

# N4 RNA 電泳與 Northern 轉印

王愛玉

RNA 電泳與 northern 分析是探討基因表現常用的方法，在本實驗中，我們將以純化自大腸桿菌及水稻懸浮培養細胞的 RNA 為材料，來練習 RNA 電泳及將膠片中的 RNA 轉印至尼龍膜。

## 4.1 背景知識

### 4.1.1 變性瓊脂糖膠體電泳

由於 RNA 為單股，很容易形成二級結構，因此在進行膠體電泳時，需加入 glyoxal 或 formaldehyde 等變性劑 (denaturant)，使 RNA 分子內的氫鍵打開，破壞二級結構，才能得到良好的分離效果。本實驗使用的 RNA 變性劑為 glyoxal/DMSO，在微酸性條件下，glyoxal 的兩個醛基可與 guanosine 反應形成環狀化合物而阻止 RNA 分子內氫鍵的生成。以往用於分離 glyoxylated RNA 之電泳緩衝液為磷酸緩衝液 (10 mM, pH 7.0)，在電泳過程中，陰極附近的 pH 值會逐漸升高，必須藉由循環系統將兩極之緩衝液混合，在操作上較繁複，目前藉由更換較穩定的電泳緩衝液已可克服此問題。

### 4.1.2 Northern 分析

Northern 分析包括兩個過程：轉印 (blotting) 與雜合 (hybridization)。前者是將 RNA 由電泳膠片中轉移至轉印膜上，後者則是利用經過特殊標幟的單股 DNA 或 RNA 與膜反應，以分析目標基因之 mRNA 含量或大小。

#### a) 轉印：

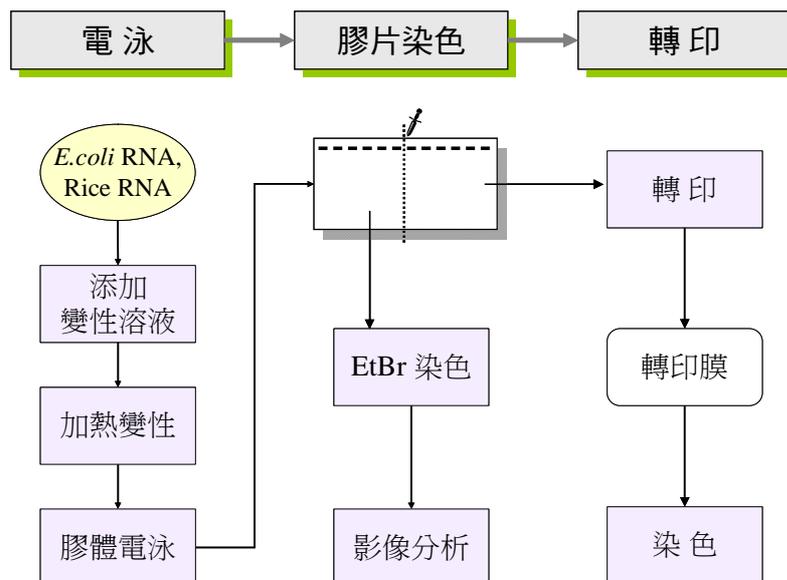
- 1) 轉印方法：將 DNA 或 RNA 由瓊脂糖膠體中轉印至轉印膜，可以利用毛細轉移法 (capillary transfer)、electroblotting, vacuum blotting, semidry blotting 等不同方法。本實驗所用的方法為傳統的毛細轉移法，是把膠體置放在濕濾紙上，濾紙兩端垂浸於緩衝液中，膠體上再依序放上轉印膜、濾紙及一疊乾的吸水紙。由於毛細現象使緩衝液由下往上移動，膠體中的 RNA 隨著液體的流動被牽引轉移至轉印膜上。毛細轉移法主要的缺點是需時較長，但由於不需任何儀器，並且具備轉移效率高之優點，使之仍為最普遍使用的方法。
- 2) 轉印膜：早期使用的轉印膜為硝化纖維膜 (nitrocellulose membrane)，RNA 或

