

## M5 HiPer Rib5Green RNA Assay Kit

Product	Unit	Cat.#
M5 HiPer Rib5Green RNA Assay Kit	100 $\mu$ L	MF627-01
M5 HiPer Rib5Green RNA Assay Kit	5x100 $\mu$ L	MF627-05
M5 HiPer Rib5Green RNA Assay Kit	10x100 $\mu$ L	MF627-10

**【Storage】：**  
Shipped at 4°C.

**【产品介绍】：**

在分子生物学实验中，小量 RNA 的检测和定量是非常重要的步骤，其中包括体外转录 RNA 的产量检测、Northern 印迹分析前 RNA 浓度测定、S1 核酸酶化验、核酶保护分析/cDNA 文库构建、RT-PCR 和差异显示 PCR。

测量核酸浓度的常规方法是在 260 nm (A260)波长下测量核酸溶液的吸光值。这种方法的主要缺点是蛋白和游离核苷酸对光信号具有较大的干扰，无法区分 DNA 和 RNA。在核酸制备中经常发生的污染会引起这种干扰。一般来说，这种测量方法(浓度为 4  $\mu$ g/mL RNA 中 A260 =0.1) 不够灵敏。而应用荧光核酸染料能够避免很多由于核酸污染引起的问题。

Rib5Green 定量试剂，使研究人员能定量浓度低至 1 ng/mL 的 RNA (图 1),灵敏度超过了溴化乙锭 荧光分析 200 倍和 A260 方法 1000 倍。使用两种不同浓度的染料可测量的 RNA 浓度线性范围可达到 2.5 个数量级以上。使用单一浓度的 Rib5Green 试剂和推荐的操作方法，研究者能够定量检测浓度为 25 ng/mL 到 500 ng/mL 的 RNA。稀释 Rib5Green 试剂 10 倍或者更多，浓度测量范围在 1 ng/mL 和 50 ng/mL 的 RNA 溶液。即使 RNA 溶液中有几种常见杂质存在时仍能保持线性关系。在选择性的分析 RNA 时，尽管 DNA 上连接了 Rib5Green 试剂，在前处理中仍可以使用 DNA 酶来去除混合样品中 DNA。

**【自备仪器和试剂】：**

- 微型荧光计；； 1cm 石英比色皿
- Rib5Green dsDNA 定量检测试剂盒， 1mL 单位量的试剂浓缩液足够 2mL 体积的 200 次测定。
- 20X TE 缓冲液 (25 mL, 200 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, pH 7.5 , DEPC 处理水) 标准 16S 和 23S 核糖体 RNA (100  $\mu$ g/mL, 5 x 200  $\mu$ L 分装, 共 1 mL, 贮存于 TE 缓冲液中) 试剂足够 200 次使用 (可测量 RNA 浓度范围为 20 ng/mL 到 1  $\mu$ g/mL , 每次 2.0ml 用量)

**【操作步骤】：**

**3.1 概述**

在 Rib5Green RNA 定量检测中，为了获得完全的线性动力学范围，需要两种不同染料浓度。Rib5Green RNA 定量检测试剂提供了不同浓度的工作溶液，分别可以检测高浓度 (25 ng/mL 到 500 ng/mL RNA) 和低浓度 (1 ng/mL 到 50 ng/mL RNA)，如 3.3。

**3.2 缓冲液制备**

TE 缓冲液 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) 用来稀释 Rib5Green 试剂和 RNA 样品，必须保证 TE 缓冲液没有受到核酸及核酸酶的污染。在处理和准备各种材料及试剂时应使用一次性手套。所有的溶液应该存放在灭菌过的一次性的塑料瓶或无核酸酶污染的玻璃瓶中。应使用无核酸酶污染的吸管。包含在 Rib5Green RNA 试剂盒中的 20X TE 缓冲液是无核酸及核酸酶污染的。缓冲液可以用无核酸酶污染的纯水来稀释 20 X 浓缩 TE 缓冲液来获得 1X TE 工作液，无核酸酶纯水可通过蒸馏、用 0.1% DEPC(焦碳酸二乙酯)去离子获得，在 37°C 下孵育数小时并在 15 PSI inch 下灭菌 15 分钟可以去除 DEPC。

注: DEPC 可能是一种致癌物质，应谨慎处理。含胺类物质，例如 Tris，能够与 DEPC 快速反应，因此将此类物质加入到 DEPC 处理水中应在 DEPC 通过加热去除后再加入。加热去除 DEPC 对于阻止样品中 RNA 的羧化和羟基化也是很重要的。

