

Мусо Real-Time

Набор реактивов для выявления контаминации микоплазмой культур клеток методом ПЦР-РВ

Номер по каталогу:
MR004 — на 50 реакций

Инструкция по применению

Оглавление

1. Назначение	4
2. Преимущества	4
3. Состав	4
4. Условия хранения и транспортировки	5
5. Количество реакций	5
6. Метод	5
7. Основные характеристики	6
8. Меры предосторожности	8
9. Необходимое оборудование и дополнительные материалы.....	9
10. Биологический материал.....	9
11. Протокол.....	9
12. Возможные проблемы и способы их решения	14
13. Приложение.....	15

1. Назначение

Набор реактивов для выявления ДНК микоплазм (класс *Mollicutes*, роды *Mycoplasma* и *Acholeplasma*) в культурах клеток и культуральных жидкостях методом ПЦР-РВ.

► Микроорганизмы класса *Mollicutes* являются частыми контаминантами культур эукариотических клеток. Небольшие размеры и устойчивость ко многим антибиотикам затрудняют своевременное выявление и устранение контаминации.

Заражение микоплазмой существенно изменяет биохимию клеток, их антигенные свойства и параметры роста культуры. Экспериментальная работа с контаминированными образцами может приводить к получению невоспроизводимых или ложных результатов, а также к их ошибочной интерпретации. В связи с этим все поступающие в коллекцию линии клеток должны контролироваться на контаминацию микоплазмой.

При культивировании клеток рекомендуется проверять их не реже одного раза в месяц, поскольку источником заражения может быть культуральная среда, ее компоненты или сам исследователь.

Материалом для анализа является ДНК, выделенная из культур клеток, культуральной жидкости или реагентов для работы с клеточными культурами.

Только для использования в научно-исследовательских целях.

2. Преимущества

Набор реактивов Myco Real-Time позволяет выявлять от нескольких копий генома микроорганизмов, наиболее часто контаминирующих культуры клеток в лабораторных условиях.

Набор выявляет наличие геномной ДНК бактерий родов *Mycoplasma* и *Acholeplasma* и не выявляет ДНК бактерий родов *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, насекомых и млекопитающих.

3. Состав

Компонент	Количество
5X PCRmix Myco RT	280 мкл
5X Oligo Myco RT	280 мкл
MycoDNA Control	70 мкл
Deionized water, nuclease-free	1.5 мл
PBS	1.5 мл

4. Условия хранения и транспортировки

Хранение и транспортировка: –20 °С.

Количество циклов замораживания/размораживания: не более 10.

Срок годности: 12 месяцев с даты поставки при соблюдении условий хранения и транспортировки.

5. Количество реакций

Набор рассчитан на 50 реакций, что позволяет проанализировать от 8 до 23 исследуемых образцов в двух технических повторностях. Количество образцов определяется форматом постановки и степенью загрузки амплификатора. Максимальное количество достигается при анализе 23 образцов одновременно.

6. Метод

Определение ДНК микоплазм проводится методом ПЦР-РВ с зондами типа TaqMan, а структура праймеров позволяет детектировать ДНК не менее 50 видов микроорганизмов класса *Mollicutes*, в том числе наиболее часто встречающихся в лабораторных условиях контаминантов клеточных культур (роды *Mycoplasma* и *Acholeplasma*).

Для определения присутствия ДНК микоплазмы проводят специфическую амплификацию фрагмента высококонсервативного участка генома, кодирующего 16S рРНК. Образование специфического продукта амплификации регистрируется в канале FAM (Green). Эффективность специфической амплификации может снижаться в присутствии ингибиторов ПЦР в составе образца.

Для выявления ингибиторов ПЦР одновременно в этой же пробирке происходит амплификация внутреннего контроля (ВК) с искусственной ДНК-матрицы, включенной в состав реакционной смеси. Реакция ВК регистрируется в канале HEX (Yellow, VIC).

7. Основные характеристики

Предел обнаружения

Предел обнаружения различается для разных видов класса Mollicutes. Установлен предел обнаружения следующих видов:

Вид	Копии генома в реакции*
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	2
<i>Mycoplasma arginini</i>	2
<i>Mycoplasma fermentans</i>	2
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	4
<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	4
<i>Mycoplasma orale</i>	4
<i>Mycoplasma pneumonia</i>	4

* Предел обнаружения определялся в копиях генома, поскольку это стабильная единица, в то время как КОЕ может содержать от 5 до 10 000 микоплазм (в зависимости от вида, стадии и условий культивации).

