



· 导读版 ·

RNA Methodologies

A Laboratory Guide for Isolation and Characterization

RNA研究方法

分离鉴定RNA的实验指导
(第三版)

Robert E. Farrell, Jr.



原版引进



科学出版社

www.sciencep.com

RNA METHODOLOGIES

A Laboratory Guide for Isolation
and Characterization

3rd Edition

RNA 研究方法

分离鉴定 RNA 的实验指导

(第3版)

Robert E. Farrell, Jr., Ph. D.

Pennsylvania State University

York, PA

江苏工业学院图书馆
藏书章

科学出版社

北京

图字:01-2006-7336 号

This is an annotated version of

RNA Methodologies: A Laboratory Guide for Isolation and Characterization

Robert E. Farrell, Jr.

Copyright © 2005, Elsevier Inc.

ISBN 0-12-249696-5

All rights reserved.

No part of this publication may be reproduced or transmitted in any form or by any means, electronic or mechanical, including photocopy, recording, or any information storage and retrieval system, without permission in writing from the publisher.

AUTHORIZED EDITION FOR SALE IN P. R. CHINA ONLY

本版本只限于在中华人民共和国境内销售

图书在版编目(CIP)数据

RNA 研究方法:英文/(美)法雷尔(Farrell, R. E.)编著. —影印本.
—北京:科学出版社, 2007

ISBN 978-7-03-018228-9

I. R… II. 法… III. 核糖核酸—研究方法—英文 IV. Q522

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2006)第 148100 号

责任编辑:孙红梅/责任印制:钱玉芬/封面设计:耕者设计工作室

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

中国科学院印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2007年1月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2007年1月第一次印刷 印张:50 1/2

印数:1—2 500 字数:1 197 000

定价:98.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈科印〉)

导 读

《RNA 研究方法》(RNA Methodologies) 是 RNA (核糖核酸) 的分子生物学和细胞生物学实验方法的汇编。这本书汇集了有关 RNA 的各种实验方法, 包括分离提取、纯化、鉴定、生物活性的检验, 以及通过对细胞内 RNA 状态的分析研究细胞基因的转录及其调控。这些方法从基本的到精细的、从简单的到复杂的, 几乎都有涉及, 是一本相当全面的 RNA 实验指导书, 可供所有从事与 RNA 有关的研究工作的人员使用。本书共分 26 章。第 1~3 章简要介绍了 RNA 的细胞生物化学和分子生物学的基本原理, 着重讨论了 RNA 的构象问题和各种因素对 RNA 构象的影响、分子生物学中心法则、真核细胞基因的转录和组织, 以及信使 RNA(mRNA) 的结构和细胞内状态。第 4 章到第 8 章为 RNA 分离鉴定的基本策略和 RNA 制品的质量控制。这里专门用一章的篇幅, 叙述去除或抑制 RNA 提取中最难对付的破坏因子——核糖核酸酶 (Ribonuclease, RNase) 活力的各种方法。此外也详细讲述了 RNA 分离提取的常用策略、带 poly(A) 尾的 RNA 的分离方法等, 如利用磁珠和亲和层析柱分离 poly(A)⁺RNA 的方法, 及如何分离提纯不带 poly(A) 尾的 mRNA。第 9 章至第 15 章叙述 RNA 制品的分析方法和实验数据的记录方法, 包括日常用到的照相和显影方法。所叙述的 RNA 分析方法有: 点杂交、Northern 杂交、RNA 电泳; 用于这些分析方法的核酸探针的制备; 检测 RNA 的原理等。本书强调指出, 基因表达, 亦即 RNA 的转录、翻译, 和通过控制转录、转录后加工和翻译来进行的对基因表达的调控, 是细胞生命现象极重要的表现。因此, 本书用第 16 章及以后各章的篇幅详细叙述对细胞内 RNA 的状态的定性和定量分析, 以及研究细胞基因表达及其调控的各种实验方法。这里叙述的既有常用的方法如抗核酸酶检验, 也有近年来发展起来的研究方法, 如差异显示、定量 PCR、实时 PCR、相减 PCR、RNA 干扰、高通量微阵列分析等。本书最后一章 (第 26 章) 讲述了研究某个 RNA 时的一般研究策略, 即全面地研究某种 RNA 时应当进行哪些方面的工作。本章也介绍了各种查找文献和技术资料的方法, 包括通过查找 NCBI 的 PubMed 网站查阅登在期刊上的文献、从各种生物技术公司的网站下载有关实验技术的方案文件、上网查找各种生物科学技术讲习班 (workshop) 的资料, 等等。

