



百迈客生物科技

BIOMARKER TECHNOLOGIES

原核转录组送样指导

建库上机要求：

- (1) RNA 总量 $\geq 2\text{ ug}$ ，浓度 $\geq 100\text{ ng/ul}$;
- (2) 无杂质污染(如 DNA 污染,一般 DNA 污染在胶图上表现为出现 $>10\text{kb}$ 的条带);
- (3) RNA 无严重降解,条带清晰(23S 和 16S 核糖体 RNA 条带清晰,23S 的亮度大约是 16S 的 1-2 倍,小分子量 RNA 条带的亮度明显暗于 23S 及 16S rRNA 条带);
- (4) Agilent 2100 芯片检测 RIN 值 ≥ 6.5 。

菌体培养

1) 培养时间

原核转录组主要是研究原核生物转录本信息的时空变化,建议老师根据自己的研究目的,在特定的条件下进行菌体培养,收集特定条件下特定时期的菌体样本。

建议在实验前,菌株经过多次分离纯化,确保为单菌。

2) 收集的量——菌体沉淀

为达到 RNA 总量及浓度要求,对于样品量有以下 3 种方法供选择:

方法一: 每份样品收集**至少 10 OD·mL** 的菌液(例: $\text{OD}_{600}=1$, 则需收取 10mL

菌液离心收集菌体) 离心富集后将沉淀转移到 1.5ml 的无菌冻存管中, 2~3 个

备份。

方法二: 菌液离心富集后将沉淀转移到 1.5ml 的无菌冻存管中, 菌体沉淀称重 $\geq 0.1\text{g}$, 2~3

个备份。

方法三: 菌液离心富集后将沉淀转移到 1.5ml 的无菌冻存管中, 直到菌体沉淀到达**0.1ml** 高度, 2~3 个备份。

问1：为什么我之前只送了不到要求一半的菌体量也能抽提成功？现在送样量标准提高了呢？

答1：不同的菌株，其OD600 值对应的细胞量会有差异。另外不同菌株的抽提得率也会有不一样。这里建议老师培养的菌体量基本能够满足所有菌株的基因组RNA 抽提需求。为了避免抽提RNA 量不足导致老师项目进度延误，因此请老师尽量多培养收集一些菌体，满足上述要求。

问2：为什么最好将50ml 富集后的菌体沉淀转到1.5ML 的离心管中？

答2：由于50ml 离心管很长，菌体沉淀冻在底部，在取样的过程很容易导致样品损失。所以最好转移到1.5ml 的离心管中，加 2~3 个备份。

菌体寄送指导

细菌的参考处理方法如下：

A. 按照 3.1 中要求培养足够多的菌体后，冷冻离心收集菌体。上清务必去除干净。然后将菌体沉淀迅速放入液氮中速冻 5-10 分钟（请不要省略此步），接着转移至-80℃暂时保存或直接送样；

B.将装有菌体沉淀的离心管在干冰条件下寄送；

C.对于一些特殊的菌株，或是比较特殊的培养条件，现在常用的RNA 抽提方法可能不适用。因此请老师额外送 2-3 份样品备份，以便我们在初次抽提失败后及时调整方案；

注1：离心时务必将培养基上清去除干净，不然会影响后续抽提。离心后放入液氮速冻是为了尽快降温，以减轻长时间运输过程中胞内 RNA 酶对 RNA 的降解作用。

注 2：样品的反复冻融会极大影响 RNA 的完整性，因此请保证足够的干冰并选择尽量快速的寄送方式。

注 3：对于病原微生物，尽量建议老师送抽提好的 RNA 样品。如果是送菌体，需提前和技术人员确认，如可检测，需要 75%乙醇浸泡过夜（-80℃），过夜后解冻离心去掉乙醇，可以直接干冰寄送，同时在送样单上进行备注

D.运输方式：

将样品管用封口膜封口，再放置于 50mL 离心管中或封口袋中，里面添加棉花等固定（切勿在 50 mL 管内或其他支撑物内加入液氮等危险品），干冰运输。

RNA 送样指导

1) 自行检测浓度、总量、纯度

如果老师抽提 RNA 后再进行送样，浓度和总量需要满足：RNA 总量 $\geq 4\text{ ug}$ ，浓度 $\geq 100\text{ ng/ul}$ 。OD260/280 ≥ 1.8 ，OD260/230 ≥ 1.0

2) 需进行电泳检测，并提供胶图

老师在送样之前，需要将RNA 进行电泳检测。合格的RNA 样品需要满足以下要求：

- ① 23S 和 16S 核糖体RNA 条带清晰，23S 的亮度大约是 16S 的 1-2 倍，小分子量RNA 条带的亮度明显暗于 23S 及 16S rRNA 条带。
- ② 无明显DNA 污染。（一般DNA 污染在胶图上表现为出现 $>10\text{kb}$ 的条带）

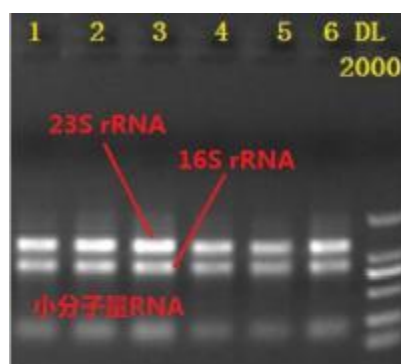


图3.1 合格的RNA 电泳图

23S rRNA 条带最亮、16S rRNA 条带其次、小分子量RNA 条带最暗

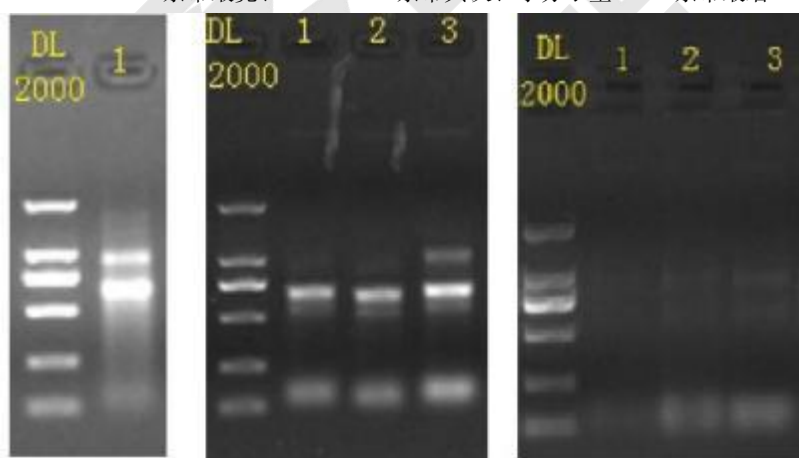


图 3.2 不合格的RNA 电泳图

图中的RNA 条带都有不同程度的降解（从左至右降解情况逐渐更严重），会影响后续的建库及测序