Специфичность

Список организмов, ДНК которых были проверены набором в процессе валидационных испытаний:

Микроорганизмы класса Mollicutes

Название организма	Источник ДНК	Результат
<i>Acholeplasma laidlawii</i>		выявлено
<i>Mycoplasma arginini</i>		выявлено
<i>Mycoplasma fermentans</i>		выявлено
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>		выявлено
<i>Mycoplasma genitalium</i>	Геномная ДНК, PCR Quantification Standards, Minerva Biolabs	выявлено
<i>Mycoplasma hominis</i>		выявлено
<i>Mycoplasma hyorhinis</i>		выявлено
<i>Mycoplasma orale</i>		выявлено
<i>Mycoplasma penetrans</i>		выявлено
<i>Mycoplasma pneumonia</i>		выявлено
<i>Mycoplasma salivarium</i>		выявлено

Другие бактерии, млекопитающие и насекомые (20 000 копий генома в реакции)

Вид	Источник ДНК	Результат
<i>Clostridium perfringens</i>	Штамм ATCC 13124	не выявлено
<i>Escherichia coli</i>	Штамм BL21 (DE3)	не выявлено
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Штамм ATCC 4356	не выявлено
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Штамм PA01	не выявлено
<i>Streptococcus salivarius</i>	Штамм ATCC 7073	не выявлено
<i>Canis l. Familiaris</i>	Культура клеток MDCK	не выявлено
<i>Chlorocebus sp.</i>	Культура клеток Vero	не выявлено
<i>Cricetulus griseus</i>	Культура клеток CHO	не выявлено
<i>Homo sapiens</i>	Культура клеток HEK293T	не выявлено
<i>Mus musculus</i>	Культура клеток SP2/O-AG14	не выявлено
<i>Bombyx mori</i>	Культура клеток BM-N	не выявлено
<i>Spodoptera frugiperda</i>	Культура клеток SF21	не выявлено

Устойчивость к интерферентам

Остатки среды для культивирования клеток или вещества, используемые в наборах для выделения, могут ингибировать ПЦР. Одни из наиболее частых ингибиторов ПЦР для образцов, анализируемых данным набором: этанол, гуанидин и компоненты ростовой среды.

Параметр	Этанол	Гуанидин тиоционат	DMEM с 10% FBS
Концентрация ингибитора, привнесенная образцами, которая может ожидать в ПЦР	<1 %	До 10 мМ	До 2 мкл на реакцию
Устойчивость набора при возможной концентрации ингибитора в образце	Да	Да	Да
Максимальная концентрация ингибитора, к которой набор сохраняет устойчивость	3 %	30 мМ	6 мкл на реакцию

8. Меры предосторожности

Все компоненты набора не токсичны для человека в используемых концентрациях.

Некоторые виды микоплазм рассматриваются как представители нормальной микрофлоры, обитающей на слизистых оболочках или кожных покровах человека. Поскольку набор реактивов обладает высокой чувствительностью к ДНК микоплазм, причиной ложноположительного результата анализа может оказаться попадание в реакционную смесь ДНК микоплазмы как от самого исследователя, так и из продукта амплификации, полученного ранее набором для выявления контаминации микоплазмой.

При работе с набором следует соблюдать меры предосторожности: использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, все компоненты набора открывать только в стерильном ПЦР-боксе. После окончания амплификации пробирки не открывать и немедленно утилизировать.

Все этапы работы необходимо проводить в отдельных помещениях или в изолированных зонах, снабженных комплектами пипеток, халатами, всеми необходимыми расходными материалами и оборудованием:

- зона 1 для подготовки образцов (для выделения ДНК и подготовки образцов для ПЦР);
- зона 2 для приготовления ПЦР-реакции:
 - 2а — для подготовки реакционной смеси;
 - 2б — для внесения ДНК в реакционную смесь;
- ▶ Зоны 2а и 2б могут быть совмещены в одном помещении при наличии в нем отдельных рабочих мест с отдельными комплектами пипеток.
- зона 3 для размещения амплификаторов.