本书附有 18 篇附录, 有实验常用的试剂的配制方法; 各种实验仪器的原理和应用; 最基本的实验操作包括凝胶电泳等及其注意事项, 以及试剂和仪器的供应厂商 (这些厂商中不少在中国也有分支机构或代理商), 以便于研究者开展日常工作。

本书的一大特色是书中通篇充满了作者自己多年积累的研究实践经验。特别是在叙述各种方法的时候, 作者并不是像一般实验书籍那样平淡地描写方法, 而是着重强调了许多需要注意的地方。如 RNA (和 DNA) 的酚抽提, 这是核酸提取实验中再基本不过的一步, 但是初学者往往不能很好掌握, 经常造成核酸损失。许多实验手册对此方法并没有做太详细的介绍, 而是一带而过。本书则在“尾声”中详细讲述了注意事项, 还特地附了一张插图, 说明如何正确使用移液枪吸出抽提液的上相, 从而实现定量转移核

酸，以避免损失。这些要点，对于 RNA 实验的初学者来说，是极为宝贵的。又如对于做好实验记录这样最起码的事情，本书也给出了建设性的意见。因此，本书适用于广大的分子生物学实验室工作者，但更适合于初次接触 RNA 实验的人，如大学高年级学生、研究生、实验师和技术研究人员。

本书的第二大特色，是对于各种 RNA 实验中可能出现的失败或不顺利之处，提供了很多解决办法。凡是接触过 RNA 的人都知道，RNA 的重要性质之一就是对广泛存在的核糖核酸酶敏感，又对高 pH 敏感，因而花费了许多精力提取出来的 RNA 制品，性质非常不稳定，甚至几天就降解掉了。其他 RNA 实验也大多不那么容易做好。而本书中的解决问题的方法 (troubleshooting)，就给读者以多方面的提示，使读者在实际操作中少走弯路，也为读者提供了多方面的思路和启发。可以说，这些提示，有时甚至比了解方法的内容本身还重要。

本书的又一特色，是详尽地、客观地叙述了最近几年非常热门的高通量芯片分析和 RNA 干扰等新方法。众所周知，当高通量芯片法问世时，几乎形成了一种“热潮”，许多科学家对它推崇备至。但是，芯片法并不是万能的。因此，特别是对于广大的初学者，在这时候最需要的是对此方法的客观的、批判性的介绍，以对其全面了解。本书正是如此，既指出了芯片法的优点，也指出了它的缺点。对于 RNA 干扰法，本书从原理到实验设计都作了非常详细的介绍。这对于科研工作者是十分有益的，他们可以依据这些介绍来更好地设计自己的实验。

本书末尾带有很多附录，查阅方便，可以说这也是本书的一大特色。

我在这里想指出的是，虽然本书是一本实验指导书，所讲述的都是具体的 RNA 实验研究的方法，但它的读者绝不仅限于只是从事 RNA 实验的工作人员。许多在平时工作中也接触到 RNA 的概念，但是没有条件或很少能够亲自动手进行 RNA 实验的人们，比如其他专业的科学工作者、工农业技术人员、中学生物学教师、临床医生、科普作家、科学出版物的编辑、大学低年级学生，只要能够阅读专业英语文章，都可以翻阅这本书。这样能够弥补自身知识的不足，了解分子生物学家们是怎样进行研究工作的，同时也能够从中感受到从事科学工作（实际上是一切工作）所必需的严谨认真、实事求是的精神。特别是对于有志从事生命科学研究的青年们，多看看这样的书是很有益处的（虽然不一定能全部看懂；但有不懂的地方正能推动自己去阅读更多的书）。

