



通过超滤法制备适合对核糖核酸酶(RNase)敏感的应用的超纯水

Stephane Mabic, Ichiro Kano

法国, 圣康丁昂伊夫利纳, 密理博公司实验室纯水部门研发中心

摘要: 为了顺利地进行涉及到核酸,特别是 RNA 的分子生物学试验, 必须抑制核糖核酸酶 (RNases) 的降解。本文对制备“无核糖核酸酶”水的两个主要过程进行了对比, 这种比较基于有关 RNA 提取、RNA 分解、RNA 稳定性测试以及核糖核酸酶剂量等几种试验得到的结论。并对比了通过超滤法来清除核糖核酸酶与利用二乙基焦碳酸酯 (DEPC) 化学钝化核糖核酸酶两种方法。密理博纯水系统的超滤柱为二乙基焦碳酸酯 (DEPC) 处理方法的有效替代方案, 可按需提供高纯度无核糖核酸酶水。

简介

核糖核酸酶或者 RNases 由一个很宽范围内的降解酶组成, 这些酶广泛存在于大多数有机体以及大多数器官和人体体液中的。在这些蛋白质中, 存在着大小不一 (表格 1), 特别是功能不同的酶。¹几十种不同类型的 RNases 活跃在不同生物条件下 (例如, pH 值、温度以及离子强度等) 的核酸酶底物上。¹ RNases 的实例包括人体中²所发现的 RNases 1、2 (神经毒素 (EDN))、3 嗜酸粒细胞阳离子蛋白 (ECP)、4 与 5, 同时, 也包括在各种不同微生物中所发现的 RNases I、II、III、P、PH、R、D、T、BN、E、M 等³。

表 1: RNase 多样性之实例

名称	来源	MW【Da】	最有 pH 值
RNase A	胰腺与牛痘	13700	7-7.5
RNase I	胰腺与人体 2	14000	8
RNase I	细菌 3	27000	-
RNase III	E. Coli 3	25600x2	-
RNase T2	A. Oryzae 4	36200	4.5

RNases 的主要作用是用来降解核糖核酸

(RNA)。某些被称为核酸外切酶的核糖核酸酶将从外部极点开始此降解过程, 并且持续降解核酸分子, 同时, 被称作核酸内切酶的核糖核酸酶将在核糖核酸 (RNA) 分子的一定点处开始进行降解。RNases 具有不同的种类和酶作用物。例如, 人体 RNases 2 与 3 专用来降解单链核糖核酸², 而牛胰腺 RNase A 能够降解单链脱氧核糖核酸、双链脱氧核糖核酸以及环型脱氧核糖核酸。³由于 RNase A 酶底物作用物范围较广, 因此, RNase A 是一种常用于质量试验的核糖核酸酶, 这些质检方法旨在抑制或者检测 RNase 活性。

这些降解酶常用于降解异类核糖核酸 (RNA), 同时也是基因表达机制的一个组成部分: 核糖核酸酶用于信使核糖核酸 (mRNA)、核糖体核糖核酸 (rRNA) 以及转移核糖核酸 (tRNA) 的成熟步骤中, 同时也可用于通过降解信使核糖核酸 (mRNA) 和未曾使用的核糖核酸 (RNA) 的常规方法。最近, 通过科学研究工作, 已经获得了证据来证明 RNases 在主体防御

(host defense)²以及诸如抗肿瘤活性⁵、神经毒性³以及免疫抑制性⁶等的生理活动性中所起到的作用。

尽管抑制RNase活性是满足了大多数试验的要求，但是，在某些分子生物学保护化验过程中，仍使用了核糖核酸酶，达到避免受到外部核糖核酸（RNA）或者脱氧核糖核酸（DNA）的污染的目的。核糖核酸酶无处不在并且属于一种非常有效的酶，同时，在pg/L浓度至ng/L浓度之间具有一定的活性。因此，在避免受到外部污染源污染例如，体液（唾液与汗液）、管尖与管、实验室表面或者净化水和缓冲器^{7、8}等方面，核糖核酸酶具有极其重要的作用，在分子生物学或者生物工艺学试验需要使用到核糖核酸和/或脱氧核糖核酸（RNA 和/或 DNA）时，几乎每次均需要清除 RNases。此类临界试验的实例，如 PCR（聚合酶链反

应）以及反转聚合酶连锁反应（RT-PCR），质体的制备、互补 DNA 殖系基因库(cDNA library)、体外翻译（In vitro translation）、基因表达、RNA 印迹法以及体外受精。本论文阐述了如何抑制试验用的水溶液中 RNase 的活性。探讨了研制并用来抑制 RNase 活性的三种主要方法：在使用抑制剂基础上的酶变性作用；通过采取超过滤方法而进行的酶的清除。同时，更加详细地研究并比较了两种主要的方法：利用焦碳酸二乙酯（DEPC）处理方法与超过滤方法（UF）而抑制酶的活性。本文所阐述的是利用内置超滤柱（在 Milli-Q PF 系统中的 PyrogardTM5000 柱）和取水点（Point-of-use）一次性用超滤柱（Milli-Q Gradient 系统上所使用的 Pyrogard D 柱），许多试验方案中均采用了这两种技术：测量各种不同水源中 RNase 的含量、RNase 剪切化验、核糖核酸稳定性测试以及核糖核酸完整性测试。