При работе всегда выполняйте следующие требования:

- для каждой процедуры используйте новый наконечник с фильтром;
- приготовление реакционной смеси и выделение ДНК проводите в ПЦР-боксах;
- не перемещайте автоматические дозаторы, штативы, лабораторную посуду, халаты и растворы реактивов из одной зоны в другую;
- поверхности рабочих столов обрабатывайте бактерицидными облучателями до и после проведения работ в течение не менее 30 минут.

9. Необходимое оборудование и дополнительные материалы

- Ламинарный бокс 2-го класса защиты.
- ПЦР-бокс с УФ-лампой.
- Центрифуга с ротором для стрипов/планшетов.
- Вортекс.
- Мини-центрифуга.
- Автоматические дозаторы на 10, 20, 200 и 1 000 мкл.
- Микроцентрифужные пробирки.
- Наконечники для дозаторов с фильтрами.
- Стрипы или планшет для амплификации.
- Перчатки для рук неопудренные.
- Амплификатор для проведения ПЦР-РВ с каналами FAM (Green) и HEX (Yellow, VIC). Набор адаптирован для приборов: CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Допустимо использование амплификаторов: DPrime (ДНК-Технология), RotorGene Q (Qiagen), Applied Biosystems® 7500 (далее по тексту — ABI® 7500) и StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific).
- Набор для выделения геномной ДНК ExtractDNA Blood & Cells (кат. ## BC111T/M, Евроген) или аналог.

10. Биологический материал

ДНК, выделенная из культур клеток, культуральной жидкости или реагентов для работы с клеточными культурами.

Примечание: допускается выделение ДНК из замороженного материала.

11. Протокол

Время выполнения ПЦР — 2.5 часа.

Перед проведением ПЦР ознакомьтесь с рекомендациями по подготовке биоматериала и выделению ДНК, описанными в Приложении на стр. 15.

11.1. Рекомендации по планированию эксперимента

1.1. Реакции с исследуемыми образцами необходимо ставить одновременно с двумя контролями:

- отрицательный контроль без матрицы (НТС) — контроль чистоты реактивов от примесей экзогенной ДНК. В качестве НТС используется «Deionized water, nuclease-free», входящая в состав набора;
- положительный контроль (ПКО) — образец «MycosDNA Control», содержащий фрагмент ДНК *M. arginini* (входит в состав набора).

1.2. Для получения достоверных результатов все реакции рекомендуется выполнять в двух технических повторах.

11.2. Подготовка реакционной смеси

2.1. Рассчитайте необходимый объем компонентов реакционной смеси, исходя из числа образцов (контрольные образцы НТС и ПКО учтены в формуле):

Компонент	Количество на N образцов, мкл*
5X PCRmix Myco RT	5.5 x (2N + 4)
5X Oligo Myco RT	5.5 x (2N + 4)
Deionized water, nuclease-free	14.3 x (2N + 4)

* N – количество исследуемых образцов.

Количество указано с учетом запаса для компенсации возможной погрешности дозаторов.

2.2. Разморозьте компоненты набора при комнатной температуре.

2.3. Тщательно перемешайте содержимое пробирок, используя вортекс, не допуская образования пены; сбросьте капли в мини-центрифуге в течение 5 сек.

2.4. Приготовьте реакционную смесь и тщательно перемешайте ее на вортексе, сбросьте капли в мини-центрифуге.

2.5. Подготовьте и промаркируйте пробирки для ПЦР.

- ▶ Не используйте маркер, который флуоресцирует при возбуждении светом. Наносите маркировку на участки пластика, не задействованные в детекции флуоресценции.

2.6. Внесите в каждую пробирку для ПЦР по 23 мкл реакционной смеси.

2.7. Добавьте в пробирки для ПЦР:

- по 2 мкл «Deionized water, nuclease-free» в пробирки для NTC;
- по 2 мкл исследуемых образцов в соответствующие пробирки;
- по 2 мкл «MycDNA Control» в пробирки для ПКО.

► После внесения каждого образца аккуратно перемешайте смесь пипетированием и закройте крышки пробирок, чтобы предотвратить контаминацию. Меняйте наконечники между образцами.

2.8. Сбросьте капли со стенок пробирок центрифугированием в течение 15 сек.