* * * * *

自从上世纪 50~60 年代以来，RNA 的研究就逐渐摆脱了单纯地、孤立地研究这种生物大分子的状态，而迅速与在微观尺度揭示生命的整个过程的科学——分子生物学融为一体。分子生物学发展到今天，尤其是当各国科学家联合开展并顺利完成了可说是迄今为止，最大规模的分子生物学的协作研究——人类基因组计划的时候，细胞内微观世界的活动已经开始（虽然还不太清晰）展现在我们面前了。在研究方法方面，由于人类基因组计划中克隆到了大量的人类基因及其相关序列，目前大多数（如果不说全部）人类基因，包括许多基因变体、伪基因和调控元件，已经被克隆，并通过几家重要的生物技术公司出售给各国科学工作者使用。这就极大地简化了科学工作者花费在克隆上的劳动（自己克隆一个基因往往很费时、费力，需要花费大量费用），对于国际分子生物学研究是一项伟大的贡献。细胞内小分子 RNA（微 RNA，microRNA）的发现，则使

科学家对 RNA 调控的复杂机制有了新的认识，也由此诞生了 RNAi 这种新颖的研究基因表达调控的方法。但是，目前科学家所能解答的问题，还是远远不如实验结果向我们提出的新的问题多。要在这方面取得新的进展，重要的一环就是发明和发展出新的、更强有力的对 RNA 以及其他生物大分子的分析方法，尤其需要大力发展能在活体内，实时、直接分析 RNA、DNA、蛋白质的生命活动和相互作用过程，且易于操作、简便易学的新方法。在数学研究领域，由于缺乏更强大的数学工具，哥德巴赫猜想的证明现在只能停留在陈景润的“一加二”；而在分子生物学领域，也可以说，研究的进展越来越受到研究方法的制约。分子生物学者（尤其是研究生）日常工作的大半、甚至绝大部分时间，消耗在了研究方法的摸索、建立、优化、熟悉和掌握上。因此，新方法的探索和发现将是分子生物学、乃至 RNA 功能研究加速发展的关键。可以预料，这样的方法一定是现代物理学、现代化学、以及其他现代科学技术诸如空间科学等，与现代生物学相结合的产物。

另一方面，分子生物学，包括 RNA 研究越是发展，生命的精细结构和精密活动就越是令人惊叹不已。而创造生命的自然界的无法形容的伟大，更是我们现在所无法完全了解的。我们必须承认，自然界的宏伟无垠的创造力即使现在也是人类的智力所远远不及的。因此，我们必须努力，尽我们所能地深入研究自然界，理解自然界，利用自然界为我们人类——也是自然界的一部分——的发展服务，包括提升人类自身的智慧。我想，这就是本书编著者在前言结尾所引用的那句拉丁文的深刻含义。

刘定干 研究员
中国科学院上海生命科学研究院
生物化学与细胞生物研究所
2006 年 11 月 14 日

前 言

为什么研究 RNA? 当 *RNA Methodologies* 的第一版在 1993 年付印时, 这个问题就提出来了。分离有生物活性的、化学稳定的 RNA, 一直是分子生物学的一项主要技术, 在今天甚至更加重要, 虽然这一点尚未被充分认识。不过, 本书第二版出版后, 情况改变了很多。人类基因组计划的完成宣告了以前未知的学科——功能基因组学和蛋白质组学的诞生。研究者们现在正在愉快地探索转录组、蛋白质组、代谢组, 以及——我们别忘了——基因组。

