

# 柱式真菌 RNA<sub>OUT</sub>

## Column Fungal RNA<sub>OUT</sub>

---

使用手册 V1.2

---

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](http://www.tiandz.com); 电话: 400-6765278; 电邮: [order@tiandz.com](mailto:order@tiandz.com)

<b>产品及特点</b>	<p>本产品本产品是在本公司真菌 RNAout (CAT#:60305) 基础上改进的柱式产品，跟真菌 RNAout 相比，它具有下列特点：</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 柱式操作，更加简单快捷，整个过程只需要约 30 分钟。</li> <li>2. RNA 纯度高，OD260/280 一般都在 2.0 左右，可直接用于 RT-PCR、Norther 杂交、microarray hybridization、cDNA 合成等。</li> <li>3. RNA 产量高，一般在 20-70 ug/mL 酵母培养物(约 <math>2.0 \times 10^7</math> 个细胞)。</li> <li>4. 非酶细胞破裂法，适用于各种形态和各个种属的真菌及革兰氏阳性细菌，包括 <i>Candida albican</i>、<i>Saccharomyces cerevisiae</i>、<i>Schizosaccharomyces pombe</i>、<i>Pichia pastoris</i>、<i>Bacillus subtilis</i>、<i>Staphylococcus aureus</i> 等。</li> </ol>																											
<b>规格及成分</b>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>成分</th><th>编号</th><th>50 次包装</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>柱式真菌RNA<sub>OUT</sub>溶液 A</td><td>80804A</td><td>20 mL</td></tr> <tr> <td>柱式真菌RNA<sub>OUT</sub>溶液 B</td><td>80804B</td><td>25 mL</td></tr> <tr> <td>柱式真菌RNA<sub>OUT</sub>溶液 C</td><td>80804C</td><td>75 mL</td></tr> <tr> <td>柱式真菌RNA<sub>OUT</sub>溶液 D</td><td>80804D</td><td>25 mL</td></tr> <tr> <td>离心吸附柱</td><td>60911</td><td>50 套</td></tr> <tr> <td>通用洗柱液</td><td>60408</td><td>50 mL</td></tr> <tr> <td>RNA 洗脱液</td><td>71207</td><td>10 mL</td></tr> <tr> <td>使用手册</td><td>80804sc</td><td>1 份</td></tr> </tbody> </table>	成分	编号	50 次包装	柱式真菌RNA <sub>OUT</sub> 溶液 A	80804A	20 mL	柱式真菌RNA <sub>OUT</sub> 溶液 B	80804B	25 mL	柱式真菌RNA <sub>OUT</sub> 溶液 C	80804C	75 mL	柱式真菌RNA <sub>OUT</sub> 溶液 D	80804D	25 mL	离心吸附柱	60911	50 套	通用洗柱液	60408	50 mL	RNA 洗脱液	71207	10 mL	使用手册	80804sc	1 份
成分	编号	50 次包装																										
柱式真菌RNA <sub>OUT</sub> 溶液 A	80804A	20 mL																										
柱式真菌RNA <sub>OUT</sub> 溶液 B	80804B	25 mL																										
柱式真菌RNA <sub>OUT</sub> 溶液 C	80804C	75 mL																										
柱式真菌RNA <sub>OUT</sub> 溶液 D	80804D	25 mL																										
离心吸附柱	60911	50 套																										
通用洗柱液	60408	50 mL																										
RNA 洗脱液	71207	10 mL																										
使用手册	80804sc	1 份																										
<b>运输及保存</b>	常温运输，4℃保存，有效期一年。																											
<b>自备试剂</b>	氯仿。																											
<b>使用方法</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 将 50 mg 左右的干菌丝(或 100 mg 左右的鲜菌丝、或适当数量的真菌菌落)转移到 1.5 mL 塑料离心管中。如果是液体真菌培养物，则直接将 1-10 mL 液体真菌在 1.5 mL 塑料离心管中 12000-15000 g 离心 1 分钟，并弃尽液体培养基 (可以分多次离心)。</li> <li>2. 加入 0.4 mL 溶液 A 并充分吹打混匀。如果 A 溶液存放时产生沉淀，请置于 65℃融化，用前充分摇晃均匀。</li> <li>3. 加入 0.4 mL 溶液 B，剧烈振荡 30 秒。</li> <li>4. 65℃保温 5 分钟。</li> <li>5. 室温 12000-15000 g 离心 3-5 分钟，转移上清到一干净的 1.5 mL 塑料离心管中。</li> <li>6. 再加入 0.1 mL 溶液 B 和 0.1 mL 自备氯仿，振荡混匀 30 秒。</li> <li>7. 室温 12000-15000 g 离心 3-5 分钟，转移上清到一自备的、干净的 5 mL 塑料离心管中。</li> </ol>																											

8. 加入相当于上清 3 倍体积的溶液 C (约 1.2-1.5 mL) 和 1 倍体积的溶液 D (约 0.4-0.5 mL)，充分混匀。
9. 将混合液 (约 2.5mL) 分 3-4 次转移到离心吸附柱中。每次 13000-15000 g 室温离心半分钟，弃收集管中的穿透液。
10. 用 0.5 mL 通用洗柱液到离心吸附柱中，室温离心半分钟，弃收集管中的穿透液。
11. 一次洗涤一般足够去除杂质。但如果样品 OD260/280 比值不高，可以再用 0.5 mL 通用洗柱液重复此步一次。
12. 室温离心半分钟。此步十分重要，否则残留的洗柱液会影响 RNA 的使用。
13. 将离心吸附柱转移到一自备的 RNase-free 1.5 mL 塑料离心管中，加入 30-100 uL RNA 洗脱液。
14. 室温离心半分钟，离心管中溶液即为 RNA 样品，可以立即使用或存放于 -80°C 待用。
15. 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。
16. RNA 产量产率测定：

将 5-10 uL 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

	<p><math>\mu\text{g/mL}</math>), 进而计算出 RNA 的产量 (浓度 X 体积) 和产率 (RNA 产量/细菌用量)。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%。</p> <p>17. RNA 纯度测定:</p> <p>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。测 OD 时 RNA 不能过度稀释使 OD 读数低于仪器的有效范围。</p>
<b>疑难解答</b>	<p>Q: 为何从酵母中提取的总 RNA 有 3 条小带?</p> <p>A: 它们分别是 70 bp 左右的 tRNA, 120 bp 左右的 5 S RNA, 160 bp 左右的 5.8 S RNA。</p> <p>Q: 上样孔里的红色荧光物一定是污染的基因组 DNA 吗?</p> <p>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 RNAON 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。</p> <p>Q: 如何确认和去除污染的基因组 DNA?</p> <p>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 DNA Erasol 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。</p>
<b>关联产品</b>	<p>真菌 DNAOUT (CAT:#60304)</p>