

EU 标记法测定细胞 RNA 合成

EU Labelling Method for RNA Synthesis Detection of Cells

鲁家骏¹, 韩帅², 杨巍维^{1,*}

¹ 分子生物学国家重点实验室, 中科院分子细胞卓越创新中心 (生物化学与细胞生物学研究所), 上海;

² 中科院上海生化与细胞所化学生物学技术平台, 中科院分子细胞卓越创新中心 (生物化学与细胞生物学研究所), 上海

*通讯作者邮箱: weiweiyang@sibcb.ac.cn

引用格式: 鲁家骏, 韩帅, 杨巍维. (2021). EU 标记法测定细胞 RNA 合成. // 高内涵成像及分析实验手册. *Bio-101* e1010870. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010870.

How to cite: Lu, J. J., Han, S. and Yang, W. W. (2021). EU Labelling Method for RNA Synthesis Detection of Cells. // High-Content Imaging and Analysis Protocol eBook. *Bio-101* e1010870. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010870. (in Chinese)

摘要: RNA 作为细胞内最为重要的信息分子, 承担了贮存, 转移遗传信息, 并能将储存在 DNA 中的遗传信息传递至蛋白质。不仅如此, 一些 RNA 分子作为核酶在细胞内催化部分反应, 部分 RNA 还能调控基因表达。5-乙炔尿嘧啶核苷 (5-ethynyl uridine, EU), 一种可以穿透细胞膜的尿苷类似物, 进入细胞后掺入新合成的 RNA, 且并不掺入 DNA。click chemistry 反应可以将含有叠氮基的荧光染料与乙炔基团相连接, 将新产生的 RNA 标记上荧光。通过 FACS 或荧光显微镜检测荧光信号, 即可获得细胞内 RNA 的合成以及 RNA 含量变化信息。该 EU 标记 RNA 的实验方法能够帮助研究者们探究疾病发生机

制, 且其在药物毒理研究及安全性评价方面都有着普遍的应用。

关键词: RNA synthesis, EU 标记法, click chemistry

1. 96 孔黑边底透板 (Corning, catalog number: 3904)

材料与试剂

3. 胎牛血清 (Gemini, catalog number: 900-108)

4. Global RNA Synthesis Assay kit (Abcam, catalog number: ab273285)

试剂盒内提供的试剂:

Wash Buffer (10x)
Fixative Solution
Permeabilization Buffer (10x)
RNA Label (100x)
Copper Reagent (100x)
Fluorescent Azide (100x)
Reducing Agent (20x)
Total DNA Stain (1000x)
Actinomycin D (100x)

5. DMEM 培养基 (Hyclone, catalog number: SH3002201)
6. PBS (见溶液配方)

仪器设备

1. 高内涵细胞分析仪 (PerkinElmer, Opera, 配有 355 nm/488 nm/561 nm 激光器)

实验步骤

1. 将待检测 HeLa 细胞提前 48 h 铺到 96 孔板内, 每孔铺入细胞 10,000 个, 每孔培养基 100 μ l。
2. 提前 1-24 h 加入 RNA label 试剂 1 μ l (根据实验目的, 细胞类型调整孵育时间); 在加入 RNA label 试剂前 2 h 加入 Actinomycin D。
3. 提前准备好 1x Wash Buffer, 1x Permeabilization Buffer: 用灭菌水 (去离子水) 稀释 10x Wash Buffer, 10x Permeabilization Buffer。
4. 去除培养基, 加入 100 μ l PBS 清洗一遍, 去除 PBS。
5. 加入 Fixation Buffer 100 μ l, 避光室温固定 15 min, 去除 Fixation Buffer。
6. 连接反应液配方:

PBS	93 μ l
Copper Reagent (100x)	1 μ l
Fluorescent Azide (100x)	1 μ l
Reducing Agent (20x)	5 μ l

每孔加入提前准备好的连接反应液 100 μ l, 避光室温孵育 30 min。

7. 再加入 100 μ l 含有 Total DNA Stain 的 Wash Buffer, 避光室温孵育 5 min, 去除 Wash Buffer。
8. 去除连接反应液, 加入 1x Wash Buffer 100 μ l, 清洗 3 次。
9. 加入 100 μ l Wash Buffer, 用 opera 高内涵细胞分析仪拍照分析细胞 RNA 合成情况。