很清楚, 组织专一的基因的表达调控仍然是一个令人们大感兴趣的领域, 而昂贵的、印在尼龙滤膜或玻璃芯片上的微阵列的运用, 又往大家的兴趣之火上浇了不少的油。但是, 只有从适当的生物中提取出了高质量的 RNA, 并且这些 RNA 能够支持逆转录并在其他辅助检验中发挥功能, 才可能应用基于标准的定量 PCR 的检验方法, 以及这些类型的分析方法。这里也应当注意到, 虽然微阵列技术的确已在现代研究工具中占有一席之地, 但是它探查的都是已克隆的基因; 这一技术不直接支持检测或鉴定尚未鉴定的基因、剪接方式不同的转录物, 或有多个起始位点的转录物。

因此, 作为基因表达的一个参数的 RNA 的研究, 仍然是许多实验室中的主要工作。对 mRNA 生物合成的精密调查, 使我们能够透视复杂的 RNA 管弦乐队的精巧演奏, 从而能对细胞生物化学有独特的洞察力。与传统的检验方法相配合, 各种 PCR 方法的改进继续提供着灵敏度和分辨率无与伦比的手段, 以鉴定细胞中的转录活力。mRNA 的生物合成、成熟和功能受到转录和转录后的影响, 这些过程一起构成基因调控的众多的检查点。因此, 很清楚, RNA 的稳定性和加工在细胞内起着中心的调控作用。

把 RNA 特征的众多方面综合成一种从头到尾相互关联的形式, 仍然是科学家必须完成的任务。为更清晰地定义基因表达调控的至少一个方面而设计的研究, 其基本的起点就是从来源生物提纯高质量的 RNA。虽然许多较传统的技术, 包括 Northern 分析, 已经为更新更灵敏的方法所超越, 但是, 深思熟虑的、适当的 RNA 的提取, 还是与以后分析和制备纯 RNA 的操作同样重要。只有小心翼翼地处理 RNA 才能成功运用这些技术, 无论这些 RNA 是提取自培养细胞还是直接提取自整个组织。

本实验指导书着重阐述大量不断增多的、经过预实验和检验, 并已优化了的分离鉴定真核 RNA 的实验方案; 原核转录物的鉴定则没有过多阐述。本书第三版比较值得关注的增补内容, 包括各种商业化的新的和改进的 PCR 技巧、革新性的 5' 和 3' RACE、相减 PCR 方法、改良互补 DNA (cDNA) 合成的方法, 以及介绍更新的 RNA 干扰 (RNAi) 技术、微阵列和生物信息学的章节。今天, 人们对定量测定细胞内特定转录物的绝对丰度抱有前所未有的兴趣, 因此这些方法就特别重要。显然, 本书的重点在于把 RNA 作为基因表达的一个参数进行研究, 重点在于怎样应用这些方法, 不论是单独使用还是联合其他检验方法, 来研究真核基因的转录和转录后调控。我们可能提供的最好的建议如下: 在实验中总要提前考虑好两步, 并且要深思熟虑: 所采用的 RNA 提取

方法会怎样影响以后的方案和结果的解释。

本书适合于研究组长、实验科学家、医生、兽医、研究技术员、研究生，以及所有有能力进行基础技术研究的人。本书希望提供理论基础，以协助一切世故程度的人——从新手到老练的科学家——做出决定，同时提供可操作的多种方法，供大家有选择地达到同样的研究目标。本书中很多注解和提示都是来自作者个人的经验，并为从各种生物来源适当地回收 RNA 铺平道路，特别是从那些富含核糖核酸酶的来源。不踏实的 RNA 鉴定技术早晚要导致资源的浪费，因为显然其从研究一开始就不懂得“什么”和“为什么”。虽然本书决不是基因表达基本原理的全面复习，但在这里反复提到的主题乃是处理和检验 RNA 的正确途径。这些章节还清楚地证明，一种仔细选择的技术是如何适合于核酸研究的宏大计划。虽然我希望读者从头到尾研读全书，但读者也可以取出一些凸现的方案，而不失去连续性。如果读者对于从全面的 RNA 分析来研究细胞生物化学还是新手，则可以先从阅读第 26 章（RNA 一例）入手，会对理解有所帮助。