2.9. Установите пробирки в блок амплификатора. В управляющей программе амплификатора выберите параметры:

- снятие кривой плавления не требуется;
- считывание флуоресценции в каналах FAM и HEX (Green и Yellow для прибора Rotor-Gene Q) или FAM и VIC (для ABI 7500 и StepOnePlus);
- пассивный референсный краситель не считывается;
- объем реакционной смеси — 25 мкл;
- программа амплификации:

Этап	Температура	Продолжительность	Считывание флуоресценции
Инкубация (Hold)	95 °C	3 мин	—
45 циклов (Cycling)	95 °C	10 с	—
	60 °C	1 мин	FAM, HEX

- для контрольных образцов установите тип образца:
 - «Positive Control» для образцов с ПКО,
 - «NTC» для образцов с «Deionized water, nuclease-free»;
- для исследуемых образцов установите тип образца «Unknown».

2.10. Запустите ПЦР.

11.3. Анализ результатов

ВНИМАНИЕ! Специфическая реакция на ДНК *Mollicutes* регистрируется в канале FAM (Green), амплификация ВК для выявления ингибирования ПЦР — в канале HEX (Yellow, VIC).

3.1. В программном обеспечении используемого амплификатора открыть ПЦР-файл с результатами и ввести настройки для всех каналов детекции:

- изменить значения «Baseline Cycles» так, чтобы часть графика флуоресценции до начала экспоненциального роста сигнала стала параллельна оси абсцисс и близка к нулю по оси ординат;
- установить «Threshold» на уровне начала экспоненциального роста сигнала (накопления ПЦР-продукта).

Показателем накопления продукта реакции является пороговый цикл (C_q (C_t)). ПО прибора автоматически определит C_q для каждого образца.

3.2. Анализ НТС и ПКО:

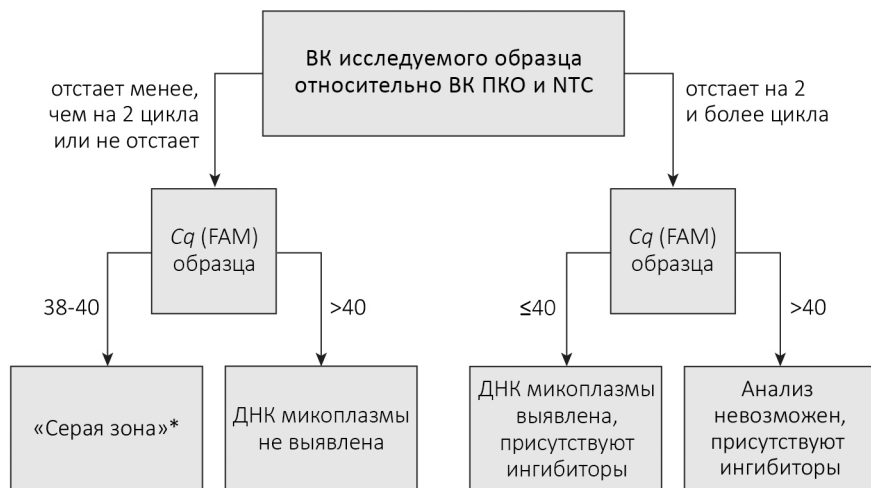
Образец	Ожидаемый результат в канале FAM	Ожидаемый результат в канале HEX
НТС	$C_q \geq 40$ или не определяется	$C_q < 20$
ПКО	$C_q < 25$	$C_q < 20$

При несоответствии хотя бы одного из результатов критериям необходима повторная постановка (см. п. 12 «Возможные проблемы и способы их решения»).

3.3. Анализ исследуемых образцов на наличие ДНК *Mollicutes*:

Результат в канале FAM	Заключение
$C_q < 38$	ДНК <i>Mollicutes</i> выявлена
$38 \leq C_q \leq 40$	Результат не может быть интерпретирован однозначно. Необходимо оценить наличие ингибиторов в образце и повторить постановку (см. п. 3.4)
$C_q > 40$ или не определяется	ДНК <i>Mollicutes</i> не выявлена. Оцените наличие ингибиторов в образце (см. п. 3.4)

3.4. Анализ исследуемых образцов на наличие ингибиторов (для образцов, не прошедших анализ в п. 3.3):



См. п. 12 «Возможные проблемы и способы их решения»

* Если реакция ВК исследуемого образца не отстает от ВК контрольных образцов, при этом C_q в канале FAM лежит в области 38–40, ДНК *Mollicutes* выявлена со сниженной достоверностью (менее 95 %). Необходимо повторить постановку, увеличив количество образца в реакции.

