



RiboGreen RNA Reagent

RiboGreen RNA 荧光定量染料

产品简介

RiboGreen 是一种超灵敏的荧光核酸染料，用于溶液内 RNA 的定量检测。在大量分子生物学实验过程中对微量 RNA 的检测和定量特别重要，这些过程包括：体外转录 RNA 产量的测定，以及在进行 Northern Blot、S1 核酸酶实验、RNase 保护实验、cDNA 文库制备、逆转录 PCR 和差异显示 PCR 前对 RNA 浓度的测定。

核酸浓度测定最常见的方法是测量 260nm 波长处的吸光值 (A260)，然而，基于吸光值检测法主要的缺点在于蛋白和游离核苷酸对光信号具有较大的干扰；以及检测灵敏度较低 (A260=0.1 相当于溶液中 4μg/mL 的 RNA)；而应用灵敏的荧光核酸染料能避免很多由于这些因素引起的问题。

RiboGreen 能定量浓度低至 1ng/mL 的 RNA，通过荧光酶标仪、标准的荧光光度计或滤光荧光计来测量。此探针与 RNA 结合后的最大激发波长~500nm，最大发射波长~525nm。用荧光酶标仪读数，200μL 的反应体系可检测低至 200pg RNA，这一灵敏度比基于溴化乙锭的荧光分析法高 200 倍，比基于紫外吸收峰的分析法高 1000 倍。使用两个染料浓度，RiboGreen 可测量的 RNA 浓度线性范围可达 3 个数量级，从 1ng/mL 到 1μg/mL RNA (见图 1)。高宽度实验(High-range assay)能定量(20ng/mL~500ng/mL)的 RNA，低宽度实验(Low-range assay)能定量(1ng/mL~50ng/mL)的 RNA，即使体系内存在核酸制备物中常见的几种杂质(包括：核苷酸、盐类、尿素、乙醇、氯仿、表面活性剂、蛋白和琼脂糖)，也能维持这一线性关系。另外，RiboGreen 也会结合 DNA，先用 DNase 预处理混合样品，再用 RiboGreen 进行 RNA 选择性的定量分析。

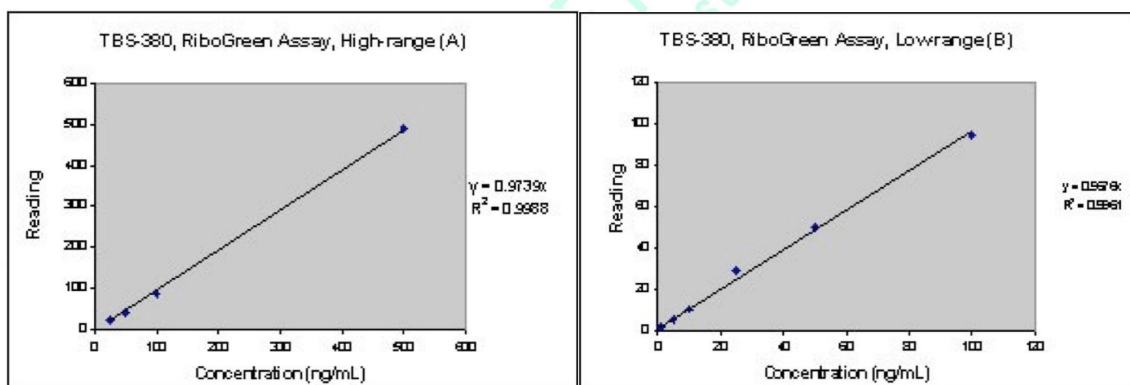


图 1:用 RiboGreen RNA 试剂分别测量标准核糖体 RNA 高浓度系列(A)和低浓度系列(B)获得的标准曲线。

产品组成

编号	名称	FS1468	FS1468	FS1468	Storage
	RiboGreen RNA Reagent(200×in DMSO)	100μl	5×100μl	10×100μl	2-8℃干燥避光
使用说明书	1 份				

储存及运输条件:2-8℃避光保存，亦可置于-20℃避光保存。至少 1 年有效。冰袋运输。

需自备材料

- 1) 无核酸酶水 (货号: FSH042-100ml)
- 2) 1×TE 缓冲液 (RNase-free) (货号: FSH016-100ml)



