

天
净
沙
系
列

CAT#:51102-100
CAT#:51102-250
常温运输, 4℃保存

TIANDZ

细菌 RNA_{OUT}

Bacterial RNA_{OUT}

使用手册 V1.3

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506

网址: www.tiandz.com; 电话: 400-6765278; 电邮: order@tiandz.com

<p>产品及特点</p>	<p>本产品是在天净沙动物 RNAout 基础上根据细菌提取的具体情况改良而得。它基于异硫氰酸胍/酚/氯仿提取 RNA 原理,可用于包括 <i>E.coli</i>、<i>Campylobacter fetus</i>、<i>Pseudomonas aeruginosa</i>、<i>Rhodobacter sphaeroides</i> 等各种常见的革氏阴性细菌。如果需要提革氏阳性细菌(如 <i>Bacillus subtilis</i>、<i>Staphylococcus aureus</i> 等)的 RNA,可以选择真菌 RNAout。本产品特点如下:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 操作简单快速,只要十分钟左右,可以全在室温下进行。 2. 所得 RNA 质量高,OD260/OD280 一般在 1.9,不含基因 DNA 污染。 3. 灵敏度高,可以从一个菌落中提取到普通电泳能够检测到的总 RNA。 4. 性价比高于进口同类产品。 				
<p>规格及成分</p>		<p>成分</p>	<p>编号</p>	<p>100 次包装</p>	<p>250 次包装</p>
		<p>细菌 RNAout</p>	<p>51102</p>	<p>100 mL</p>	<p>250 mL</p>
		<p>使用手册</p>	<p>1 份</p>		
<p>运输及保存</p>	<p>常温运输,4℃保存,有效期一年。</p>				
<p>自备试剂</p>	<p>氯仿,异丙醇,75%乙醇, RNA 溶解液</p>				
<p>使用方法</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 在 1.5 mL 塑料离心管中离心收集 0.2-1.5 mL 新鲜细菌(注意:由于细菌 RNA 半衰期十分短,所以,必须使用最新鲜细菌),吸尽液体培养基,加入 1 mL 细菌 RNAOUT 并用枪充分吹打,确保细菌全部裂解,没有块状物。如果使用菌落,则用接种环小心将其转移到装有 1 mL 细菌 RNAOUT 的 1.5 mL 塑料离心管中,用移液枪吹打均匀。在细菌数较少时,建议使用天泽基因的助沉剂 RNADOWN 以提高 RNA 回收率。 2. 加入 0.2 mL 氯仿,在振荡器上充分振荡混均 30 秒(必须将管底的液体振荡起来,否则不能有效将 DNA 打断和去除蛋白质)。 3. 12000-15000 g 室温离心 3 分钟。上清液无色,下层液呈蓝色,中间为蛋白质。小心将上清液转移到另一干净 1.5 mL 塑料离心管中,上清液体积约为 0.6 mL。为避免触及中间层的 DNA 和蛋白质,建议分小量多次吸取,并且只取 0.5 mL,留 0.1 mL 左右。当细菌数量较少时,中间层十分松散,上清时很容易吸到下层有机相,需要更加小心。 4. 在上清液中加入等体积的异丙醇,振荡器上振荡混均 30 秒。 5. 12000-15000 室温离心 3-10 分钟, RNA 将在管底侧面形成沉淀。 6. 小心吸弃上清液,注意不要吸弃 RNA 沉淀。 				

7. 在离心管中加入 1mL 75%乙醇，振荡器上振荡混均 30 秒。
8. 12000-15000 g 室温离心 1 分钟。
9. 小心吸弃上清液，注意不要吸弃 RNA 沉淀。
10. 重复第 8 到第 10 步一次。
11. 短暂快速离心，用移液枪小心吸弃残留液（约 50 uL）。
12. 短暂放 1-2 分钟后加入适量 RNA 溶解液使 RNA 沉淀溶解，可以立即使用或存放于-80℃长期保存。