结果与分析

1. 图像拍摄:

分别使用 Opera 的 355/488 nm 激光器激发对应细胞核 DNA 蓝色荧光, 以及新合成 RNA 的绿色荧光信号, 使用 20 倍物镜拍摄, 见图 1。

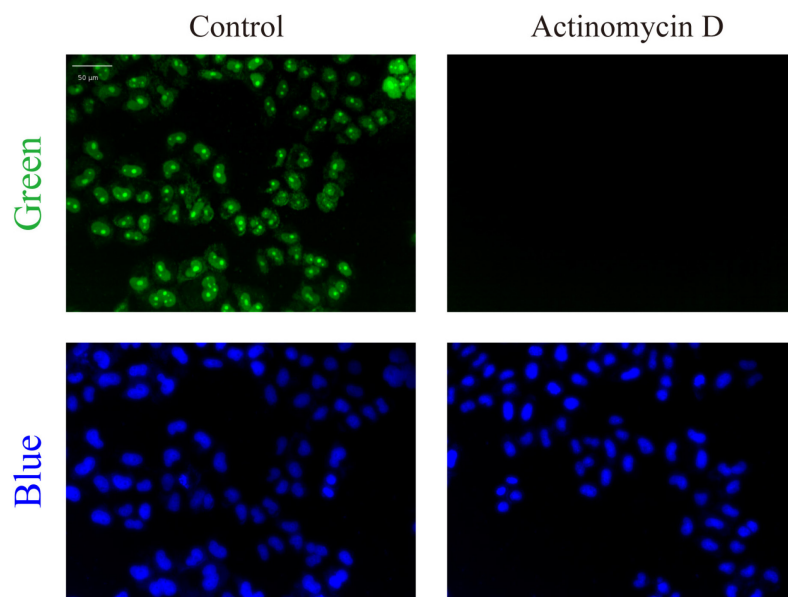
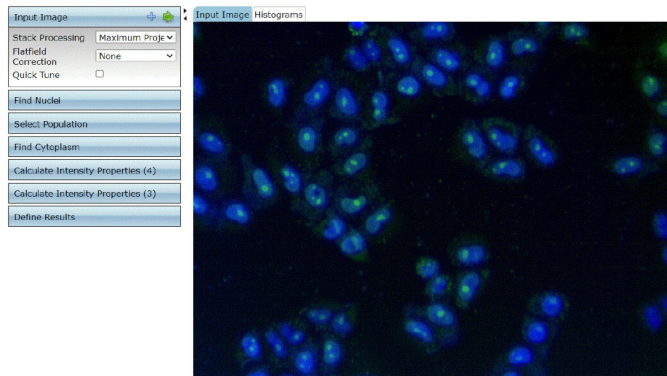


图 1. Opera 拍摄结果示例图 左上图: 提前 12 h 加入 RNA label 后, opera 拍摄的细胞内绿色荧光标记新合成的 RNA; 右上图: 提前加入 Actinomycin D 后, 视野内细胞几乎无绿色荧光; 下图: 为 DNA 染料染色后拍摄到细胞核

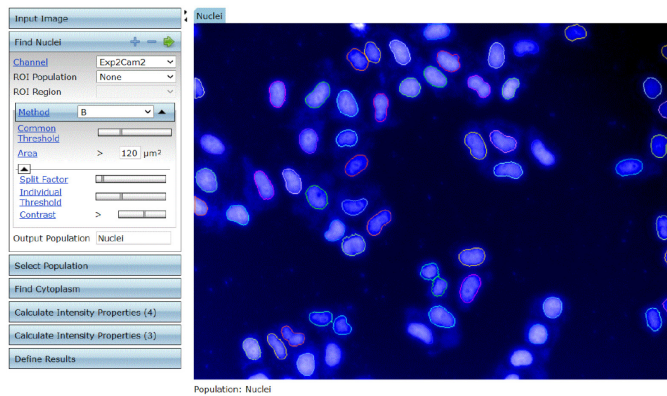
2. 图像分析:

- 1) 根据细胞核信号的强度和面积设定条件遴选出视野中所有符合标准的细胞核以及整个细胞区域, 见图 2 步骤 1-4。

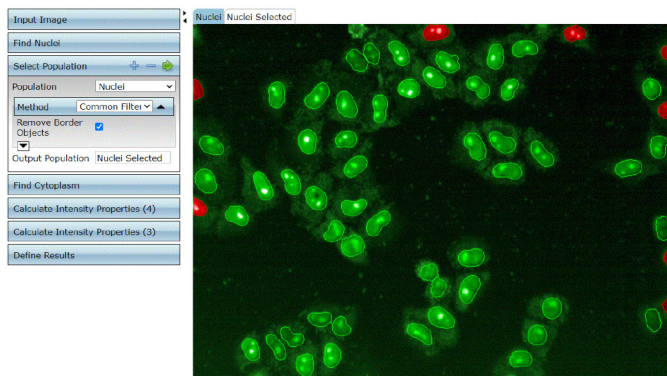
- 2) 在选择出的细胞群体中，分别计算每个细胞的细胞核区域及完整细胞区域内绿色荧光信号值 (Mean 为单位像素点的平均荧光强度值；Sum 为每个细胞区域内荧光强度的总值)，见图 2 步骤 5-7。