12. Возможные проблемы и способы их решения

Образец	Значение C_q (C_t)	Возможная причина	Варианты решения
NTC	C_q (FAM) < 40	Контаминация реакции амплификации целевым ПЦР-продуктом или геномной ДНК <i>Mollicutes</i>	Провести деконтаминацию рабочего пространства, после чего аккуратно переставить ПЦР. В случае повторного возникновения проблемы – заменить набор реактивов.
NTC, ПКО	C_q (HEX) > 20	Ошибка при постановке эксперимента или потеря качества одного из компонентов набора	Аккуратно переставить ПЦР, тщательно перемешав компоненты набора и реакционной смеси. В случае повторного возникновения проблемы — заменить набор реактивов.
ПКО	C_q (FAM) > 25	Неэффективная амплификация: ошибка при постановке эксперимента или потеря качества одного из компонентов набора	Аккуратно переставить ПЦР, тщательно перемешав компоненты набора и реакционной смеси. В случае повторного возникновения проблемы — заменить набор реактивов.
Исследуемый образец	C_q (FAM) > 40, при этом C_q (HEX) образца > C_q (HEX) NTC на 2 цикла и более	В образце присутствуют ингибиторы ПЦР	Если по каналу HEX C_q (образца) – C_q (ПКО) = 2, образец можно разбавить в два раза водой для ПЦР и повторить постановку. Если по каналу HEX C_q (образца) – C_q (ПКО) > 2, образец необходимо переочистить или выделить ДНК повторно.

13. Приложение

13.1. Подготовка биоматериала

1.1. Для эффективного выделения ДНК рекомендуется культивировать клетки в течение 2–3 дней в рекомендованной ростовой среде. Анализируемые клетки должны достичь высокой плотности ко дню проведения анализа (культивируйте монослойные культуры до достижения 80–90 % монослоя, суспензионные клетки — до достижения концентрации около 1 млн/мл).

1.2. Отберите 1 мл культуральной среды в микроцентрифужные пробирки, осадите клетки и клеточный дебрис центрифугированием в течение 5 минут при 1 000–1 300 g.

1.3. Перенесите супернатант в новые пробирки и центрифугируйте при максимальном ускорении (от 11 000 g) в течение 10 минут.

1.4. Аккуратно удалите супернатант, не задевая осадок (осадок может быть невидим, в этом случае можно оставить на дне 5–10 мкл жидкости).

1.5. Добавьте 50 мкл раствора «PBS» к осадку и тщательно ресуспендируйте осадок пипетированием.

1.6. Прогрейте образцы при +95 °С в течение 10 минут.

Подготовленные для анализа образцы культуральной жидкости могут храниться при –20 °С для дальнейшего использования. Перед каждым использованием рекомендуется прогревать образцы при +95 °С в течение 10 минут.

13.2. Выделение ДНК

Для выделения геномной ДНК рекомендуется использовать набор ExtractDNA Blood & Cells (кат. ## BC111T/М, Евроген). Допустимо использовать другие наборы и методики выделения ДНК.

Наборы и сервисы Евроген

Н – наборы

С – сервисы

Выделение и очистка нуклеиновых кислот **Н**

Реактивы для ПЦР и ПЦР-РВ **Н**

Синтез и амплификация кДНК **Н С**

Клонирование ДНК **Н С**

Выявление контаминации микоплазмой **Н**

Оценка ДНК **Н**

Нормализация кДНК **Н С**

Практикум по генной инженерии **Н**

Генотипирование **Н**

Синтез олигонуклеотидов и зондов **С**

Секвенирование по Сэнгеру **С**

Синтез генов **С**

Сайт-направленный мутагенез **С**

Синтез органических соединений **С**

Консультация по продуктам: support@evrogen.ru

**Подробную информацию о наших продуктах и сервисах
можно получить на сайте www.evrogen.ru**

ЗАО Евроген
Москва 117997
ул. Миклухо-Маклая 16/10, к. 15
Тел.: +7 (495) 784-7084
order@evrogen.ru
www.evrogen.ru