DNA 可與硝化纖維形成疏水鍵而固定於膜上。然而硝化纖維膜有許多缺點，包括：容易碎裂、對於核酸的結合容量 (binding capacity) 不佳、需大於 400 nt 的核酸才能結合於膜上等，常造成使用上的問題。目前較常用的轉印膜為不帶電荷的尼龍膜 (uncharged nylon) 或帶正電荷的尼龍膜 (positively charged nylon)，可避免硝化纖維膜易碎及結合容量低的問題。此外，核酸與尼龍膜之間可形成共價鍵，比較不容易由膜上脫落。

- b) 雜合反應：此反應是利用雙股核酸間的氫鍵可被破壞及再生成的特性。兩股核酸間的氫鍵可藉由改變溫度、pH 值、離子強度等因素被破壞而形成單股結構，但在適當條件下，單股核酸與其原來互補股可回復形成原雙股結構，也可與其它不同來源但具有互補序列的單股核酸形成氫鍵，而形成雙股或部分雙股結構的雜合 DNA (hybrid DNA)。因此，藉由變性膠體電泳分離 RNA，並將 RNA 轉印到尼龍膜上之後，把與目標基因的反義股 (antisense strand) 具有相同序列的單股核酸 (DNA 或 RNA) 與轉印膜進行反應，反義股核酸即可粘合在目標基因所轉錄出的 RNA 上。此反義股核酸稱為探針 (probe)，探針上必須有放射性標幟或 biotin、digoxigenin 等非放射線標幟，才能夠偵測出探針的結合。進行雜合反應之後，還需以適當離子強度的緩衝液，在適當溫度下清洗尼龍膜，以去除非專一性結合的探針。

### 4.1.3 實驗大綱

#### N4 RNA 電泳與 Northern 轉印



## 4.2 實驗操作—以變性膠體電泳分離大腸桿菌及水稻懸浮培養細胞 RNA

### 4.2.1 儀器設備：

- a) 迷你電泳槽及鑄膠器 (Mupid II)
- b) UV transilluminator 及膠片影像分析系統
- c) 防護面罩
- d) 55°C 水浴鍋或乾式恆溫槽
- e) 冰浴桶

### 4.2.2 藥品試劑：

- a) RNA 樣品：由 *E. coli* HMS174 所抽取得的 total RNA，標示為 *E. coli* RNA；由水稻懸浮培養細胞抽取得之 RNA，標示為 Rice RNA。
- b) 10×BPTe 緩衝液：100 mM PIPES, 300 mM Bis-Tris, 10 mM EDTA (pH 8.0)，以 diethylpyrocarbonate [DEPC, 終濃度為 0.1% (v/v)] 處理過。
- c) 1×BPTe 電泳緩衝液：將 10×BPTe 緩衝液以 DEPC 處理過的水（以下簡稱 DEPC-dH<sub>2</sub>O）稀釋。
- c) RNA 變性溶液：取 6 mL DMSO, 2.2 mL deionized glyoxal, 1.2 mL 10×BPTe 緩衝液及 0.6 mL 80% glycerol，混合均勻後，分裝於微量離心管中，貯存於 -70°C 冰箱。
- e) RNA loading buffer：95% (v/v) deionized formamide, 0.25% (w/v) bromophenol blue, 0.25% (w/v) xylene cyanol FF, 5 mM EDTA (pH 8.0), 0.025% (w/v) SDS。
- f) Ethidium bromide。

### 4.2.3 操作步驟：

清理電泳槽及鑄膠槽：（此部分已請助教準備好）

- 1) 將電泳槽、鑄膠槽及 comb 以清潔劑清洗乾淨，以 milli-Q 水徹底潤洗。
- 2) 將 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 注滿電泳槽及鑄膠器，浸泡 10 分鐘後，以 DEPC-dH<sub>2</sub>O 徹底潤洗。

