天净沙系列

CAT#:230650

低温运输，-20℃保存

天净沙

SkyGreen RNA 染料

SkyGreen RNA Stain

使用手册 V0.8

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

SkyGreen RNA 染料是一种超灵敏的荧光核酸染料，用于溶液内 RNA 的定量检测。在大量分子生物学实验过程中对微量 RNA 的检测和定量特别重要，这些过程包括：体外转录 RNA 产量的测定，以及在进行 Northern Blot、S1 核酸酶实验、RNase 保护实验、cDNA 文库制备、逆转录 PCR 和差异显示 PCR 前对 RNA 浓度的测定。核酸浓度测定最常见的方法是测量 260 nm 波长处的吸光值（A260），然而，基于吸光值检测法主要的缺点在于蛋白和游离核苷酸对光信号具有较大的干扰，以及检测灵敏度较低（A260=0.1 相当于溶液中 4 μg/mL 的 RNA）；而应用灵敏的荧光核酸染料能避免很多由于这些因素引起的问题。它具有下列特点：

1. 探针与 RNA 结合后最大激发波长~500 nm，最大发射波长~525 nm。
2. 通过荧光酶标仪、标准的荧光光度计或滤光荧光计来测量，能定量浓度低至 1 ng/mL 的 RNA。
3. 灵敏度高，200 μL 的反应体系可检测低至 200 pg RNA，这一灵敏度比基于溴化乙锭的荧光分析法高 200 倍，比基于紫外吸收峰的分析法高 1000 倍。
4. 使用两个染料浓度，为 200×（High-range assay）和 2000×（Low-range assay），即使体系内存在核酸制备物中常见的几种杂质（包括：核苷酸、盐类、尿素、乙醇、氯仿、表面活性剂、蛋白和琼脂糖），SkyGreen RNA 染料可测量的 RNA 浓度线性范围仍能达 3 个数量级，从 1 ng/mL 到 1 μg/mL RNA。其中，高宽度实验（High-range assay）能定量 1 ng/mL-50 ng/mL 的 RNA，低宽度实验（Low-range assay）能定量 1 ng/mL-50 ng/mL 的 RNA。
5. 由于 SkyGreen RNA 染料也会结合 DNA，需先用 DNase 预处理混合样品，再用 SkyGreen RNA 染料进行 RNA 选择性的定量分析。
6. 本品以溶于 DMSO 的母液形式提供。
7. 本产品可供 2 mL 体积的 20 次 RNA 的高宽度定量，200 次 RNA 的低宽度定量。
8. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品使用 logo 热封袋包装

成分	编号	规格	包装
SkyGreen RNA 染料	230650	100 μL	0.5 mL 棕色管
使用手册	230650sc	1 份	无

运输及保存

低温运输，-20℃避光保存，有效期一年。

自备试剂	RNA 样品，无核酸酶水，20×TE 缓冲液（RNase-free），RNA Standard，荧光比色皿以及荧光光度计/全黑 96 孔板以及荧光酶标仪，10×DNase digestion buffer，无核糖核酸酶的 DNase I。
使用方法	**一、反应缓冲液准备** 1. 于实验前，将 20×TE 缓冲液（RNase-free）用无核酸酶水稀释到 1×TE 缓冲液，用于稀释 SkyGreen RNA 染料和 RNA 样品。注意：必须保证 TE 缓冲液没有受到核酸及核酸酶的污染。 **二、确定染料浓度** 2. 在 SkyGreen RNA 染料的 RNA 定量检测中，为了获得完全的线性动力学范围，需要使用两个不同的染料浓度。在准备 SkyGreen RNA 染料的工作液之前（见下试剂准备），需要先决定是希望测定高宽度实验（High-range assay）（20 ng/mL-500 ng/mL RNA），还是低宽度实验（Low-range assay）（1 ng/mL-50 ng/mL RNA），或两个范围都要检测。 **三、SkyGreen RNA 染料水溶性工作液的制备** 3. 实验当天，在无菌的一次性聚丙烯塑料管内制备 SkyGreen RNA 染料水溶性工作液。 4. 在 5 μL SkyGreen RNA 染料中加入 1×TE 缓冲液至 2 mL，得到高宽度实验的 SkyGreen RNA 染料水溶性工作液；在 0.5 μL SkyGreen RNA 染料中加入 1×TE 缓冲液至 2 mL，得到低宽度实验的 SkyGreen RNA 染料水溶性工作液。注意：制备好的 SkyGreen RNA 染料水溶性工作液需避光保存。最好在工作液配制后数小时内用完，不要长期保存待用。注意：避免使用玻璃器皿，因 SkyGreen RNA 染料可能粘附到玻璃表面。 **四、制备 RNA 标准曲线** 对于标准曲线，可以使用商业化的 RNA Standard，比如：普遍使用的 16S 和 23S 核糖体 RNA；或其它纯化的 RNA 制品。有的时候，推荐使用与待测定样本类似的 RNA 标准来建立标准曲线。一般来说，绝大多数单链的 RNA 分子能产生几乎等同的荧光信号。在核苷、盐、尿素、乙醇、氯仿、去污剂、蛋白质和琼脂糖这些常见的污染核酸试剂的化合物存在时，SkyGreen RNA 染料的检测结果仍可维持良好的线性关系，即使荧光强度可能会受到影响。为了确保达到有效的对照，用于制备标准曲线的 RNA 溶液应该与待测样本保持一致，这样能保证含接近相似水平的杂质化合物。