抑制 RNase 活性

高压灭菌步骤

高压灭菌（在 121 摄氏度下连续灭菌 3 个小时）不能有效地降解RNases，即使是在 180 摄氏度下进行高压灭菌处理 4 个小时之后⁹，RNases仍会保持某些活性。而且，高压灭菌除了只能使这些蛋白质部分变性外，还能够高压消灭细菌，从而将更多的RNases释放到媒介中。变性酶也能够恢复到初始形式并且能够再次恢复部分活性。

二乙基焦碳酸酯（DEPC）

分子机制

利用二乙基焦碳酸酯（DEPC）处理方法使化学酶失活是用来抑制水溶液中 RNase 活性的最常见方法。二乙基焦碳酸酯（DEPC）是一种能够使 RNases 失活的可疑致癌物。基于分子结构基础 10，11，12 二发现的 RNases 的各种不同的催化机理将有助于更好地理解在二乙基焦碳酸酯（DEPC）与 RNases 之间发生的化学反应。我们最熟悉的催化机理之一指的是 RNase A（EC 3.2.27.5）13，14，是一种 124 氨基酸的核酸内

切酶。在常规酶机理中，组氨酸残基(His 12)——本机理中酶活性部位的一个关键氨基酸，在 RNA 分子主链的核糖 2 位置与羟基（OH）发生反应（图 1）。反过来，这也造成了磷酸二酯键(phosphodiester bond)的断裂，并生成两片核糖核酸。当酶与二乙基焦碳酸酯（DEPC）发生作用时，组氨酸 12 将与二乙基焦碳酸酯（DEPC）分子发生反应，形成共价氨基甲酸盐型链接（图 2），从而不再与核糖核酸分子发生反应。酶将永久性失活，但是，无法从溶液中清除此酶。

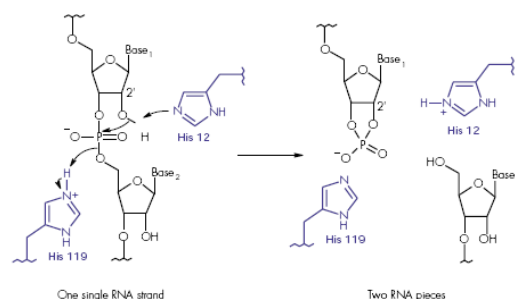


图 1：用 RNase A 进行 RNA 降解的常规催化机理。组氨酸残基（His 12 与 His119）属于 RNase A 活性部位的两个关键性氨基酸，并参与了化学反应。

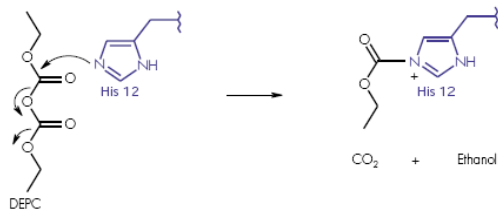


图 2: 用二乙基焦碳酸酯 (DEPC) 处理方法所形成的 RNase 的组氨酸 12 残基的失活性。

其他抑制剂，例如基于蛋白质的可逆抑制物，适用于某些 RNases，目前已经得以验证和发展用于专业应用。

二乙基焦碳酸酯 (DEPC) 处理方法对水质的影响

完整的两步骤二乙基焦碳酸酯 (DEPC) 程序包括使用 0.1% 的二乙基焦碳酸酯 (DEPC) 溶液对水进行 1 个小时的处理，随后，再进行高压灭菌 (在温度为 121 摄氏度情况下，进行 15 分钟) 来清除过多的二乙基焦碳酸酯 (DEPC)，否则，过量的二乙基焦碳酸酯 (DEPC) 将进一步试验中的生物材料发生反应。热的二乙基焦碳酸酯 (DEPC) 降解过程生成两种分子，即乙醇和二氧化碳 (图 3)。