13. RNA 完整性的电泳检测：

如果需要做 Northern 杂交，强烈建议用户使用甲醛变性胶进行 RNA 电泳，因为非变性胶不能分离所有的 RNA 分子 (BioTechniques, 28: 414, 2000)。如果是简单检测，可以使用 TAE 或天泽基因的 SuperBuffer-2 DNA/RNA 两用快速电泳液，但文献报道必须使用变性上样液 (BioTechniques, 9: 558, 1990)。普通 DNA 上样液不含变性剂，也没经过去 RNase 处理，所以最好不要使用。尤其需要注意的是不要使用 TBE 进行 RNA 电泳，因为 TBE 所含硼酸是研究多糖的经典方法----硼酸络合法中的关键成分，硼酸通过与 RNA 核糖中的羟基发生络合反应，形成 RNA 分子内或 RNA 分子间的络合复合物，使同样长度的 RNA 具有不同的泳动速度，电泳条带弥散，同时有大的 RNA 络合复合物迟留在加样孔中（一般会误以为是基因组 DNA 污染）。RNA 分子内或 RNA 分子间的络合物的形成的多少和比例又与硼酸与 RNA 的数量比例有关，而 RNA 样品中污染的其他多糖（如植物中提取的 RNA）也会参与此反应，使硼酸对 RNA 电泳的影响更复杂，所以 TBE 对 RNA 电泳的影响没有规律性和重复性。有的样品可以使用有的又不行，最好是避免使用。

由于细菌细胞中 70-80%的 RNA 为 rRNA，后者又由 23S (约 3700 nt)，16S (约 1700 nt)和 5S (约 100 nt)三种组成，所以变性胶电泳后应该在 UV 下看见三条清晰的 rRNA 带。由于核酸长度与结合 EB 的数量成正比（当然还与 RNA 的二级结构有关，双链部分结合能力比单链部分强），所以 23S rRNA 条带的荧光强度一般比 16S rRNA 条带的荧光强度高 2 倍。如果这两条 rRNA 带不清晰或比例小于此范围则表示 RNA 有降解（因为大的 RNA 被酶降解的可能更大）。

14. RNA 产量产率测定：

将 5-10 μL RNA 溶于 TE 缓冲液中(pH7.5-8.2 之间)检测其在 OD260 的光吸收。通过光吸收可以得出 RNA 浓度 (1 OD260 的 RNA=40 $\mu\text{g}/\text{mL}$),进而计算出 RNA 的产量和产率。注意不要将 RNA 稀释在 DEPC 水中检测 OD260 和 OD280, 否则光吸收比在 TE 中测得的低 10%-15%, 因为核酸光吸收跟溶液 pH 相关, 而 DEPC 水中的 DEPC 高压分解后产生的 CO_2 与水反应生成碳酸, 使溶液 pH 降低进而降低 RNA 的光吸收。

15. RNA 纯度测定:

无污染的总 RNA 的 OD260/OD280 一般在 1.8-2.1 之间(具体数值与其碱基组成和溶液成分等多种因素有关), OD260/OD230 一般在 2.0-2.3 之间, 如果低于或高于此范围则分别表示样品可能有蛋白质或多糖的污染, 但一般不影响 RT-PCR 等反应。蛋白质污染可以通过酚/氯仿抽提一次然后酒精沉淀去除, DNA 和多糖污染可以分别用天泽基因的 DNA Erasol 和 PS Erasol 去除。

疑难解答

Q: 上样孔里的红色荧光物一定是污染的基因组 DNA 吗?

A: 不是。用 TAE 或 TBE 电泳液和非变性胶电泳 RNA 时容易产生此现象, 天泽基因初步研究发现大部分红色荧光物是变性不充分的单链 RNA 通过碱基互补或通过硼酸络合如果使用 TBE 作电泳液的话形成的复合物加 RNase 处理后, 这些红色荧光物一般会消失。为避免此现象, 建议最好使用甲醛变性胶电泳。如果需要使用非变性胶, 也必须在上样前使 RNA 变性。使用天泽基因优化的上样/变性/染色三用溶液 RNA_{ON} 可以使 RNA 在非变性胶上电泳时也有较好分辨率。使用非变性胶时, 可以使用 TAE 或超快电泳液 SuperBuffer-2, 最好不要使用 TBE 缓冲液, 因为 TBE 中的硼酸能与 RNA 的多羟基形成复合物, RNA 很难形成锐利的条带。

Q: 如何确认和去处除污染的基因组 DNA?

A: 如果怀疑有 DNA 污染, 可以用 RNase 处理 RNA 样品, 然后再电泳。如果上样孔里的红色荧光物不消失, 则表示是基因组 DNA 污染。进一步确认可以使用 PCR 扩增法。去除污染的 DNA 可以使用非酶的 DNA 去除剂 Erasol^{DNA} 或 RNase-free DNase, 由于 RNase-free DNase 一般都有残留的 RNase 污染, 所以必须严格按照厂家提供的使用手册进行操作。