

默克純水報 H₂O 教室



親愛的純水用戶：

您好。

上一期我們討論「純水品質對於化學分析結果的影響」，希望已經讓您對於純水/超純水在化學分析上的影響有初步的了解及概念。

本期的內容將針對「生物實驗及 RNA 實驗對水質的要求」進行探討。純水品質對此兩類實驗亦扮演非常重要的角色。

再次感謝您的閱讀，也希望此篇文章對您的實驗有很大助益。



默克密理博事業體
純水技術處 敬上

第二期

「純水水質對於生物及 RNA 實驗結果的影響」¹

2012. 6. 15

生物實驗對水質的要求

對生物而言，水是不可或缺的物質，這是因為生物體內大多數的反應都需要水分子的參與。超純水可用於液體培養基的配製、各種酵素的緩衝液，或者作為分子間相互作用的反應液。當我們進行試管內 (in vitro) 反應時，如何盡可能的與體內反應一致是非常重要的，若混入與體內反應不同的干擾物質，便可能造成反應速率的抑制，因此對這些不需要的干擾物質，必須予以去除。

如果以不同水質的超純水來配製無血清培養基以培養神經幹細胞，結果如圖 1 所示。使用經超濾膜與紫外線照射處理的超純水所培養的神經幹細胞，可以生長延伸為良好的樹突狀細胞型態，而使用未經超濾膜與紫外線照射的超純水所培養的神經幹細胞，則呈圓形，表示細胞生長受到抑制作用。



超純水 (未使用超濾膜與紫外燈)

超純水 (使用超濾膜與紫外燈)

圖 1 不同超純水對無血清培養神經幹細胞的影響

RNA 實驗對水質的要求

1) 使用 DEPC 來去除 RNase 的利弊得失

使用無 RNase 的超純水來進行原位雜交 (in situ hybridization)，並與 DEPC (Diethyl Pyrocarbonate) 處理過的水來作比較 (所謂 DEPC 處理，是傳統去除 RNase 水的製作方法。這是在純水中加入 0.1% (v/v) 的 DEPC，經數小時的攪拌使 RNase 失去活性，之後再以高壓滅菌鍋來分解殘留的 DEPC)，分析結果發現，二種水質所得的結果相同。

但是由於 DEPC 處理過程相當耗費時間，降低了原位雜交 (in situ hybridization) 實驗的

效率。並且，有報告指出 DEPC 有致癌性，應避免使用。同時 DEPC 屬於強化學修飾劑，高溫高壓處理後仍有殘留的可能性，會對其它的酵素活性產生抑制。

透過 RNA stability test 亦可比較不同水質處理對 RNA 實驗的影響。RNA stability test 是經由不同 RNA 樣品處理以抑制 RNase 活性後，比較 rRNA 含量的變化。此實驗使用生物偵測器 (bioanalyzer) 中的 agarose gel 微電泳，rRNA (含 18S 及 28S bands) 再經由螢光偵測 RNA 峯的強度 (圖 2) 並模擬出類似 RNA 電泳的結果 (圖 3)。