膠片製備：（此部分已請助教製備好）

- 3) 每組製備一片 12-well 1.2% agarose gel：秤取適量 agarose 粉末後，加入 1×BPTe 電泳緩衝液（大片 Mupid II 膠片約需 40 mL），以微波爐加熱溶解後，置 55°C 水浴降溫。
- 4) 將膠體溶液倒入鑄膠模，插上齒模，置室溫至少 30 分鐘使凝結。

準備 RNA 樣品：

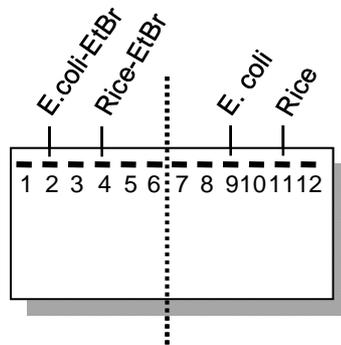
- 5) 每一組有兩管 RNA 樣品，分別標示為 *E. coli* RNA 與 Rice RNA，其內各含

4  $\mu\text{L}$  RNA (RNA 含量為 30  $\mu\text{g}$ )。

- 6) 每管加入 20  $\mu\text{L}$  RNA 變性溶液，以 tip 吸放溶液使混合均勻。
- 7) 置 55°C 反應 1 小時 (等待期間，請至教室上課)。
- 8) 將各管移置冰浴中 10 min 後，離心 5 秒使溶液集中管底。
- 9) 每管加入 2  $\mu\text{L}$  RNA loading buffer，以 tip 混合均勻。各吸取 11  $\mu\text{L}$  至裝有 EtBr 的微量離心管 (分別標示為 *E.coli*-EtBr 及 Rice-EtBr) 中，混合均勻。立即進行步驟 11。

電泳：

- 10) 小心拔開齒模，將膠片置於電泳槽中，倒入 1×BPTE 電泳緩衝液，直至溶液蓋過膠片。
- 11) 四管 RNA 樣品，分別取 10  $\mu\text{L}$  RNA，依下圖順序加入樣品槽中。蓋上電泳槽蓋。以 50 V 進行電泳。(等待期間請先進行 4.3.3 步驟 1-5 尼龍膜預處理)



- 12) 待追蹤染劑 bromophenol blue 行進至膠體三分之二處時，關閉電源，取出膠片，如上圖將膠片由第 6 及第 7 行間切割成兩半，左半直接觀察 RNA 色帶，另一半進行 Northern 轉印 (4.3)。  
(單數組先觀察色帶，雙數組先進行轉印。)

## 4.3 實驗操作—Northern 轉印

### 4.3.1 儀器設備

- a) 染色盤或染色缸
- b) 長型玻璃板與玻璃缸
- c) 80°C 烘箱或 UV crosslinker

### 4.3.2 藥品試劑：

- a) 20×SSC：3.0 M NaCl, 0.3 M sodium citrate, pH 7.0。
- b) Nylon membrane：Immobilon-Ny+ Transfer Membrane (Millipore Corporation)

- c) Whatman 3MM 濾紙
- d) 吸水紙
- e) Methylene blue 染劑: 0.04% methylene blue 溶於 0.5 M sodium acetate (pH 5.2)。

#### 4.3.3 操作步驟：

尼龍膜預處理：

- 1) 戴手套，將 Nylon membrane 剪裁成膠體大小，在角落剪一缺口作記號。另裁剪數張較膠體稍小之 3 MM 濾紙。
- 2) 取兩個乾淨未用過的培養皿，分別倒入 DEPC-dH<sub>2</sub>O 及 20×SSC。
- 3) 將尼龍膜輕放在第一個培養皿之水面上，讓尼龍膜慢慢濕透。
  - ◆ 不要把尼龍膜直接浸於水中，以避免空氣陷在膜孔。
- 4) 待尼龍膜完全濕透後，稍加震盪培養皿使膜完全浸於水中。
- 5) 將膜移至裝有 20×SSC 的培養皿中，使膜浸於其中平衡至少 5 min。