### 3.3试剂制备

实验当天, 用 1X TE 缓冲液整数倍稀释 Rib5Green 浓缩液成 2X 工作液 (DMSO 包装贮存)。如果是高浓度检测, 稀释 200 倍, 例如: 要准备足够测量 20 个样品的工作液 (2 mL 体积), 可加 100  $\mu$ L Rib5Green<sup>®</sup>到 19.9 mL 1X TE 中; 如果是低浓度检测, 稀释 2000 倍, 例如: 要准备足够测量 20 个样品的工作液 (2 mL 体积), 可加 10  $\mu$ L Rib5Green<sup>®</sup>到 20.0 mL 1X TE 中。试剂配制在灭菌过的一次性的聚丙烯塑料瓶中会优于在玻璃瓶中, 因为玻璃表面可能会吸附试剂。因为 Rib5Green 试剂可能有光降解现象, 用铝箔纸封口并放置在暗处可保护工作液。工作液配制好后尽快使用, 在数小时内使用会取得最好的结果。

### 3.4 RNA 标准曲线

3.4.1 在塑料瓶中用无核酸酶的 1X TE 配制浓度为 2  $\mu$ g/mL RNA 溶液。用比色杯在 1cm 长度通路下测量该 RNA 溶液在 260 nm (A260)下的基本吸光值,  $A_{260} = 0.05$  相当于 RNA 浓度 2  $\mu$ g/mL。Rib5Green<sup>®</sup> RNA 定量试剂盒包括 16S 和 23S 核糖体标准 RNA, 浓度为 100  $\mu$ g/mL, 可以用 1XTE 稀释 50 倍成为 2  $\mu$ g/mL 的工作液。例如, 40  $\mu$ L 的标准 RNA 用 1.96 mL 的 TE 缓冲液稀释, 足够制作标准曲线时使用。推荐使用与待测 RNA 类型相同的纯化 RNA 作为标准制作标准曲线。一般来说, 等量的异源单链 RNA 能产生大致相等的荧光强度。在核苷、盐、尿素、乙醇、氯仿、去污剂、蛋白质和琼脂糖这些污染核酸试剂的复合物存在时, 线性关系仍可保持。但荧光强度可能会受到影响。因此, 制作标准曲线的 RNA 溶液和待测样品应该用相同的方法处理, 使得样品和标样中杂质的含量水平相当。

3.4.2 制作高浓度标准曲线时, 通过稀释 2  $\mu$ g/mL RNA 溶液配制一系列的 2X 终浓度 RNA 标准溶液至一次性玻璃容器或者无核酸酶的塑料管中, 最后转移到小细胞管中。(见表 1)。

2XRNA溶液浓度ng/mL	2XRNA溶液体积(mL)	2X低浓度工作液体积(mL)	Rib5Green试剂测定中RNA的终浓度(ng/mL)
1000	1	1	500
200	1	1	100
100	1	1	50
50	1	1	25
0	1	1	空白

表 1 用 10×10mm 比色杯时高浓度 RNA 标准曲线

制作低浓度标准曲线时, 通过稀释 2  $\mu$ g/mL RNA 溶液配制一系列的 2X 终浓度 RNA 标准溶液, 至一次性玻璃容器或者无核酸酶的塑料管中, 最后转移到小细胞管中。(如表 2)。

2XRNA溶液浓度ng/mL	2X RNA溶液体积(mL)	2X低浓度工作液体积(mL)	Rib5Green试剂测定中RNA的终浓度(ng/mL)
100	1	1	50
50	1	1	25
20	1	1	10
10	1	1	5
2	1	1	1
0	1	1	空白

表 2. 用 10x10 mm 比色杯时低浓度 RNA 标准曲线

3.4.3 等体积混合 2X Rib5Green 试剂工作液 (如 3.3 配制)和 2X RNA 标准溶液, 高浓度工作液 (200 倍稀释) 只能用于高浓度检测, 低浓度工作液 (2000 倍稀释) 只能用于低浓度检测。避光于室温下孵育 2-5 分钟。要确保小细管中加入了足够体积的测量液, 对 10x10 mm 比色杯来说, 不能低于 2 mL, 对 Minicell Adaptor Kit 不能低于 50  $\mu$ L。

3.4.4 选择 微型荧光计的蓝色激发光模式, 用荧光值最大的样品校正仪器 [注意: 为了获得最佳的检测灵敏度, 高浓度和低浓度应该分开测量]。测量剩余样品的荧光值, 微型荧光计将给出一个读数, 数据可以用来产生对 RNA 浓度的标准曲线。

