

上海生物样本库
最佳实践规范及标准操作流程
文件汇编
(第二版)

2010年5月

上海生物样本库 质量管理体系文件				
文件名称	分光光度法 RNA 检测操作规程		编号	SOP-TQ-011-01
批准人		批准日期	实施日期	

分光光度法 RNA 检测操作规程

1. 目的

规定了分光光度法 RNA 检测的操作。

2. 适用范围

适用于从人体体液、细胞、组织等样本中提取和纯化的 RNA 样本的使用分光光度法的检测。

3. 定义和术语

3.1 核糖核酸 ribonucleic acid, RNA

由脱氧核糖核酸 (DNA) 为模板转录合成的核糖核酸的片断。

4. 职责

4.1 样本库实验人员负责分光光度法的 RNA 检测工作。

5. 设备和器材

5.1 1xTE 缓冲液

1M Tris.Cl, pH 7.4, 10ml;

0.5M EDTA, pH 8.0, 2ml;

加入 DEPC 水并定容至 1L。

6. 正文

6.1 检测原理

6.1.1 评价 RNA 质量的标准是 RNA 的均一性和完整性。均一性的 RNA 取决于有效的去除 RNA 提取物中的 DNA、蛋白质和其他杂质；完整的 RNA 取决于最大限度地避免纯化过程中内源性及外源性 RNase 对 RNA 的降解。通常采用紫光分光光度法测定 RNA 的浓度和纯度，DNA 或 RNA 链上碱基的苯环结构在紫光区具有较强

吸收，其吸收峰在 260nm 处。波长为 260nm 时，DNA 或 RNA 的光密度 OD₂₆₀ 不仅与总含量有关，也随构型而有差异。该方法不能区别 DNA 和 RNA 的含量。纯的 RNA A₂₆₀/A₂₈₀=2.0，但由于所用标本不同，此比值有一定的变化，一般在 1.7~2.0 之间。低于 1.7 说明有蛋白和酚污染，需进一步酚/氯仿抽提。高于 2.0，可能是异硫氰酸残存。

6.2 检测步骤

6.2.1 紫外分光光度计开机预热 10min。

6.2.2 用 1xTE 缓冲液在分光光度计下进行校零。

6.2.3 用 1xTE 缓冲液稀释 RNA 样品，调整分光光度计下 A₂₆₀ 的读数在 0.1~1 的范围内。

稀释比例	1:10	1:50	1:100
RNA (ul)	1	1	1
1xTE 缓冲液 (ul)	9	49	99

6.2.4 使用分光光度计测定 A₂₆₀ 和 A₂₈₀ 下的值。

6.2.5 RNA 浓度计算

RNA (ug/ul) = A₂₆₀ x 0.04 x 稀释比例 (1 A₂₆₀ = 40 ug/ml, 1:100 稀释)

6.2.6 RNA 纯度 (A₂₆₀/A₂₈₀) 应该在 1.7~2.0 之间。

7. 相关文件

无

8. 参考标准与文献

分子克隆实验指南 第三版

ABN Biorepository Protocols, Mar 2007