3) RNA Standard (标准品 16S 和 23S 核糖体 RNA)

4) 【可选】荧光比色皿以及荧光光度计

5) 【可选】全黑 96 孔板以及荧光酶标仪

反应缓冲液准备

1×TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) 用来稀释 RiboGreen 试剂和 RNA 样品, 必须保证 TE buffer 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佩戴一次性手套。所有的溶液应该存放在无菌的一次性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。

【注意】: 用户可直接购买商业化或自行配制 1×TE buffer, Nuclease-free(货号: FSH016-100ml); 或直接购买商业化或自行配制 20×TE buffer, Nuclease-free。如果手头是 20×TE buffer, Nuclease-free, 于实验前, 用 Nuclease-free water 稀释到 1×TE buffer, Nuclease-free;

操作步骤

1.概述

在 RiboGreen 的 RNA 定量检测中, 为了获得完全的线性动力学范围, 需要使用两个不同的染料浓度。在准备 RiboGreen 的工作液之前 (见下试剂准备), 需要先决定是希望测定高宽度实验 (High-range assay) (20ng/mL-500ng/mL RNA), 还是低宽度实验 (Low-range assay) (1ng/mL-50ng/mL RNA), 或两个范围都要检测。

2.试剂准备

实验当天, 在无菌的一次性聚丙烯塑料管内制备 RiboGreen 的水溶性工作液。避免使用玻璃器皿, 因 RiboGreen 可能粘附到玻璃表面。制备好的 RiboGreen 工作液需避光保存。

【注】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 μ L RiboGreen 到 19.9 mL 1×TE buffer 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 μ L RiboGreen 到 20.0 mL 1×TE buffer 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 RiboGreen 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.准备 RNA 标准曲线

对于标准曲线, 可以使用商业化的 RNA Standard, 比如: 普遍使用的 16S 和 23S 核糖体 RNA; 或其它纯化的 RNA 制品。有的时候, 推荐使用与待测定样本类似的 RNA 标准来建立标准曲线。一般来说, 绝大多数单链的 RNA 分子能产生几乎等价的荧光信号。在核苷、盐、尿素、乙醇、氯仿、去污剂、蛋白质和琼脂糖这些常见的污染核酸试剂的化合物存在时, RiboGreen 的检测结果仍可维持良好的线性关系, 即使荧光强度可能会受到影响 (见附表 3)。为了确保达到有效的对照, 用于制备标准曲线的 RNA 溶液应该与待测样本保持一致, 这样能保证含接近相似水平的杂质化合物。

3.1 在塑料瓶用 1×TE buffer 配制浓度为 2 μ 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 (A_{260})下的基本吸光值, $A_{260}=0.05$ 相当于 RNA 浓度 2 μ g/mL。

3.2 制作 High-range 标准曲线时, 通过稀释 2 μ g/mL RNA 溶液配制一系列的 2×终浓度 RNA 标准溶液至一次性无核酸酶的塑料管中, 最后转移到比色皿或培养板中 (参考表 1)。

2×RNA 溶液浓度 ng/mL	2×RNA 溶液体积(mL)	2×低浓度工作液体积(mL)	RiboGreen 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



3.3 制作 Low-Range 标准曲线时,通过稀释 2 $\mu\text{g/mL}$ RNA 溶液配制一系列的 2 $\times$ 终浓度 RNA 标准溶液至一 次性无核酸酶的塑料管中,最后转移到比色皿或培养板中(参考表 2)。

2 $\times$ RNA 溶液浓度 ng/mL	2 $\times$ RNA 溶液体积(mL)	2 $\times$ 低浓度工作液体积(mL)	RiboGreen 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 10 $\times$ 10 mm 比色杯时低浓度 RNA 标准曲线

3.4 等体积混合 RiboGreen 试剂工作液(见 2-试剂准备)和 2 $\times$ RNA 标准溶液。于室温避光孵育 2-5min。务必确保测量容器内加入了足够体积的测量液,对 10 $\times$ 10mm 比色皿来说,不能低于 2 mL;对 96 孔板的各孔来说,不要低于 200 μL 。