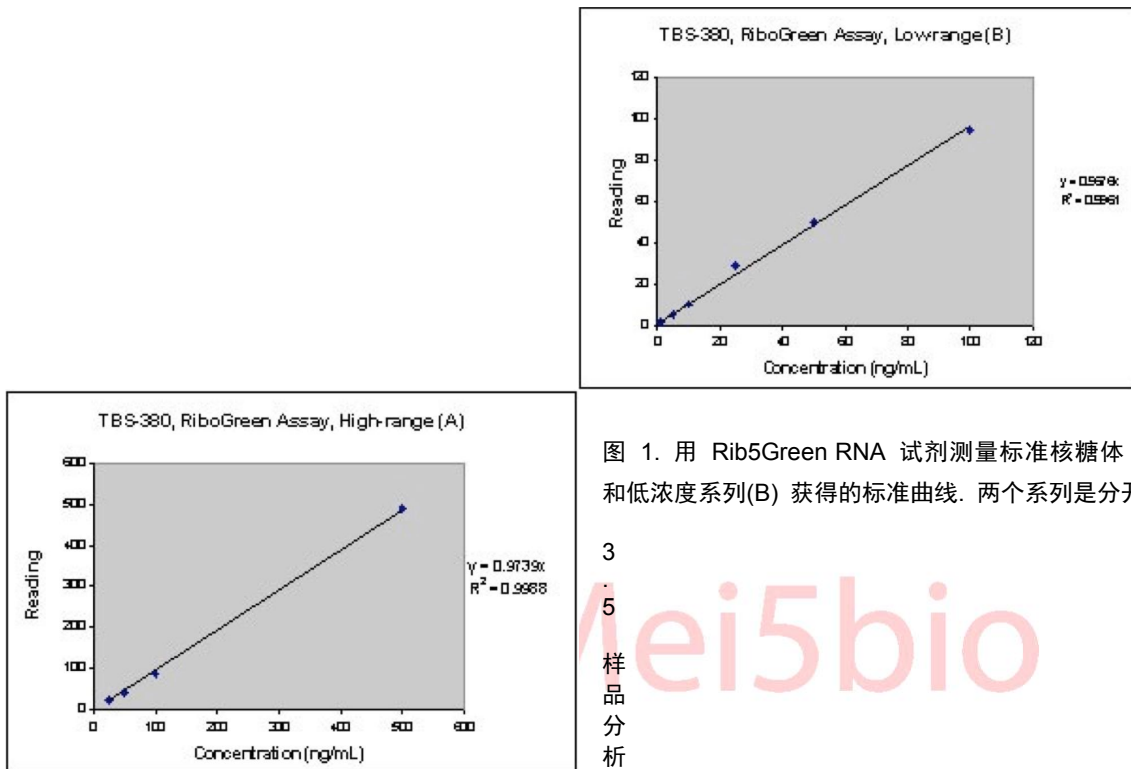


图 1. 用 Rib5Green RNA 试剂测量标准核糖体 RNA 高浓度系列 (A) 和低浓度系列(B) 获得的标准曲线. 两个系列是分开测量的。

3

5

样品  
分析

3.5.1 用 1X TE 缓冲液稀释样品到合适体积(1.0 mL 到 10x10 mm 比色杯或 25-100  $\mu$ L 到小细管)。每个实验配制几个不同浓度可能更好, 多稀释几个浓度有助于降低特定污染物的干扰作用。然而, 也要避免特别小的体积, 因为难以准确测量。另外, 同一个实验中, 杂质水平尽量保持一致, 要降低杂质引起的样品之间信号差异。例如, 如果一系列 RNA 样品含盐浓度相差很大, 那么它们就无法用一个简单的标准曲线来进行比较。为了避免这样的问题, 所有样品中杂质浓度应该相同, 如果可能, 请参照 3.6 如何降低样品中 DNA 相关信息。

3.5.2 每个样品中加入等体积的 2X Rib5Green 测量试剂 (如 3.3), 室温下避光孵育 2-5 分钟。

3.5.3 测定每个样品的荧光值, 仪器条件与制作标准曲线时相一致, 参照 3.4.4

### 3.6 去除样品中 DNA

Rib5Green reagent也可以结合DNA, 样品前处理中可以用无RNA酶的DNA酶来去除DNA和Rib5Green reagent 结合产生的荧光干扰, 确保样品中的荧光全部来自试剂和 RNA 的结合。

3.6.1 准备 10X DNase buffer: 无核酸酶的 200 mM Tris-HCl, pH 7.5, 含100 mM  $MgCl_2$  和20 mM  $CaCl_2$ 。

3.6.2 向每个含DNA样品中加0.11倍体积的10X DNase buffer(例如, 如果样品为9mL, 就加入1mL的10X buffer)。

3.6.3 按照 1 mg DNA 添加 5 u 无 RNase 的 DNase I。

3.6.4 37°C 孵育 90 分钟。

3.6.5 用TE缓冲液稀释至少 10 倍稀释样品以降低 Rib5Green测量中盐的干扰。

3.6.6 按照上述步骤进行 Rib5Green 分析

**Please note: All products are "FOR RESEARCH USE ONLY AND ARE NOT INTENDED FOR DIAGNOSTIC OR THERAPEUTIC USE"**

---