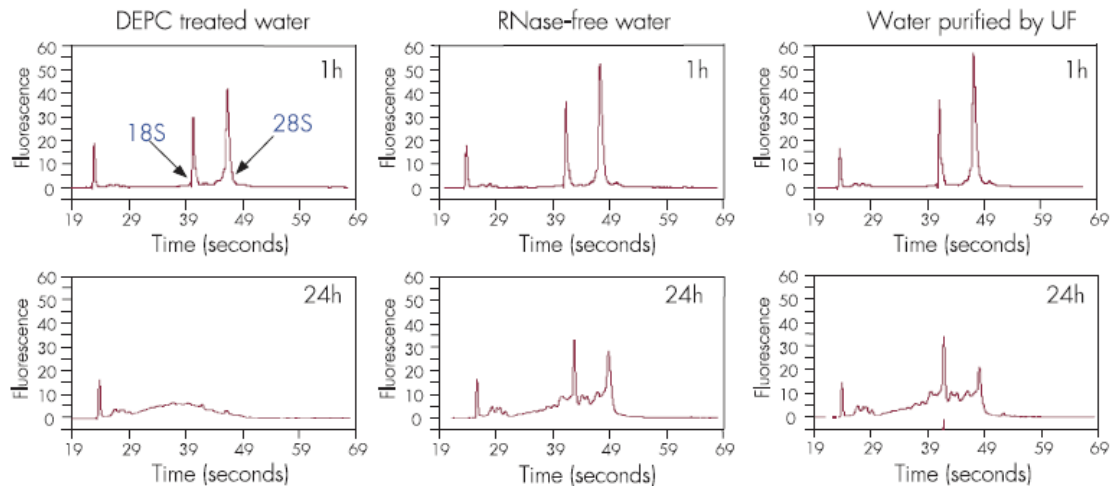


圖 2 不同水質處理對 RNA 穩定性的影響

三樣品 (DEPC 處理, 超過濾膜 UF 處理, 市售 RNase-free water) 分別於 37°C 放置 1 hr 及 24 hr，RNA 的分解可因 RNA 片段大小的分佈變化及 rRNA 螢光偵測峯的減弱輕易觀察得。實驗結果得知，超過濾膜 (UF) 處理的純水，其中的 RNA 穩定性較 DEPC 處理的純水高 (圖 2)。可能的原因有二：第一，DEPC 雖會抑制 RNase 活性，但會增加水中有機物及 bicarbonate 的濃度，此現象不但使比阻抗值大幅下降，亦會改變 pH 值，進而降低 RNA 的穩定性。然而，超過濾膜 (UF) 處理的純水不影響水的品質，RNA 因此較穩定 (圖 2)。第二種可能性為，DEPC 處理的純水中，RNase 可能隨著時間恢復部分活性，並緩慢降解樣品中的 RNA。這種現象不會在超過濾膜 (UF) 處理的樣品中發生，因 RNase 已於水中完全被去除了。

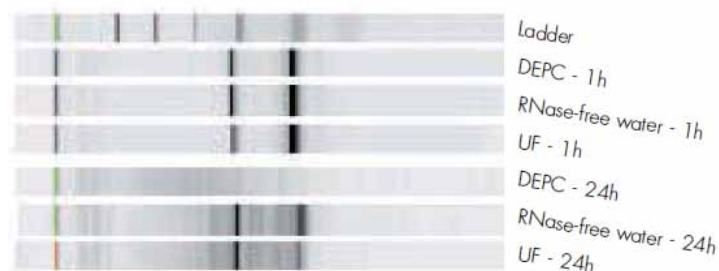


圖 3 螢光偵測所得之模擬 RNA 電泳影像 (Agilent Bioanalyzer 2100)

近來，在生物學與分子生物學領域中經常使用 LC/MS、HPLC 與 DNA 晶片等儀器進行分析檢測，因此需要使用不含內毒素、RNase 而且有機物含量極低的超純水。DEPC 水雖然不含 RNase，但含有許多 DEPC 分解後所產生的離子與有機物質，將對水質造成不良影響。因此，使用具有超濾膜與紫外燈的超純水系統，所生產的不含內毒素，不含 RNase 超純水，對於生物實驗而言是一項趨勢 (圖 4)。

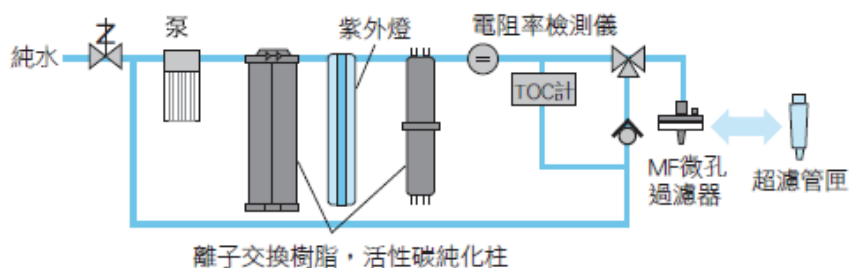


圖 4 使用超濾膜來產生 RNase Free 水的超純水系統

在生產 RNase-free 純水時，可通過在超純水系統中安裝超濾膜來精製。在預處理中應使污染物的濃度盡可能的降低，然後在超純水裝置中設置超濾膜，就可有效地去除分子量在 10,000 ~ 30,000 Dalton 的 RNase。