步骤1:
导入图片



步骤2:
确定细胞核位置



步骤3:
去除边缘细胞

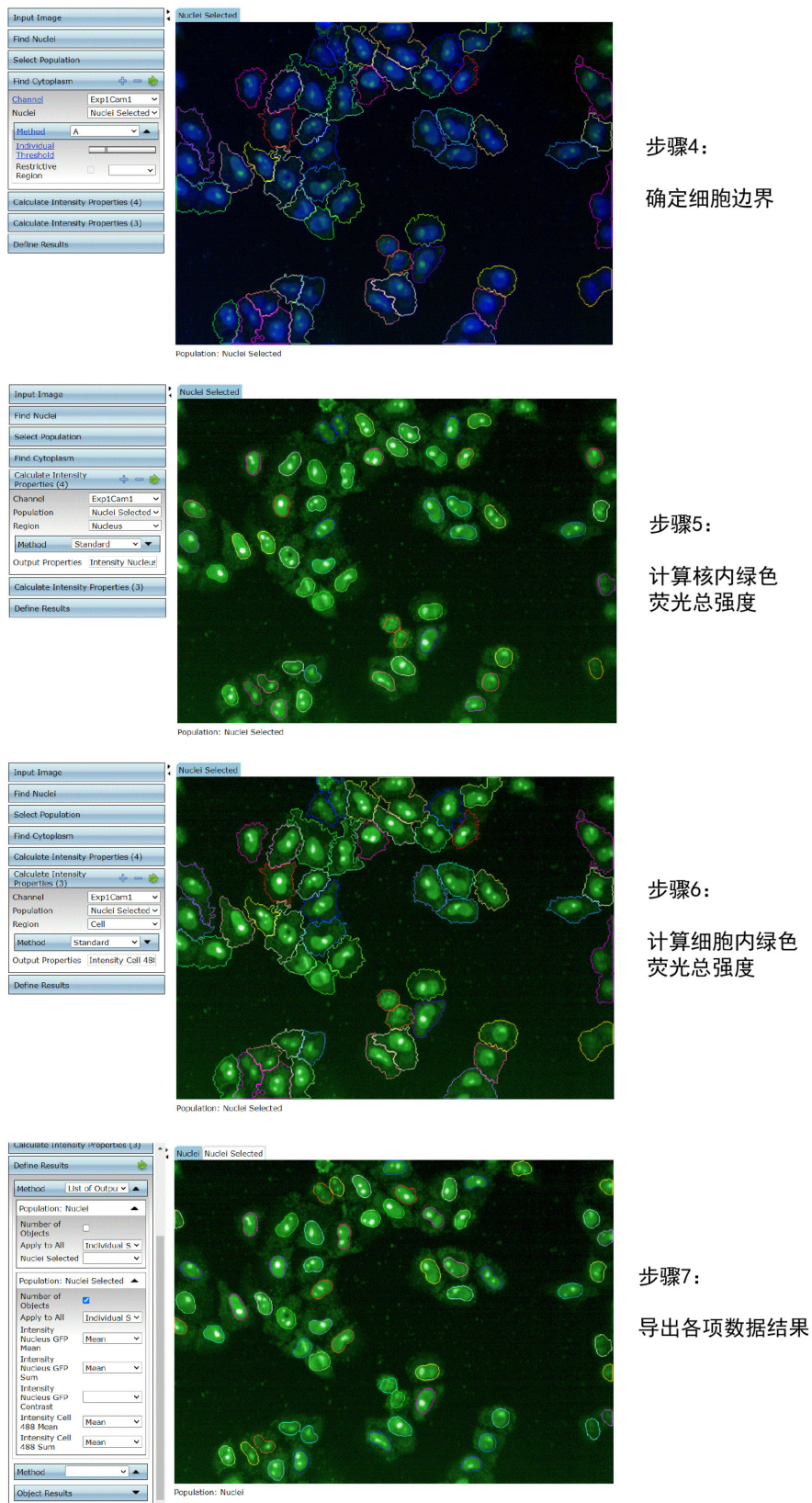


图 2. 图像数据处理流程

- 3) 计算孔内细胞平均新 RNA 的合成 (采用的数据为细胞核区域内荧光强度的总值), 见图 3。

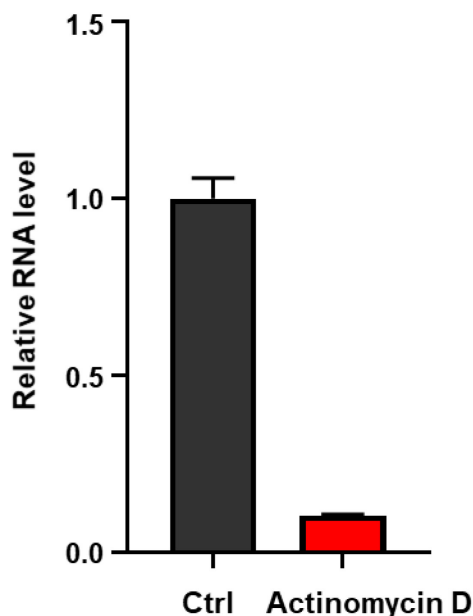


图 3. RNA 合成水平统计图 在 HeLa 细胞中加入 1 ng/ml 浓度的 Actinomycin D 处理 48 h 之后, 利用 EU 标记法测定细胞内总 RNA 合成。

注意事项

1. 试剂盒内提供的 Actinomycin D 浓度较高, 较长时间的处理可能会导致细胞死亡以及脱落, 可以降低浓度使用。
2. 本方法 RNA 标记荧光染料的激发光波长为 494 nm, 发射光波长为 521 nm。
3. 背景对照组设置: 不加入 RNA label 孵育, 需要加入连接反应液孵育, 后续操作与其他实验孔相同。
4. 一般是采用细胞核或完整细胞区域荧光强度的总值去计算 RNA, 因为不同的细胞形态细胞面积可能相差较大, 所以用总值计算更为合理。
5. 新合成的 RNA 主要集中在细胞核内, 部分细胞的胞浆部分荧光强度过低, 与背景相差不大, 此时采用细胞核区域荧光强度的总值指征 RNA 合成更为合适。

溶液配方

1. PBS

1.06 mM	KH ₂ PO ₄	0.144 g/L
155.17 mM	NaCl	9 g/L
2.97 mM	Na ₂ HPO ₄ -12H ₂ O	1.064 g/L

致谢

本项目得到中科院生化与细胞所基金的支持。感谢中科院生化与细胞所化学生物学技术平台在高内涵成像分析实验中给予的帮助。

参考文献

1. Jao, C. Y. and Salic, A. (2008). [Exploring RNA transcription and turnover *in vivo* by using click chemistry](#). *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 15779-15784.