总的说，本书各章共同生动讲述 RNA 的故事，每章都提供了易懂的一课。本书随处可见的流程图、表格和示意图，便于读者学习，并能协助研究项目的计划和实施。研究者仅仅受到他或她的独创性的限制。

* * *

我深切地感谢我的同事和朋友们的充满睿智的鼓励。他们以各种方式支持了本书的写作。在这里，我还要特别感谢我的家人对我的支持和耐心。

对主的敬畏即智慧之开端*

（刘定干 译）

译者注：* 原文为拉丁文。

*For Catherine Ann,
Sean Patrick, Emma Catherine, Liam Michael, and Patrick Joseph*



Preface

Why study RNA? This question was posed as the first edition of *RNA Methodologies* went to press in 1993. The isolation of biologically competent and chemically stable RNA continues to be a central, although somewhat unappreciated, procedure in molecular biology, which has even greater relevance today. However, much has changed since the second edition of this book was published. The completion of the human genome project has heralded the previously unknown disciplines of functional genomics and proteomics. Researchers now regularly explore the transcriptome, the proteome, the metabolome, and, lest we forget, the genome.

It is clear that the regulation of tissue-specific gene expression remains an area of intense interest fueled in no small measure by the availability of pricey microarrays printed on both nylon filters and on glass chips. These types of analyses, as well as standard quantitative PCR-based assays, are possible only when high-quality RNA is isolated from the proper biological source, is able to support reverse transcription, and is able to function in other ancillary assays. It is also worth noting here that, although microarray technology certainly has a place among contemporary research tools, the sequences that are scrutinized represent genes that have already been cloned; the technology does not directly support the detection or identification of previously uncharacterized genes, differentially spliced transcripts, or transcripts with multiple start sites.

Thus, the study of RNA as a parameter of gene expression remains a staple in many laboratories. Scrutiny of mRNA biogenesis affords a unique look at the cellular biochemistry from the perspective of the exquisite orchestration of RNA complexity. Coupled with traditional methods for assay, variations on the PCR theme continue to afford a means of unparalleled sensitivity and resolution for the characterization of transcriptional activity in the cell. mRNA biogenesis, maturity, and function are influenced transcriptionally and posttranscriptionally, and together they constitute myriad gene regulation control points. Thus, RNA stability and processing clearly play central regulatory roles in the cell.

There remains an academic imperative to unify the numerous facets of RNA characterization in a coherent start-to-finish format. The purification of high-quality RNA from biological sources is a fundamental starting point for investigations designed to give clearer definition to at least one aspect of the regulation of gene expression. Although many of the more traditional techniques, including Northern analysis, have been overshadowed by newer, more sensitive approaches, the thoughtful and expedient isolation of RNA is equally as important as the subsequent analytical and preparative manipulations of the RNA in purified form. Whether isolated from cells in culture or directly from whole tissue, only the meticulous handling of RNA will support these techniques.

This laboratory guide represents a growing collection of tried, tested, and optimized laboratory protocols for the isolation and characterization of eukaryotic RNA, with lesser emphasis on the characterization of prokaryotic transcripts. The more noteworthy additions to the third edition include various new and improved RT-PCR tricks of the trade; innovative 5' and 3' RACE; subtractive PCR methods; methods for improving complementary DNA (cDNA) synthesis; and informative chapters on the newer technologies of RNA interference (RNAi), microarrays, and bioinformatics. Methods such as these are especially important today in view of the unprecedented interest in quantifying the absolute abundance of specific transcripts in the cell. Clearly, the focus here is the study of RNA as a parameter of gene expression with emphasis on how these techniques can be used as stand-alone methods or in unison with other assays for the study of transcriptional and posttranscriptional regulation of eukaryotic genes. The best advice that can be offered is the following: Always think two steps ahead in an experiment, and reflect on how the method of RNA isolation affects the ensuing protocols and interpretation of data.

