

天
净
沙
系
列

CAT#:80804-50
常温运输, 4℃保存

TIANDZ

柱式真菌 RNA_{OUT}

Column Fungal RNA_{OUT}

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

<p>产品及特点</p>	<p>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"> 1. 柱式操作, 更加简单快捷, 整个过程只需要约 30 分钟。 2. RNA 纯度高, OD260/280 一般都在 2.0 左右, 可直接用于 RT-PCR、Northern 杂交、microarray hybridization、cDNA 合成等。 3. RNA 产量高, 一般在 20-70 ug/mL 酵母培养物(约 2.0×10^7 个细胞)。 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。 																													
<p>规格及成分</p>	<table border="1" data-bbox="496 728 1275 1182"> <thead> <tr> <th>成分</th> <th>编号</th> <th>50 次包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>溶液 A</td> <td>80804A</td> <td>20 mL</td> </tr> <tr> <td>溶液 B</td> <td>80804B</td> <td>25 mL</td> </tr> <tr> <td>溶液 C</td> <td>80804C</td> <td>75 mL</td> </tr> <tr> <td>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 colspan="2">1 份</td> </tr> </tbody> </table>			成分	编号	50 次包装	溶液 A	80804A	20 mL	溶液 B	80804B	25 mL	溶液 C	80804C	75 mL	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	1 份	
成分	编号	50 次包装																												
溶液 A	80804A	20 mL																												
溶液 B	80804B	25 mL																												
溶液 C	80804C	75 mL																												
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	1 份																													
<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。</p>																													
<p>使用方法</p>	<ol style="list-style-type: none"> 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)。 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。 3. 加入 0.4 mL 溶液 B, 剧烈振荡 30 秒。 4. 65℃保温 5 分钟。 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。 6. 再加入 0.1 mL 溶液 B 和 0.1 mL 自备氯仿, 振荡混匀 30 秒。 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。 																													

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 μ L 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 μ L 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>μg/mL), 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>
<p>疑难解答</p>	<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: 如何确认和去处除污染的基因组 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>
<p>关联产品</p>	<p>真菌 DNAout (CAT:#60304)</p>