實驗時使用隨取隨用的 RNase-free 超純水，就能避免使用 DEPC 處理而導致對實驗的不利影響。

在 RNase-free 的條件下，比較了兩種水質 (經過超濾膜和紫外燈照射的超純水和蒸餾水) 對實驗的影響 (圖 5)。實驗結果可見：與超純水相比，使用蒸餾水的實驗結果訊號強度相對較弱。在 RNA 實驗中，有可能會由於試劑和水的存放引起 RNase 的污染，所以請務必對 RNase-free 的純水以隨取隨用方式使用。同時，取水的環境也要考慮到是否會造成另外的污染。

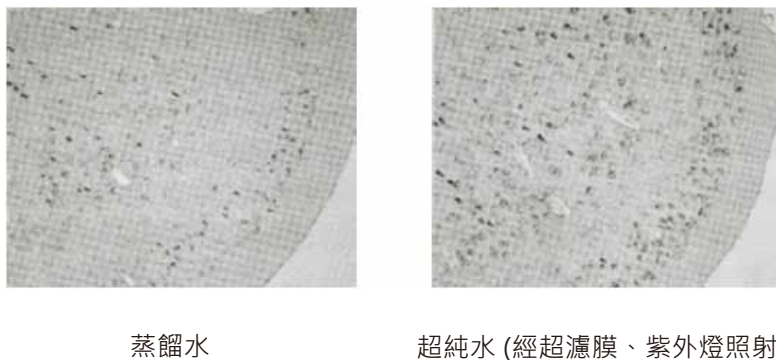
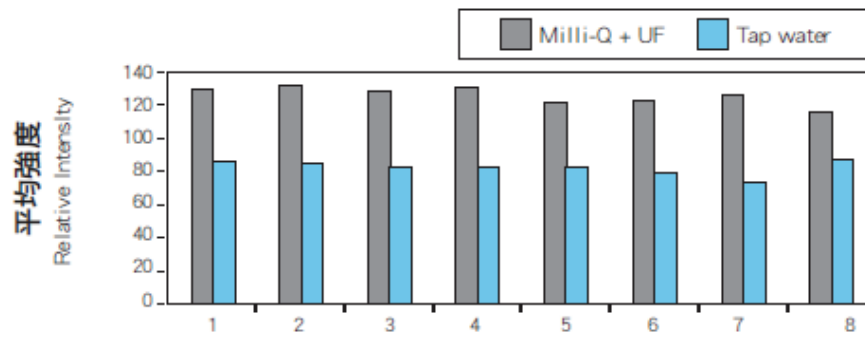
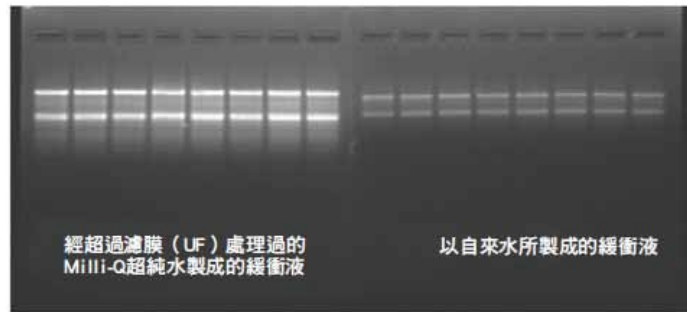
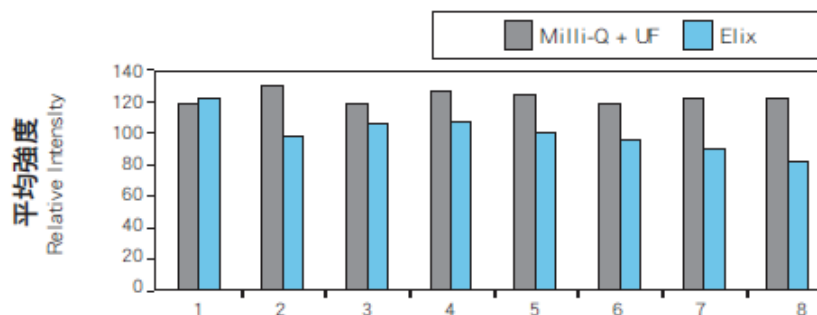
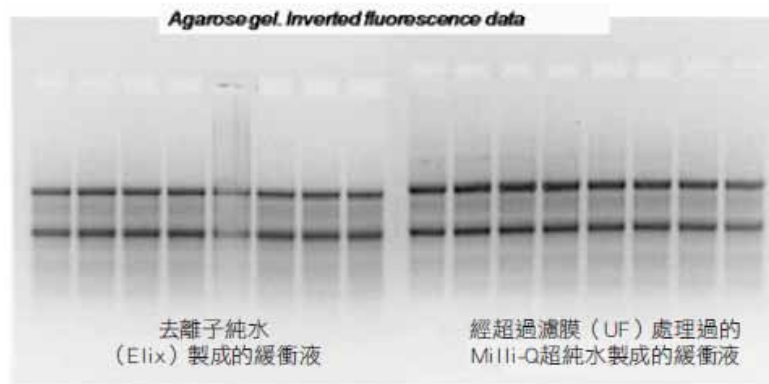