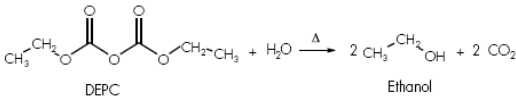


图 3: 二乙基焦碳酸酯 (DEPC) 热降解为乙醇和二氧化碳。

尽管大多数乙醇挥发了，但是，某些乙醇仍会保留在水溶液中，从而增加了总有机碳 (TOC) 含量。二氧化碳 (气体) 也部分挥发，但是，仍有部分二氧化碳溶解于水并与水发生反应，生成碳酸盐和碳酸氢盐离子 (图 4)。因此，二乙基焦碳酸酯 (DEPC) 处理过程所生成的两种副产品均作为纯水中的主要杂质而出现。表格 2 中总结了在不同的、经过二乙基焦碳酸酯 (DEPC) 处理水中所测量到的电导率与总有机碳 (TOC) 含量。同时，也包括经过超滤处理水。乙醇和已失活的 RNases 促成了较高的总有机碳 (TOC) 含量，同时，二氧化碳的存在也导致了较高的电导率，经过二乙基焦碳酸酯

(DEPC) 处理过的水的电导率大于 2uS/cm (或者说电阻系数低于 0.5 兆欧·厘米)。

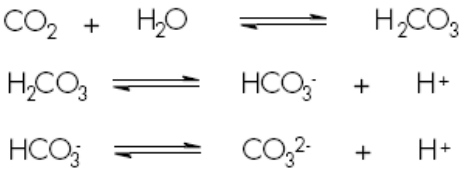


图 4: 二氧化碳在水中分解方程式以及水中的碳酸、重碳酸盐和碳酸盐的平衡。

表 2: 存储和二乙基焦碳酸酯 (DEPC) 处理方法对水质的总有机碳 (ppb) 与电导率 (uS/cm) 的影响。

水	总有机碳含量 (ppb)	传 导 率 (uS/cm)
二乙基焦碳酸酯 (DEPC) — 处理后的水—BIO101	122800	2.9
无 RNase 的水—Sigma	361	2.8
核糖核酸制备水—TAKARA	821	2.1
经 过 二 乙 基 焦 碳 酸 酯 (DEPC ^b) 处 理 过 的 Milli-Q™ ^a 水	15700	3.4
Milli-Q®系统+UF ^c 柱	<15	0.055

^a Milli-Q Gradient系统 (无内置UF柱): 一套包括离子交换树脂、活性碳以及紫外线光氧化 (185nm与 254nm) 的纯水精制系统。

^b 在进行完毕典型的二乙基焦碳酸酯 (DEPC) 处理步骤后，需在 121 摄氏度下进行 15 分钟的高压灭菌处理。

^c 13000Da NMWL截流的UF柱。

超滤

超滤是唯一一种能够从水溶液中真正清除 RNases 的方法。内置在丙烯腈丁苯橡胶 (ABS) 外壳中的聚砜超过滤膜由于向溶液中释放出离子¹⁵以及有机物质非常少，所以不会对水质造成影响，因此，Millipore选用了该超滤膜作为超纯水系统中超滤柱的主要成分。在一定水流率下的一定浓度范围中，超滤具有充分的截留作用。在流速为 500 毫升/分钟、选取RNase的两种极限浓度：极高浓度 1ng/mL以及极低浓度 0.1ng/mL，进行了相关试验。试验结果显示，本文所使用的超滤柱：13000Da标准分子量值 (NMWL)

截留的膜，当浓度为 0.1ng/mL时，在超过 200L容量（图 5）情况下，能够完全阻止 RNase A的渗透。在两种试验条件下，在超过过滤器上所收集的RNase A的数量分别为 39mg与 22mg。当浓度为 1.0ng/mL情况下，在体积达到 100L以后，检测到RNase A的浓度剧增。

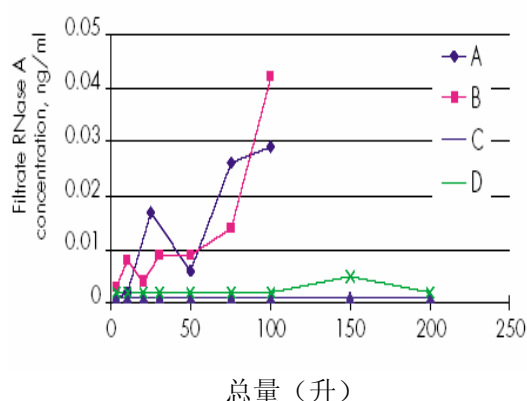


图 5: 在较大体积情况下对 RNase A 进行超滤处理。

通过强化存贮在容器中的反渗透水中的 RNase A（Roche Diagnostics 109 142）浓度为 1ng/mL（A 与 B）以及 0.1ng/mL（利用 Ambion 无 RNase 水对浓度为 1ng/mL 的溶液进行稀释而成）（C 与 D），从而制备此溶液。在流速为 500 毫升/分钟情况下，通过使用点超滤装置来实现过滤处理，同时，利用 Ambion RNaseAlert™ 荧光测定测试来监控 RNase 活性。