This text is written for the principal investigator, bench scientist, physician, veterinarian, laboratory technician, graduate student, and anyone else capable of performing basic research techniques. This resource is intended to provide a rationale to assist in the decision-making process for individuals at all levels of sophistication, from the novice to the well-seasoned scientist, and at the same

time to present realistic alternatives for achieving the same experimental goals. Many of the incorporated notations and hints are based on personal experience and pave the way for the expedient recovery of RNA from biological sources, with particular regard to those sources enriched in ribonuclease. Day-in and day-out, unsound tactics for RNA characterization result in wasted resources because of an obvious failure to understand the “what” and the “why” from the onset of the study. Although this text is by no means a comprehensive review of the fundamentals of gene expression, the recurrent themes herein are the correct way to handle and assay RNA. These pages also demonstrate clearly how a selected technique fits into the grand scheme of nucleic acid research. Although I hope that the text will be studied from cover to cover, one may pick and choose salient protocols without loss of continuity. For those readers who are new to the study of the cellular biochemistry from the perspective of RNA analysis, it may be beneficial to first read Chapter 26 (An RNA Paradigm).

Collectively, the chapters work together to embellish the RNA story, each presenting clear lessons. The liberal incorporation of flow charts, tables, and graphs facilitate learning and assist in the planning and implementation phases of a project. The investigator is limited only by his or her ingenuity.

* * *

I acknowledge, with sincere thanks and appreciation, the intellectual encouragement of the many colleagues and friends who, in some way, supported the preparation of this manuscript. The support and *patience* of my family are also publicly acknowledged and are very much appreciated.

Initium sapientiae timor Domini

目 录

前 言	在细胞质中的稳定性..... 40
第 1 章	调控水平..... 40
重访 RNA 和细胞生物化学	参考文献..... 43
为什么研究 RNA? 2	
RNA 是什么? 4	第 4 章
多核苷酸的装配 7	难对付的核糖核酸酶
RNA 的种类 10	概述..... 48
严谨度: 影响核酸结构的条件..... 11	核糖核酸酶活力的去除..... 48
盐对严谨度的效应 13	核糖核酸酶抑制剂的种类..... 50
pH 对严谨度的效应 13	专一抑制剂 50
温度对严谨度的效应 14	非专一抑制剂 52
甲酰胺对严谨度的效应 15	仪器和试剂的准备..... 53
双链分子的种类..... 15	焦碳酸二乙酯 54
参考文献和推荐阅读材料..... 16	代替方法: 冲洗用灭菌水 57
	过氧化氢 57
第 2 章	氢氧化钠和十二烷基硫酸钠 58
真核基因的转录和组织	用于控制核酸酶活力的其他试剂..... 58
转录和中心法则..... 18	盐酸胍 59
调控元件 19	硫氰酸胍 59
DNA 模板 22	十二烷基硫酸钠 59
基因组织..... 22	N-十二烷基肌氨酸 59
RNA 聚合酶和转录产物 26	酚: 氯仿: 异戊醇..... 60
参考文献..... 30	8-羟基喹啉 61
第 3 章	氯化铯 61
信使 RNA	三氟乙酸铯 61
典型的 mRNA 分子的拓扑学 33	蛋白酶 K 62
5'帽 34	“RNAlater” (商品名) 62
引导序列 (5'非翻译区) 36	方案: 钕基核糖核苷酸络合物的合成 ... 63
编码区 36	参考文献..... 65
尾随序列 (3'非翻译区) 37	
Poly(A) 尾 37	第 5 章
细胞器的 mRNA 39	分离 RNA 的策略
	概述..... 68