圖 5 鼠腦組織切片肌動蛋白原位雜交 (in situ hybridization) 的結果

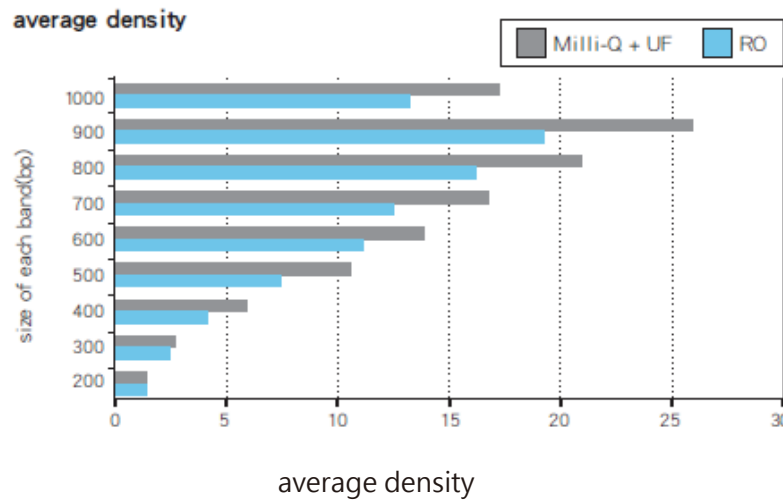
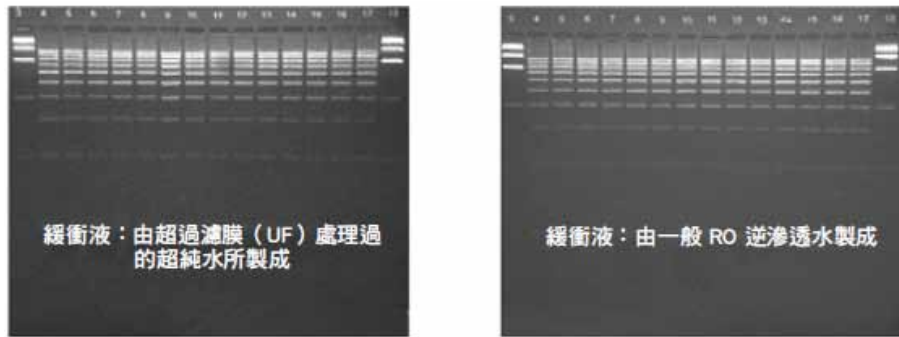
2) 比較在不同水質的緩衝液狀態下，對 RNA 電泳實驗的影響 (1)