结论

不同水样中的RNase含量

在取自各个不同纯化阶段的水样中测试 RNase 活性。这里的试验测量极限值为 0.003ng/mL。本检测方法使用了可分解的、带有荧光标记的 RNase 酶底物（图 6）。修饰后的核糖核酸寡核苷酸将由 RNase 进行降解，同时，被绿色荧光探针释放出。只有含有 RNases 的样本方能在本试验中显示出绿光，而不含有 RNases 的样本不会发出荧光。荧光的含量与 RNases 存在的数量成正比，该数值能够使用荧光计进行测量。本试验为检测 RNase 提供了一种快速、定量测试方法。

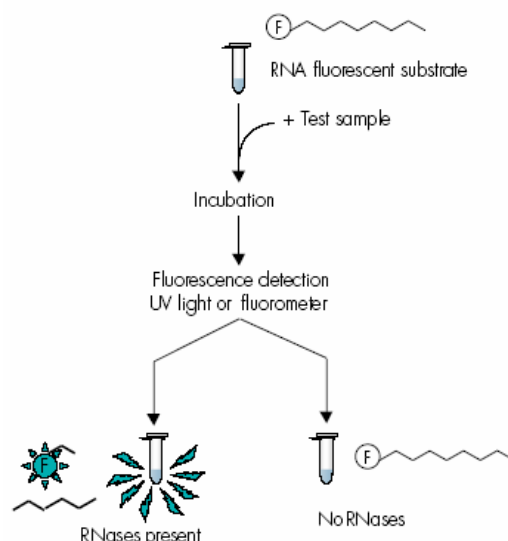


图 6: 荧光 RNase 检测工具示意图

表格 3 中给出了根据各种不同水样而得出的结论。结论 1 和结论 2、采取 DEPC 方法所生成的水以及无 RNase 水分别用作控制工具。在这两种情况下，RNase 含量低于检测限（小于 0.003ng/mL）。在严格条件下进行这些试验的重要性已经与 palm-drop-and-recovery 测试（结论 3）进行了清晰的阐述，这个实验表明在与皮肤接触时，水很容易受到高含量的核糖核酸酶的污染。自来水中 RNase 的数量（结论 4）相对较低，这是由于在自来水中所发现的细菌污染物质（是核糖核酸酶的主要来源）含量较低。综合运用电流连续去离子（EDI）与反渗透技术（结论 6）在清除大多数酶过程中，要比单独使用反渗透技术（结论 5）有效。然而，在任何情况下，水在存储以后，均可测量到浓度较高的 RNase，这可能是因为孳生了某些细菌的结果。很显然，RNase 在水中的含量大幅度提高，会使水变得浑浊（结论 8）。利用双波长（185nm+254nm）紫外线灯进行的有机分子光氧化方法应用到纯水系统（结论 9）中，的确降低了 RNase 浓度。配备了 UF 膜（结论 7 与结论 10）的系统在清除 RNases 方面非常有效，而 RNases 浓度也均低于这些结论中的检测限值。根据这些结论，我们可以看出，除非与水纯化过程中的特定阶段有关，否则，水样中的

RNases 数量与水的滞流和存储期间可能出现的细菌污染之间的关联很大。

表 3 水纯化过程的各个不同阶段中 RNase 的浓度。

Result	Water type / treatment	RNase concentration ng/mL
1	RNase-free ^a	< 0.003 ^f
2	DEPC-treated ^a	< 0.003
3	RNase-free water dropped on palm and recovered	0.390
4	Tap water	0.019
5	Reverse Osmosis ^b system + reservoir ^c	0.018 to 0.470
6	Elix ^d system + reservoir	0.008 to 0.016
7	Reverse Osmosis system + reservoir + UF cartridge ^e	< 0.003
8	Milli-Q Gradient system after power off for 90 days	0.440
9	Milli-Q Gradient system under normal conditions of use	< 0.003 to 0.012
10	Milli-Q Gradient system + UF cartridge ^e	< 0.003

注释：a 从 Ambion 购得。bMillipore RiOs™16 系统。c 从所采取的水样中馈入到 Millipore60L 聚乙烯容器中的纯净水。dMillipore Elix10 系统综合采用了反渗透技术与电流连续去离子技术。e 带有 13000 Da NMWL 截流的 Millipore Pyrogard D UF 柱。f “检测限值 0.003ng/mL”。

材料与方法

使用 Ambion RNaseAlert 测试工具。培育时间延长为 3 个小时从而达到 0.003ng/mL 检测限值。浓度为 10ng/mL 的 RNase Ambio 标准液用 Ambion 无 RNase 水进行稀释，从而获得校准曲线，浓度分别为 0.025ng/mL、0.05ng/mL 以及 0.1ng/mL。使用 SFM25，Kontron 仪器荧光计，按照协议的要求，激发波长设定为 490nm，而发射波长则设定为 520nm。

Rnase 稳定性试验

本试验的目的是为了显示超滤在从水溶液中清除 RNases 的效率和保护 RNA 不受到 RNases 的分解。用 4ng/mL RNA 溶液 10uL 注入样品，并在 37 摄氏度情况下培育 1 个