5. 在塑料瓶中用 1×TE缓冲液配制浓度为 2 μg/mLRNA 溶液。用比色杯在 1 cm 长度通路下测量该 RNA 溶液在 260 nm (A260)下的基本吸光值，A260＝0.05 相当于 RNA 浓度 2 μg/mL。
6. 制作 High-range 标准曲线时，通过稀释 2 μg/mL RNA 溶液配制一系列的 2× 终浓度 RNA 标准溶液至一次性无核酸酶的塑料管中，最后转移到比色皿或培养板中。
7. 制作 Low-Range 标准曲线时，通过稀释 2 μg/mL RNA 溶液配制一系列的 2× 终浓度 RNA 标准溶液至一次性无核酸酶的塑料管中，最后转移到比色皿或培养板中。
8. 等体积混合 SkyGreen RNA 染料工作液和 2×RNA 标准溶液。于室温避光孵育 2-5 min。务必确保测量容器内加入了足够体积的测量液，对 10×10 mm 比色皿来说，不能低于 2 mL；对 96 孔板的各孔来说，不要低于 200 μL。
9. 选择使用荧光光度计或荧光酶标仪来测定样本荧光值，选择标准的荧光素波长（激发~480 nm，发射~520 nm）。
10. 将每个样的荧光值减掉空白的荧光值。之后使用校正好的荧光值为纵坐标，RNA 浓度为横坐标，来建立标准曲线。

五、样本分析

11. 用 1×TE缓冲液稀释样品到合适体积（比如：1.0 mL 到 10×10 mm 比色杯或 100 μL 到 96 孔微孔板）。最好每个待测样本做不止一个稀释倍数。待测样本稀释倍数越高，越有助于降低特定污染物的干扰作用。然而,也要避免特别小的样本体积，因为难以准确测量。另外，同一个实验中，杂质水平尽量保持一致，要降低杂质引起的样品之间信号差异。例如，如果一系列 RNA 样品含盐浓度相差很大，那么它们就无法用一个简单的标准曲线来进行比较。为了避免这样的问题，如果可能，调整所有样品中杂质浓度到相同水平。
12. 每个样品中加入等体积 SkyGreen RNA 染料测量试剂，于室温避光孵育 2-5 min。
13. 选择与标准曲线测定时相同的仪器参数来测定样本荧光值。为了降低光漂白效应，所有样本的荧光测定时间保持不变。将每个样的荧光值减掉空白的荧光值。根据已经产生的 RNA 标准曲线来确定样本的 RNA 浓度。可能的话，通过做不同的样本稀释再重复测定，来验证定量结果。

六、样本中的 DNA 清除

	SkyGreen RNA 染料也可以结合 DNA。可以先用无 RNA 酶的 DNA 酶来去除样本中的 DNA，从而避免由于 DNA 和 SkyGreen RNA 染料结合产生的荧光干扰，确保样品中的荧光全部来自 SkyGreen RNA 染料和 RNA 的结合。 14. 准备 10× DNase digestion buffer：无核酸酶的 200 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM $MgCl_2$，20 mM $CaCl_2$。 15. 向每个含 DNA 样品中加 0.11 倍体积的 10×DNase digestion buffer。例如，如果样品为 9 mL，就加入 1 mL 的 10×DNase digestion buffer。 16. 按照 1 μg DNA 添加~ 5 unit 的无 RNase 的 DNase I。 17. 37℃孵育 90min。 18. 用 1×TE缓冲液至少 10 倍稀释样品以降低消化液中残留盐离子对 SkyGreen RNA 染料测量产生干扰。 19. 按照上述步骤进行 SkyGreen RNA 染料测定实验。
关联产品	PicoGreen 超敏 dsDNA 定量试剂盒