3.5 选择使用荧光光度计或荧光酶标仪来测定样本荧光值,选择标准的荧光素波长(激发 $\sim$ 480nm,发射 $\sim$ 520nm)。

3.6 将每个样的荧光值减掉空白的荧光值。之后使用校正好的荧光值为纵坐标, RNA 浓度为横坐标,来建立标准曲线。

4.样本分析

4.1 用 1 $\times$ TE buffer 稀释样品到合适体积(比如: 1.0 mL 到 10 $\times$ 10 mm 比色杯或 100 μL 到 96 孔微孔板)。最好每个待测样本做不只一个稀释倍数。

待测样本稀释倍数越高,越有助于降低特定污染物的干扰作用。然而,也要避免特别小的样本体积,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,如果可能,调整所有样品中杂质浓度到相同水平。(见 5-样本中的 DNA 清除)

4.2 每个样品中加入等体积的 RiboGreen 测量试剂(见 2-试剂准备),于室温避光孵育 2-5min。

4.3 选择与标准曲线测定时相同的仪器参数来测定样本荧光值。为了降低光漂白效应,所有样本的荧光测定时间保持不变。

4.4 将每个样的荧光值减掉空白的荧光值。根据已经产生的 RNA 标准曲线来确定样本的 RNA 浓度。

4.5 可能的话,通过做不同的样本稀释再重复测定,来验证定量结果。

5.样本中的 DNA 清除

RiboGreen 也可以结合 DNA。可以先用无 RNA 酶的 DNA 酶来去除样本中的 DNA,从而避免由于 DNA 和 RiboGreen 结合产生的荧光干扰,确保样品中的荧光全部来自 RiboGreen 和 RNA 的结合。

5.1 准备 10 $\times$ DNase digestion buffer: 无核酸酶的 200 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM MgCl₂, 20 mM CaCl₂。

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

5.3 按照 1 μg DNA 添加 $\sim$ 5 unit 的无 RNase 的 DNase I。

5.5 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 90min。

5.5 用 1 $\times$ TE buffer 至少 10 倍稀释样品以降低消化液中残留盐离子对 RiboGreen 测量产生干扰。

5.6 按照上述步骤进行 RiboGreen 测定实验。



附表 3 RNA 制备产物中常见污染化合物对 RiboGreen 定量的影响

物质名称	最大耐受浓度	信号变化百分比
Salts		
Ammonium acetate	20 mM	4% decrease
Sodium acetate	20 mM	11% increase
Sodium chloride	20 mM	15% decrease
Zinc chloride	1 mM	9% decrease
Magnesium chloride	0.5 mM	9% decrease
Calcium chloride	0.1 mM	2% increase
Cesium Chloride	10 mM	8% decrease
Guanidinium thiocyanate	10 mM	9% decrease
Urea	3M	13% decrease
Organic Solvents		
Phenol	0.5%	5% decrease
Ethanol	20%	10% decrease
Chloroform	2%	15% increase
Detergents		
Sodium dodecyl sulfate	0.05%	10% decrease
Triton X-100	0.5%	8% increase
Proteins		
Bovine serum albumin	0.2%	11% decrease
IgG	0.02%	4% increase
Other Compounds		
Formamide	10%	12% decrease
Sucrose	> 500 mM	4% decrease
Boric acid	100 mM	15% decrease
Polyethylene glycol	10%	10% decrease
Agarose	0.2%	3% increase

注意事项

- 1) 目前尚无关于 RiboGreen 对人体的致突变性或毒性的数据。由于该染料与核酸结合，应当被看作潜在诱变剂，使用时要小心谨慎。在处理 DMSO 储存液时应特别小心，因 DMSO 能促进有机分子进入组织。染料的废弃处理应当符合当地的规定。
- 2) 操作过程中，需注意防止 RNase 污染 RiboGreen RNA Reagent。使用洁净的一次性手套来处理所有材料。
- 3) 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

相关产品

产品货号	产品名称	规格
FSF0034	PicoGreen dsDNA Assay Kit 双链 DNA(dsDNA)定量试剂盒	100~1000T
FS1368	PicoGreen dsDNA Reagent 双链 DNA 检测试剂	100μl
FS1468	RiboGreen RNA Reagent RiboGreen RNA 荧光定量染料	100μl