小时。随后，利用琼脂糖凝胶电泳来监控分解过程（图 7）。利用下面所列示的方法，对如下溶液进行了分析：RNase A 溶液（1ng/mL、lane 1、2 以及 0.1ng/mL、Lane 3、4）作阳性对照，同时，经过 DEPC 处理过的水作阴性对照（lane9、10），随后，浓度为 1ng/mL（lane5 与 6）以及 0.1ng/mL（lane7 与 8）的溶液将根据超过滤要求进行净化（75 毫升/分钟、13000 Da NMWL 截流的膜）。结论显示浓度为 0.1ng/mL 的 RNase 溶液经过超过滤处理后与阴性 DEPC 对照所获得的结果相似。在一个小时后，没有检测到 RNA 出现降解，并且，基于凝胶电泳而观察到的条带情况也与 DEPC 处理水的条带情况类似。浓度为 1ng/mL 的溶液无法利用 UF 柱有效处理，某些 RNase 活性仍然保留，图示为凝胶电泳上 RNA 降解情况。

材料与方法

根据如下说明中所述标准步骤来制备琼脂糖凝胶电泳：基于 TBE 缓冲液、浓度为 1 %并含有 0.5ug/mL 溴化乙锭的琼脂糖凝胶。从配备有 Pyrogard D 柱的 Milli-Q Gradient 超纯水系统中获取水源。

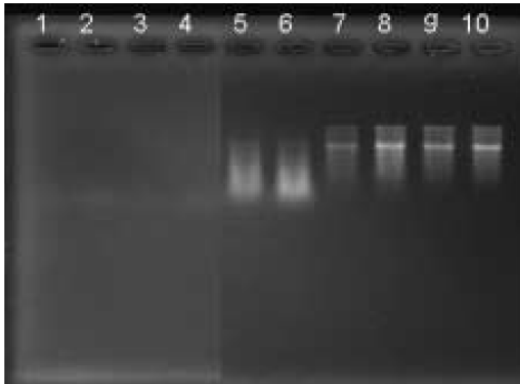


图 7 琼脂电泳。1-2: RNase 溶液 1ng/mL;3-4: RNase 溶液 0.1ng/mL;5-61ng/mL 以 75ml/min 超滤的 RNase 溶液; 7-8: 0.1ng/mL 以 75ml/min 超滤的 RNase 溶液; 9-10: DEPC 处理样品

核糖核酸（RNA）稳定性测试

在用各种不同条件处理从而抑制 RNase 活性并防止 RNases 分解核糖核酸的水中检查了 rRNA 稳定性。本试验是通过将琼脂糖凝胶电泳置于生物分析仪中的方式来完成本试验的。在微通道中进行电泳分离的 rRNA 样本（18S 与 28S 条带）可通过荧光进行检

9)。在经过 DEPC 或 UF 处理过的水中所制备的样本在 37℃ 培养 1 个小时、24 小时，

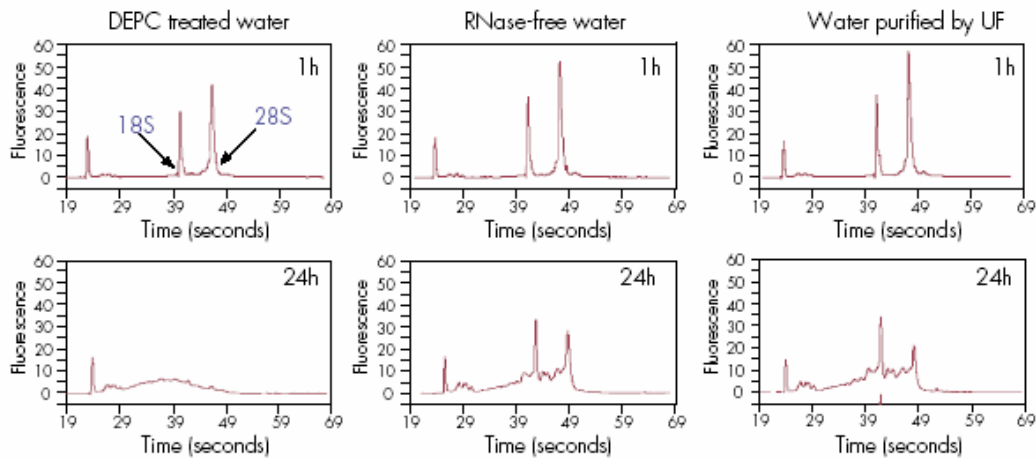


图 8: 利用琼脂糖凝胶微电泳以及荧光检测方法 (Agilent Bioanalyzer2100) 来研究不同水质水样中 rRNA 的稳定性: 经过 DEPC 处理过的水、Ambion 的无 RNases 水以及经过 UF 纯化处理后的水 (13000Da NMWL 截流的膜)。