膠片處理：

- 6) 將電泳後之膠片以 DEPC-dH<sub>2</sub>O 潤洗。

組合膠片與膜：

- 7) 取一玻璃缸，加入 20×SSC。將一塊長形玻璃板架在缸上，裁剪一張長形 3 MM 濾紙，寬度須略大於膠片，將濾紙置於玻璃板上，使濾紙兩端順著玻璃板垂入缸內溶液中。加一些 20×SSC 於濾紙上使其溼透，並趕掉濾紙與玻璃板間的氣泡。
- 8) 將膠片置於濾紙上，趕掉氣泡，小心將尼龍膜蓋在膠片上，不要有氣泡產生。再依序蓋上三張以 20×SSC 浸溼的濾紙及兩張乾的濾紙，並以保鮮膜將膠片四週封住。最後覆蓋一疊約 10 cm 的吸水紙，上面放一塊玻璃板或塑膠板，以約 300 g 重的東西壓住即可。在室溫下靜置過夜。
- 9) 轉印後，小心移去重物、吸水紙、3 MM 濾紙，以鉛筆在尼龍膜上相對於樣品槽的位置作記號，並在角落寫上組別。將膜掀開，以 6×SSC 潤洗，以去除附著在膜上的膠體。

Methylene blue 染色：

- 10) 將尼龍膜置入含有 methylene blue 的染缸中，稍加搖動，直至色帶出現為止。
- 11) 將膜置於 0.2×SSC/1%SDS 溶液中脫色 15 min 後，將膜置於濾紙上乾燥。

固定 RNA 於膜上：

- 12) 將乾燥的尼龍膜，移到兩張乾淨濾紙中間，濾紙四周以迴紋針夾好後，置於 80°C 烘箱烘烤 1~2 小時。膜可夾於兩張濾紙間，置於乾燥箱中存放，或直接進行雜合反應。
  - ◆ 若不進行染色，則直接進行步驟 12。亦可將乾燥的尼龍膜以 UV 光進行 crosslinking，固定 RNA 於膜上後，再進行 methylene blue 染色。

## 4.4 結果與報告：

### 4.4.1 結果報告：

- a) 說明 RNA 電泳及轉印的結果，包括每一種 RNA 樣品出現的主要色帶有幾條，分別為何？EtBr 與 methylene blue 染色結果有何異同？兩種 RNA 樣品結果是否有差異？

### 4.4.2 問題與討論

- a) 說明在 RNA 實驗操作過程中應注意的事項。
- b) 實驗過程中，是否觀察到一些特殊現象？
- c) 說明在實驗過程中你遇到的問題，並請提出可能的解決方法。
- d) 說明在 RNA 樣品中添加 glyoxal 的目的。
- e) 為何此實驗中用到的水要用 DEPC 處理？
- f) 在電泳膠片上是否可看到 mRNA 與 tRNA 的色帶？為什麼？
- g) 兩種 RNA 樣品結果有什麼不同？為什麼？
- h) 若將 N2 實驗中得到的 PCR 產物 (*lacZ* 基因片段) 進行放射線或非放射線標幟後，作為探針，與此實驗得到的轉印膜進行雜合反應，你預期可得到什麼結果？請詳細討論各種情形及可能性。

## 4.5 參考文獻：

Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR (1977) Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5350-5354.

Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3<sup>rd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Shapiro R, Hachmann J (1966) The reaction of guanine derivatives with 1,2-dicarbonyl compounds. *Biochemistry* 5: 2799-2807.

Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98:503-517

User guide of Immobilon-Ny+ Transfer Membrane, Millipore Corporation.

## N4 RNA 電泳與 Northern 轉印 實驗報告

班次：\_\_\_\_\_ 組別：\_\_\_\_\_ 姓名：\_\_\_\_\_ 學號：\_\_\_\_\_

### I. 實驗目的：

(簡要列出本實驗之目的)

### II. 材料與方法：

(列出主要實驗材料及主要方法)

◆ I、II 兩項敘述以一頁為限。

### III. 實驗結果：

RNA 電泳結果及轉印結果：

(說明並附上電泳圖)

### IV. 問題與討論：

回答第 6 頁所列的問題。