

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	变性琼脂糖凝胶电泳 RNA 检测操作规 程			编号	SOP-TQ-012-01
批准人		批准日期		实施日期	

变性琼脂糖凝胶电泳 RNA 检测操作规程

1. 目的

规定了变性琼脂糖凝胶电泳 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 样本的使用变性琼脂糖凝胶电泳的检测。

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变性琼脂糖凝胶电泳的RNA检测工作。

5. 设备和器材

5.1 微波炉、水平电泳仪

5.2 DECP 水

在 2L 双蒸水中加入 1ml DECP, 37°C 孵育过夜, 蒸压两次烧尽 DECP。

5.3 10X MOPS 缓冲液 (pH 7.0)

0.4M MOPS, 0.1M 醋酸纳, 0.01M EDTA, 用氢氧化钠调节至 pH7.0 后室温贮存。

5.4 100ul 上样缓冲液

48ul 甲酰胺, 17.3 ul 37%甲醛 (12.3M), 34.7ul 上样染液

5.5 上样染液

- 80ul 10X MOPS 缓冲液
- 50ul DECP 水
- 50ul 溴化乙锭
- 40ul 无菌甘油
- 40ul DECP 溶解的饱和溴酚蓝
- 4℃避光贮存。

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。RNA 的完整性可通过变性琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。完整的 RNA 电泳时，28S（约 4.8kb）和 18S（约 1.9kb）rRNA 经 EB 染色后，两条电泳带的显色强度近似比为 2 比 1。

6.2 检测步骤

6.2.1 配制 1%变性琼脂糖凝胶

- A. 在 0.1% DEPC 水中加入琼脂糖后微波加热 2 分钟，使溶解；
- B. 冷却至 60℃左右加入 37%甲醛和 10X MOPS
- C. 将凝胶倒入灌胶槽，等待约 1 小时凝固胶。
- D. 配制表

溶液体积 (ml)	50	100	200
琼脂糖 (g)	0.5	1	2
DECP 水 (ml)	36	72	144
10X MOPS 缓冲液(ml)	5	10	20
37%甲醛 (ml)	9	18	36

6.2.2 样品的处理

- A. 将 1-5ug RNA 稀释到约 3ul。
- B. 在 RNA 样品中加入 5-10ul 上样缓冲液。加入溴化乙锭使终浓度在 10ug/ml。
- C. 加热变性样本至 55℃ 15 分钟，冰浴 1 分钟

6.2.3 在电泳槽中加入 1×MOPS 至恰好浸没凝胶约 4mm 左右，每个孔加入 10~20ul 样品，80V 电泳 1.5 小时。

6.2.4 EB 溶液中浸泡 20 分钟，DEPC 水中浸泡 0.5~4 小时，紫外光灯下观察 RNA 分离的情况，比较 28SrRNA 和 18SrRNA 的含量。

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



scrc