并与用“无 RNase 水”中所制备的样本比较 (注释: Ambion “无 RNase 水”是通过过滤方法获得)。通过将 RNA 转换为较小的片断以及 rRNA 峰值荧光信号的减弱, 能够很容易地检测到 RNA 的分解情况。与经过 DEPC 处理过的水相比, 利用超滤方法处理后水中的样本的稳定性大大提高。本文提出两种主要的假设情况来解释这些结论。第一个假设是基于水质差别而提出的。如表格 1 中所述, 用来使 RNases 失活的 DEPC 处理方法将降低了水质, 表现为有机物浓度与重碳酸盐浓度增加。大量碳酸盐和重碳酸盐离子的存在不仅仅使电阻系数大幅度下降, 而且会影响到溶液的 pH 值, 而溶液的 pH 值的变化则对 RNA 稳定性带来不利影响。另一方面, 超滤不会改变水质 (表格 1), 而且, RNA 在这些条件下 (图 8) 更加稳定。第二个假设是基于 RNases 将在经过 DEPC 处理后恢复部分活性, 缓慢消化水样中的 RNA 的可能性。由于 RNase 已经从溶液中测 (图 8), 并转换为类似凝胶体的图像 (图

被清除, 因此, 对 UF 柱而言, 这种情况不会发生。

材料与方法

利用带有 RNA6000 纳米芯片的 Agilent2100 生物分析仪进行试验。本试验所使用的 RNA 为老鼠胸腺的总 RNA (Ambion)。无 RNase

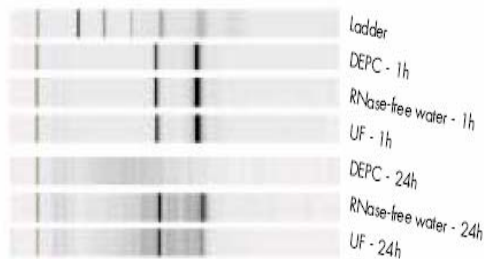


图 9: 从荧光检测结果转换而来的、类似凝胶的图像 (Agilent 生物分析仪 2100)。

水与经过 DEPC 处理后的水均可从 BIO-101 购得。在红色通道上可以检测到激发值为

630nm, 发射值为 680nm 的荧光。RNA6000 梯度为一组长度为 0.2、0.5、1.0、2.0、4.0

与 6.0ng/ul (A260) 的共计六个 RNA 转录本。0.2kb 条带的浓度为 20ng/ul (A260)。

RNA 的制备

利用经过 DEPC 处理过的 16、高压灭菌溶液或者经过 UF 净化的水 (5000Da NMWL 截流) 从不同的兔子的组织: 大脑、心脏、肺部、肝脏以及膀胱, 人体海绵体平滑肌细胞 (HCCSMC) 中分离总 RNA。在琼脂糖凝胶上对样品进行电泳处理, 并用溴化乙锭染色 (图 10)。试验过程中几乎观察不到可检测的 RNA 降解情况, 同时, 在利用经过 DEPC 处理过的水以及 UF 处理后的水所制备的 RNA 样本之间, 不存在很大的差异。对于所有兔子组织以及人体海绵体平滑肌细胞 (HCCSMC) 而言, RNA 28S/18S 之间的比率约为 3: 1, 由于个别组织富含 RNases, 因此非常明显。

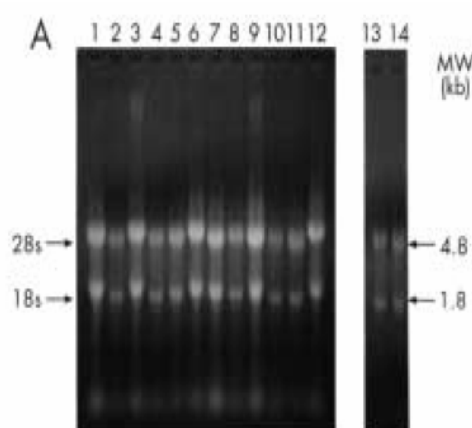


图 10: 从 RNA 制备中所获取的 EB 染色、1% 甲醛的 RNA 凝胶。Lane1—6: 利用 DEPC 处理过的溶液, 从兔子大脑、心脏、肺部、肝脏、肾以及膀胱制备 RNA。Lanes7—12: 利用配有 UF 的 Milli-Q 所获取的水, 从兔子大脑、心脏、肺部、肝脏、肾和膀胱 (5000Da NMWL 截流) 来制备 RNA。Lanes13 与 14 则显示了使用 DEPC 处理过的水 (lane 13) 和 Milli UF 水 (lane 14) 由人体海绵体平滑肌细胞 (HCCSMC) 所制备的第二种凝胶样本。