纯化 RNA 过程中的目标	69
裂解缓冲液配方	72
温和性裂解缓冲液	73
RNA 的分离	77
离液性裂解缓冲液	80
用含胍的缓冲液分离 RNA	82
胍-酸-酚抽提技术	83
方案: 胍-酸-酚抽提	85
密度梯度离心	86
氯化铯	87
三氟乙酸铯	93
同时分离 RNA 和 DNA	98
方案: 同时分离 RNA 和 DNA	99
RNA 的回收	101
DNA 的回收	102
关于试剂盒	103
硅胶的技术	103
其他方法	104
方案: 用十二烷基硫酸钠和乙酸钾	
试剂快速分离 RNA	105
方案: 分离原核 RNA	106
方案: 分离酵母 RNA	108
纯化的 RNA 的短期和长期保存方	
法	110
参考文献	112
 第 6 章	
关于组织的实验原理	
概述	115
组织培养物还是组织?	115
细胞培养的优点	116
组织样品的优点	117
匀浆法	117
用 Polytron 捣碎	118
用 Dounce 匀浆器匀浆	119
各种器官和组织 RNA 分离的策略	120
新鲜组织	123
冻存组织	123
固定的组织	124

方案: 分离组织 RNA 的 LiCl-尿素	
法	125
方案: 从多脂组织分离 RNA	129
聚核糖体中的 mRNA 的提纯	131
方案: 聚核糖体 mRNA 的分离	132
在野外收集样品	134
RNA “清洗”法	135
参考文献	136

第 7 章

带 polyA 尾的 RNA 的分离

概述	139
加 poly(A) 尾	140
利用 poly(A) 时的注意事项	141
带 poly(A) 尾的分子的选出	143
Poly(A) ⁺ 提纯用的磁珠技术	146
方案: 用磁珠提纯 Poly(A) ⁺ RNA	149
Oligo(dT)-纤维素柱层析	152
方案: 大量 Poly(A) ⁺ RNA 的提纯	153
不用柱的快速 Poly (A) ⁺ 提纯	158
方案: 不用柱的快速 Poly(A) ⁺ 提纯	159
参考文献	161

第 8 章

RNA 制品的质量控制

概述	164
质控技术 1: RNA 的电泳图	164
方案	167
质控技术 2: 紫外分光光度法和光吸	
收比	169
测定核酸的浓度和纯度	169
质控技术 3: 样品支持 RT-PCR 的	
能力	176
质控技术 4: Northern 分析	177
质控技术 5: 样品支持体外翻译的	
能力	177
参考文献	178

第 9 章

点杂交分析

概述	180
优缺点	182
适当的正负对照	184
方案: RNA 点杂交	185
方案: DNA 点杂交	187
实验结果的局限性	188
参考文献	189

第 10 章

RNA 电泳

概述	191
核酸的标准化	192
方案: Poly(A) 标准化	195
琼脂糖凝胶电泳的 RNA 变性系统	199
甲醛变性	201
方案: 甲醛变性胶	202
乙二醛/二甲基亚砷变性	204
方案: RNA 的乙二醛化和电泳	206
分子量标准	208
标准的正确应用	210
核糖体 RNA	212
凝胶染色技术	220
溴化乙锭	220
SYBR 绿	223
SYBR 金	225
“GelStar” 染色剂	226
银染色	226
吖啶橙	226
甲基蓝	227
电泳的安全考虑	229
电泳仪器的维护	229
第一次跑琼脂糖电泳: 一些提示	230
基本词汇表	230
要牢记的几点	231
参考文献	235

第 11 章

照相纪录和影像分析

概述	239
照相纪录	239
样品显影	241
滤光	243
安全第一	244
将电泳图谱最优化的几点提示	246
照相底片和 X-光片的内在局限性	250
数字影像分析	251
影像格式	257
实用性的考虑	258
推荐阅读	260

第 12 章

Northern 分析

概述	262
滤膜的选择	263
硝酸纤维素膜	264
尼龙膜	265
聚偏二氟乙烯膜 (PVDF)	266
处理和滤膜准备	266
Northern 转移技术	267
毛细现象转移	267
“TurboBlotter” 转移器	269
负压转移	269
正压转移	270
电转移	271
在碱性溶液中转移动	272
方案: 利用被动的毛细管扩散转移	
RNA	272
方案: 用 TurboBlotter 向下转移	
RNA	275
滤膜转移后的处理	279
甲醛变性系统	279
乙二醛变性系统	279
固定化技术	279
烘烤	280

