^{\circ}$ C 预杂交 8 h。

- 按照下面的体系标记探针

Probe	2 $\mu$ l
10x T4 PNK buffer	2 $\mu$ l
T4 PNK	1 $\mu$ l
$\gamma$ - <sup>32</sup> P-ATP	3 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	12 $\mu$ l

37  $^{\circ}$ C 孵育 60 min 后，加入 500  $\mu$ l 杂交液，80  $^{\circ}$ C 变性 10 min。

- 将步骤 10 中的变性探针全部加入杂接管中，杂交过夜。
- 倒掉杂交液，用 25 ml 非严谨洗膜液洗两次，每次 5 min，然后用严谨洗膜液洗两次，每次 10 min。将膜放于滤纸上稍晾干，用保鲜膜包好，放于暗夹中曝光 24 h。
- 扫描磷屏。

## 结果与分析

1. 所有和 RNA 直接接触的器具，都需要用 DEPC 水处理。以防 RNase 污染。
2. 操作过程中，勤换手套，以防污染。
3. 每次扫完磷屏后一定要消磁。

## 溶液配方

1. 8 M 尿素上样缓冲液

0.1% 溴酚蓝

0.1% 二甲苯青

1 mM EDTA

8 M 尿素

2. 5x TBE 缓冲液配方

450 mmol/L Tris-硼酸

10 mmol/L EDTA

3. 预杂交液/杂交液配方

5x SSC

20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7.2)

7% SDS

2x Denhardt's Solution

4. 非严谨洗膜液配方

3x SSC

25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.5)

5% SDS

10x Denhardt's Solution

5. 严谨洗膜液配方

1x SSC

1% SDS