材料与方法

人体海绵体平滑肌细胞 (HCCSMC) 将按照参考文献 17 与 18 中阐述的情况而生长。利用 4M 异硫氰酸胍和 15mM 巯基乙醇中的细

胞层溶解的方法来制备 RNA, 随后, 利用苯酚/氯仿萃取的方法以及异丙醇沉淀方法进行 RNA 的制备。给兔子进行放血可以从 3 到 5 公斤重的新西兰雄性兔子提取组织, 并立即进行冷却。在干冰上, 利用研钵来将各种组织研磨成末。在 4M 异硫氰酸胍和 15mM 巯基乙醇中将粉末处置均匀, 随后, 利用苯酚/氯仿萃取的方法以及异丙醇沉淀方法进行 RNA 的制备。RNA 再次溶解在将要测试的水中, 并利用等体积的氯仿与接着等体积的苯酚进行 RNA 萃取。RNA 将再次溶解在将要测试的水中, 在吸光值 260nm 时检测 RNA 浓度。在使用之前, RNA 将在乙醇悬浮存储。从人体海绵体平滑肌细胞 (HCCSMC) 提取的 10 微克总 RNA 以及从兔子组织所提取的 15 毫克总 RNA 将在 1% 甲醛——MOPS 溶液琼脂糖胶上进行电泳处理。

RNA 完整性测试

先前利用凝胶电泳进行提取与分离的 RNA 样本的完整性需要通过 RNA 印迹分析进行检测。本技术能够确保 RNA 分子在萃取与分离过程中不受到损伤。图 11 给出了图解过程。老鼠纤维连接蛋白 2 型以及人体 GADPH 基因特异性 (图 12) 进行 Northern blots 杂交。纤维连接蛋白与 GADPH 基因特异性属于普遍存在的基因, 由于在大多数的组织和细胞中均存在着相应的 mRNA, 使得他们成为非常有用的工具。因此, 他们的 DNA 最有可能与其取自各类组织的样本中提供的未受损的 mRNA 进行杂交。当大脑、心脏或者肾中的纤维连接蛋白的含量很低时, 在经过 DEPC 处理的水溶液中以及利用 UF 处理过的水之间, 在肺部、肝脏和膀胱之间的对比并没有显示出可检测出的差异。

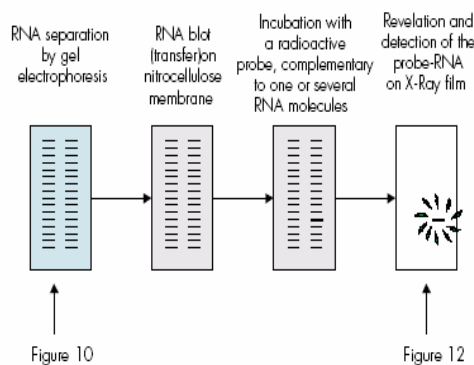


图 11: RNA 印迹杂交的示意过程

材料与方法

按照如上所阐述的琼脂糖凝胶电泳, 总 RNA 转换至经过尼龙强化处理的确化纤维上。18 利用紫外线处理这些膜从而固定核酸。利用 T7DNA 聚合酶以及随机引物, 适用于含有 2 型老鼠纤维连接蛋白 (Psr270) 与 554-bp HindIII/XbaI GAPDH 基因特异性的双链 DNA 探针带有【a-32P】dCTP 标签。特殊

活性范围从 108 至 109cpm/mg。在温度为 67 摄氏度情况下, 两个小时内进行杂交。按照较低的要求【2XSSC0.1%SDS】以及较高的要求【0.2XSSC0.1%SDS】漂洗, 过滤器在零下 70 摄氏度温度下曝露在 XAR-5 膜下 24-48 小时。

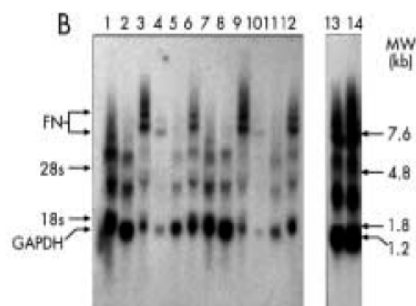


图 12: 与图 10 相对应的 RNA 印迹杂交

结论

本文所阐述的试验需使用两种类型的超滤柱。内置Pyrogard5000 柱具有一个 5000Da NMWL 截留膜, 在Milli-Q PF、Milli-Q Biocel以及Milli-Q Synthesis系统中均有该类纯化柱。第二个是Pyrogard D柱, 属于取水点一次性超滤器: 此 13000Da NMWL截留UF柱能够连接到纯水系统出水口上, 如Milli-Q Gradient、Synergy™以及Simplicity系统。这两种UF柱均能够生产无RNase的水。