紫外光交联	280	长探针的熔点温度	326
方案：用紫外光把 RNA 交联在尼龙膜上	281	寡核苷酸探针的熔点温度	326
滤膜固定后的处理	282	杂交和 Northern 分析	327
参考文献	283	预杂交：滤膜的准备	328
		方案：预杂交（长探针）	328
		探针的变性	330
		杂交	330
		杂交后的严谨度洗涤	331
		参考文献	332
第 13 章		第 15 章	
核酸探针技术		检测的原理	
概述	286	概述	334
探针的分类	287	放射自显影	335
选择标记系统	288	滤膜的处理	339
同位素标记	289	X-光片	339
非同位素标记	296	安全照明	341
DNA 探针	300	曝光时间	341
DNA 探针的合成	302	增感屏	342
反义 RNA 探针	306	荧光显影	343
RNA 探针的特征	308	胶片的预闪光	344
RNA 探针的合成	309	片匣的种类	344
探针的纯化	311	显影和定影	345
探针的保存	311	放射自显影：推荐方案	345
内对照	312	非同位素方法	348
参考文献	315	生物素	349
		洋地黄苷元	351
		荧光标记核苷酸	352
		直接酶标	352
		用化学发光检测	353
		显色检测方法	357
第 14 章		数字影像系统	358
核酸杂交的实践		参考文献	359
概述	318		
影响杂交动力学和专一性的因素	319	第 16 章	
温度	320	用抗核酸酶技术定量特定的 mRNA	
离子强度	321	概述	362
pH	321	基本方法的研究	365
探针的长度	321		
探针的浓度	322		
G+C 的含量	322		
错配	323		
探针的复杂度	324		
黏度	324		
甲酰胺	325		
杂交温度	325		

探针的选择	368	cDNA 合成概论	422
关于最优化的建议	372	合成第一链的考虑	424
潜在的困难	374	合成第二链的考虑	433
方案 1: 用 S1 核酸酶检验定量测定		检查互补 DNA 合成的效率	436
转录物	377	连接时的考虑	436
方案 2: 用抗核糖核酸酶检验定量		参考文献	438
测定转录物	381		
参考文献	385	第 19 章	
第 17 章		逆转录 PCR	
核 RNA 的分析		概述	440
概述	388	PCR 概论	440
转录速率的检验	388	逆转录 PCR——普遍研究方法	446
方案: 核失控转录检验	395	实验室的设计	452
细胞的收获和细胞核的制备	395	引物的设计	452
用 NP-40 缓冲液裂解细胞	396	基本规则	458
细胞核制备的替代方案: 从组织培养		T_m 的考虑	461
细胞制备易碎的细胞核	397	最优化步骤	462
细胞核制备的替代方案: 从整块组织		PCR 产物的分析	471
分离细胞核	399	逆转录 PCR 质量控制要点	471
转录物的标记	399	相关的技术	474
标记的转录物的回收	401	5'RACE PCR	474
靶 DNA 的制备	403	3'RACE PCR	477
杂交用 RNA 的制备	405	巢式 PCR	478
杂交后的洗涤和检测	407	方案: 第 1 链 DNA 的合成	479
方案: 核失控转录检验: 替代手续 ..	407	方案: cDNA 的 PCR 扩增	481
方案: 抗核酸酶和脉冲标记转录		克隆 PCR 产物	482
检验	409	方案: 平端 PCR 产物的末端加 A ..	484
RNA 聚合酶 I、II、III 的活力的鉴别 ..	412	方案: TA 克隆的连接反应	485
抽提用于稳态分析的核 RNA	414	“TOPO” 克隆法	487
方案: 核 RNA 的直接抽提	415	参考文献	487
方案: 从富含核糖核酸酶的细胞制备			
核 RNA	417	第 20 章	
参考文献	418	定量 PCR 技术	
第 18 章		概述	491
cDNA 合成		灵敏度指数	492
概述	422	定量研究	493
		内对照	494
		外对照	497