比較在不同水質的緩衝液狀態下，對 RNA 電泳實驗的影響 (2)

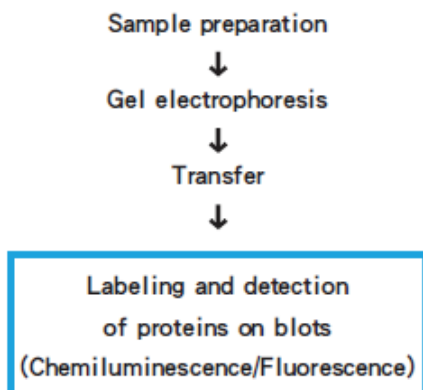


3) 比較在不同水質的緩衝液狀態下，DNA 電泳實驗的影響

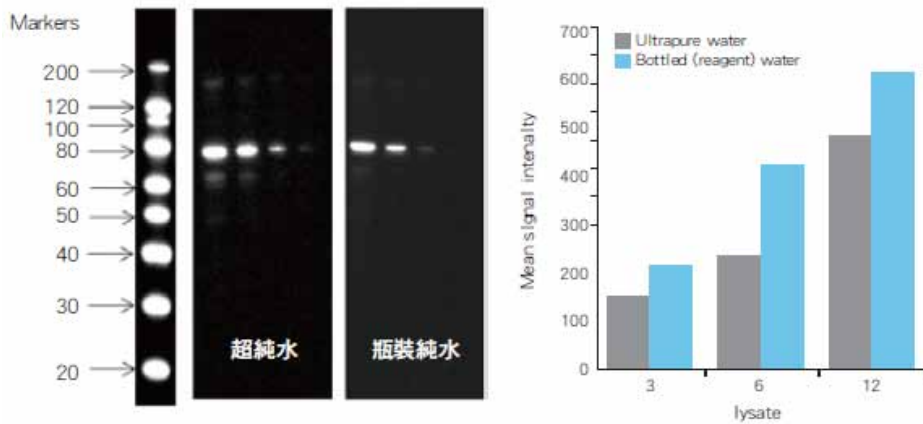


4) 比較在不同水質的緩衝液狀態下，對 Western blotting 的呈色影響

1. 水質的好壞的確影響了 RNA 或 DNA 電泳實驗的結果。
 - 水質越接近超純水，電泳實驗呈現出的螢光訊號越強
 - 經超過濾膜 (UF) 處理過之超純水做出的電泳表現出的螢光訊號最強，背景值的雜訊也最低
2. 顯然的，一般 RO 純水或去離子水中仍有許多污染物質，造成背景的螢光雜訊，影響 RNA 或 DNA 電泳實驗的品質好壞。
3. 建議在做電泳實驗時，配製緩衝液的超純水需徹底排除有機物及核酸分解酶 (Nuclease) 的污染，可以採用超過濾膜 (UF) 做進一步處理。