CleanRNA Standard

Набор для очистки и концентрирования препаратов суммарной РНК

Номер по каталогу:

BC033S — на 25 реакций

BC033M — на 100 реакций

Инструкция по применению

Оглавление

1. Назначение	3
2. Состав	3
3. Условия хранения и транспортировки	3
4. Метод	3
5. Основные характеристики	4
6. Меры предосторожности	4
7. Необходимое оборудование и дополнительные материалы	4
8. Биологический материал	4
9. Протокол	5

1. Назначение

Набор CleanRNA Standard предназначен для очистки препаратов суммарной РНК, полученных после выделения реагентом ExtractRNA (кат. # BC032, Евроген) или его аналогами (TRIzol, TRI Reagent), из реакционных смесей, а также для концентрирования РНК.

Набор CleanRNA Standard позволяет очистить образец от низкомолекулярной фракции РНК (размером менее 250 нуклеотидов), в том числе от транспортной РНК. Очищенная РНК может содержать примеси геномной ДНК, если предварительно не проводилась обработка ДНКазой.

Очищенная РНК подходит для синтеза кДНК и анализа экспрессии генов методом ОТ-ПЦР, пробоподготовки для NGS, Нозерн-блота, трансляции *in vitro* и других молекулярно-биологических приложений.

Только для использования в научно-исследовательских целях.

2. Состав

Компоненты набора	BC033S 25 реакций	BC033M 100 реакций
Спин-колонки SC с крышками	25 шт.	100 шт. (4 x 25 шт.)
Собираательные пробирки	100 шт. (2 x 50 шт.)	400 шт. (8 x 50 шт.)
Пробирки микроцентрифужные на 1.5 мл	25 шт.	100 шт. (4 x 25 шт.)
Связывающий раствор для РНК	13 мл	40 мл
Промывочный раствор для РНК (концентрат)	10 мл	40 мл (2 x 20 мл)
Деионизированная вода без РНКаз	4.5 мл (3 x 1.5 мл)	15 мл (10 x 1.5 мл)

3. Условия хранения и транспортировки

Хранение и транспортировка: при комнатной температуре.

Срок годности: 12 месяцев с даты поставки при соблюдении условий хранения и транспортировки.

4. Метод

Связывание РНК на мембране колонки происходит в присутствии высококонцентрированных хаотропных веществ в условиях оптимально выбранного pH. Последующее использование промывочного буфера позволяет избавиться от нуклеотидов, коротких вариантов РНК, солей, белков, ингибиторов ферментативных реакций и примесей органических соединений. Элюция РНК происходит водой.

5. Основные характеристики

Характеристика	Значение
Емкость	До 100 мкг РНК
Размер РНК	Более 250 нуклеотидов
Выход РНК	До 90%
Объем элюции	15–50 мкл
Чистота*	$A260/A280 \geq 2.0$, $A260/A230 \geq 2.0$

* Для сильно загрязненных образцов соотношение $A260/A230$ может не достичь значения 2, соотношение $A260/A230$ зависит от природы загрязнений и источника РНК.

6. Меры предосторожности

«Связывающий раствор для РНК» содержит вещества, требующие обеспечения специальных мер безопасности:

- хранить в плотно закрытой таре;
- не допускать проглатывания, попадания на слизистые и кожу;
- при попадании компонентов набора на кожу или слизистые оболочки места контакта следует промыть большим количеством воды;
- при работе необходимо использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами.

7. Необходимое оборудование и дополнительные материалы

- Настольная центрифуга для пробирок с ускорением до 8 000 g.
- Вортекс.
- Автоматические дозаторы на 20, 200 и 1 000 мкл.
- Микроцентрифужные пробирки объемом 1.5 мл.
- Наконечники для дозаторов с фильтрами.
- Этанол 96%.

8. Биологический материал

- Суммарная РНК, полученная после выделения реагентом ExtractRNA (кат. # BC032, Евроген) или его аналогами (TRIzol, TRI Reagent).
- РНК в воде, буферном растворе или ферментативной реакционной смеси.
- Количество биоматериала: от 100 нг до 100 мкг суммарной РНК.