这些试验表明, 超滤处理可有效取代 DEPC 处理方法生产无 RNase 水。而 DEPC 处理方法仍属于为水添加杂质的繁冗步骤, 并且无法与诸如 Tris 以及 HEPES 缓冲液等氨基缓冲液结合使用。而且, DEPC 为可以致癌物质, 因此需要小心处理。

超滤方法与 DEPC 处理方法相比, 提供一种更简单、更快捷的替代方法, 并能够直接与纯水系统整合使用。此外, 在使用具有 UF 的超纯水系统制备的纯水, 无论在总有机碳含量 (小于 20ppb) 方面还是在离子含量 (电阻率为 18.2 兆欧·厘米) 方面, 所生成的水均显示出比其它方式更高的水质特点。

参考文献

1. D' Alessio, G.; Riordan, J.F. "Ribonucleases: Structures and functions". Academic Press, New-York, (1997).
2. Sorrentino, S.; Libonati, M. "Structure-function relationships in human ribonucleases: main distinctive features of the major RNases". *FEBS Letters*, 404, 1-5, (1997).
3. Nicholson, A.W. "Function, mechanism and regulation of bacterial ribonucleases". *FEMS Microbiology Reviews*, 23, 371-390, (1999).

RD 008: 通过超滤方法制备超纯水针对核糖核酸酶 (RNase) 敏感的应用

4. Uchida, T.; Egami, F. "Microbial ribonucleases with special reference to RNases T1, T2, N1, and U2" .*The Enzymes*, Boyer, E.D., Eds, 3rd ed, Vol 4, pp 205-250, Academic press, New-York, (1971).
5. Matoucek, J. "Ribonucleases and their antitumor activity" . *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 129,175-191, (2001).
6. Soucek, J.; Raines, R.T.; Haugg, M.; Raillard-Yoon, S.-A.; Benner, S.A. "Structural changes to ribonuclease A and their effects on biological activity" . *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 123, 103-111, (1999).
7. Blumberg, D.D. "Creating a ribonuclease-free environment." *Meth. Enzym.*, 152, 20-24, (1987).
8. Wintzingerode, F.; Gobel, U.B.; Stackebrandt, E. "Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis" . *FEMS Microbiology Reviews*, 21, 213-229, (1997).
9. Ambion website: www.ambion.com.
10. Terzyan, S.S.; Peracaula, R.; de Llorens, R.; Tsushima, Y.; Yamada, H.; Seno, M.; Gomis-Ruth, F.-X.; Coll, M. "The three-dimensional structure of human RNase 4, unliganded and complexed with d(Up), reveals the basis for its uridine selectivity" . *J. Mol. Biol.*, 285, 205-214, (1999).
11. Filippov, V.; Solovyev, V.; Filippova, M.; Gill, S.S.. "A novel type of RNases III family proteins in eukaryotes" . *Gene*, 245, 213-221, (2000).
12. Loverix, S.; Winqvist, A.; Stromberg, R.; Steyaert, J. "Mechanism of RNase T1: concerted triester-like phosphoryl transfer via a catalytic three-centered hydrogen bond" . *Chem. Biology*, 7, 651-658, (2000).
13. Findlay, D.; Herries, D.G.; Mathias, A.P.; Rabin, B.R.; Ross, C.A. "The active site and mechanism of action of bovine pancreatic ribonuclease A" . *Nature*, 190, 781-784, (1961).
14. Raines, R. "Ribonuclease A" . *Chem. Rev.* 98, 1045-1066, (1998).
15. Mabic, S.; Darbouret, D.; Kano, I. "Qualification study of a point-of-use ultrafiltration device for the production of pyrogen-free ultrapure water" . *The R&D Notebook*, Millipore RD006 (2001).
16. Ehrenberg, L.; Fedorak, I.; Solymosy, F. "Diethylpyrocarbonate in nucleic acid research" . *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 16, 189-262, (1976).
17. Moreland, R.B.; Traish, A.M.; McMillin, M.A.; Smith, B.; Goldstein, I.; Saenz de Tejada, I. "PGE1 suppresses the induction of collagen synthesis by transforming growth factor- β 1 in human corpus cavernosum smooth muscle" . *J. Urol.*, 153, 826-834, (1995).
18. Huang, Y.-H.; Leblanc, P.; Apostolou, V.A. ; Stewart, B. ; Moreland, R.B. "Comparison of Milli-Q PF Plus water to DEPC-treated water in the preparation and analysis of RNA" . *BioTechniques*, 19, 656-661,(1995).

密理博中国有限公司翻译

Lit. 号: RD008EN00.2001年在法国印制 版权©2001,

Millipore 有限公司, Bedford, MA, U.S.A. Millipore, Milli-Q and Elix 是 Millipore 有限公司的注册商标。

Milli-Q 和 Progard 是 Millipore 有限公司的商标。Dionex 是 Dionex 有限公司的注册商标。版权所有, 违者必究。