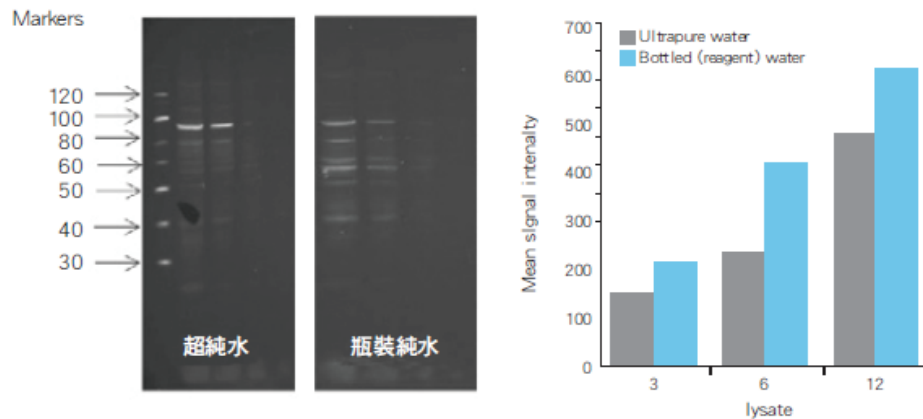


- 為顯現出蛋白質，Western blotting 最後會以呈色方式 (酵素呈色或螢光呈色方式) 來作表現



比較瓶裝試劑純水與 Milli-Q 超純水在 Western blotting 呈色反應上的影響 (Chemiluminescence)

超純水經過超過濾膜 (UF) 處理過後，能有效去除掉會干擾呈色酵素的污染物質，例如：HRP 的活性會被內毒素抑制，而細菌本身也會產生污染性的鹼性磷酸酶 (AP, Alkaline phosphatase)，如果在超純水系統中使用具有蛋白質攔截能力 (MWCO) 超過濾膜，來去除掉 endotoxin 或 AP 則是最好的選擇，使背景值的雜訊不致影響本身的訊號強度，由上圖可知，以 Milli-Q 超純水作出呈色反應，每條 Band 表現出的相對訊號都比較強。



比較瓶裝試劑純水與 Milli-Q 超純水在 Western blotting 呈色反應上的影響 (螢光呈色 Fluorescent detection)

- 超純水經過超過濾膜 (UF) 處理過後，已去除掉水中的小分子有機物，這些有機物會吸收 UV 光，造成實驗上背景雜訊。
- 由上圖可看出，使用處理過的超純水相對於一般瓶裝純水，每一條 Band 的螢光相對強對較高。

結論：

- 酵素呈色反應通常以 HRP (Horse radish peroxidase) 或鹼性磷酸酶 (AP, Alkaline phosphatase) 結合在抗體上，再外加呈色劑作為受質 (Substrate) 與酵素反應，所表現出的顏色變化來推斷待測物質的量。

- 螢光呈色則是以抗體上接著螢光物質，以螢光表現量來推定待測物質的多寡。
- 不論以何種呈色反應，所需要的水必須為 Type 1 的超純水，且此超純水必須去除 AP 或 HRP 酵素、有機物以及細菌的污染。



Merck Millipore BioPak[®] 超濾膜終端過濾器是您進行生物實驗前水質處理的最佳選擇²

在超純水取水點處提供再次純化，提供您所需高流速且不含熱源 (pyrogen) 及核酸 (nuclease) 分解酶的水質

BioPak 是一個可拋棄式的超過濾裝置，一般用於細胞培養、生化或分子生物學等應用領域。它可以裝於 Milli-Q, Direct-Q, Simplicity, Synergy 等 Type I 超純水系統的取水端，進而產生維持三個月不含熱源及核酸分解酶的超純水。

BioPak 超濾膜終端過濾器的過濾是利用中空纖維管柱來達成，可大幅度去除熱源、核酸分解酶及細菌，降低離子及有機物的釋出，並且仍然維持超純水產水的高流速。

BioPak 主要特性：

- 直接與 Type I Merck Millipore 超純水系統連接
- 可產生不含熱源 (<0.001 EU/mL) 的超純水
- 可產生不含 RNase (<0.01 ng/mL) 及 DNase (<4 pg/μL) 的超純水
- 降低使用 DEPC 的需求，增加實驗安全性
- 可產生不含細菌 (<1 cfu/mL) 的超純水
- 產生的水保證至少 90 天內都維持一定的品質規格
- 不需維修

1 資料來源: 超純水及其實驗室應用 · Merck Millipore · P. 56-62

2 資料來源: <http://www.millipore.com/catalogue/module/c8121#0>



默克密理博事業體
純水技術處

www.merck-millipore.com