9. Протокол

Общее время работы: от 10 минут.

9.1. Подготовка растворов

1.1. Добавьте этиловый спирт (96%) во флакон с «Промывочным раствором для РНК (концентрат)» в количестве:

BC033S — 40 мл,

BC033M — 80 мл в каждый флакон.

Тщательно перемешайте раствор переворачиванием, нанесите пометку о выполнении операции на крышку флакона.

- ▶ При редком использовании набора не рекомендуется добавлять этанол в весь объем концентрата «Промывочного раствора для РНК». Непосредственно перед использованием отберите аликвоту концентрата в чистый флакон (200 мкл на 1 образец) и добавьте в него этанол (800 мкл на 1 образец). Тщательно перемешайте раствор переворачиванием.
- ▶ Внимательно следите за количеством израсходованного концентрата «Промывочного раствора для РНК», например, делайте отметки на флаконе и в конце инструкции на странице «Для заметок». Если вам понадобится добавить этанол ко всему оставшемуся объему концентрата «Промывочного раствора для РНК», то необходимое количество этанола следует рассчитать по формуле:

$$VE = (VW_{\text{исх}} - VW_{\text{расх}}) \times \frac{VE_{\text{исх}}}{VW_{\text{исх}}} \text{ (мл)},$$

где VE — объем этанола, который нужно добавить, $VW_{\text{исх}}$ — объем концентрата «Промывочного раствора для РНК», указанный на этикетке, $VW_{\text{расх}}$ — израсходованное количество концентрата «Промывочного раствора для РНК», $VE_{\text{исх}}$ — объем этанола по инструкции, см. п.1.1.

1.2. Если в «Связывающем растворе для РНК» образовался осадок, прогрейте его при температуре от +37 до +50 °С до полного растворения осадка.

9.2. Подготовка биоматериала

Если очищенную РНК планируется анализировать методом ОТ-ПЦР, следует учитывать, что в образце РНК всегда есть примеси геномной ДНК. Для удаления примеси ДНК необходимо провести обработку образца ДНКазой без РНКазной активности до очистки образца с помощью набора CleanRNA Standard.

ВНИМАНИЕ! Не используйте набор CleanRNA Standard для очистки РНК, обработанной ДНКазой E (кат. ## EK007S/M, Евrogen).

9.3. Очистка РНК

ВНИМАНИЕ! Проводить работу на отдельном чистом рабочем месте. Во время работы использовать пластик, свободный от РНКаз. Очистку РНК следует разнести в пространстве с любыми процедурами, где применяются РНКазы (например, выделение плазмидной ДНК).

Не использовать раствор DEPC (диэтилпирокарбонат) для обработки воды, посуды или пластика. Следы DEPC могут ингибировать ферментативные реакции с РНК.

Все центрифугирования проводятся при 8 000 g (10 000 об/мин для настольной центрифуги Eppendorf Minispin) при комнатной температуре.

3.1. Доведите объем образца РНК до 100 мкл «Деионизированной водой без РНКаз».

3.2. Добавьте 350 мкл «Связывающего раствора для РНК», закройте пробирку и тщательно перемешайте смесь на вортексе.

3.3. Добавьте 250 мкл 96% этанола, закройте пробирку и перемешайте смесь переворачиванием пробирки.

3.4. Перенесите реакционную смесь с РНК в колонку и центрифугируйте в течение 30 секунд.

3.5. Собирательную пробирку с фильтратом утилизируйте. Переместите колонку в новую собирательную пробирку.

3.6. Добавьте 500 мкл «Промывочного раствора для РНК» и центрифугируйте в течение 30 секунд.

3.7. Повторите п.п. 3.5–3.6.

3.8. Собирательную пробирку с фильтратом утилизируйте. Переместите колонку в новую собирательную пробирку.

3.9. Центрифугируйте колонку в новой собирательной пробирке в течение 5 минут для полного удаления промывочного раствора и осушения фильтра колонки.

3.10. Собирательную пробирку с фильтратом утилизируйте. Переместите колонку в новую микроцентрифужную пробирку объемом 1.5 мл.

3.11. Нанесите в центр мембраны 30 мкл «Деионизированной воды без РНКаз».

▶ Для повышения выхода РНК можно увеличить объем элюции до 50 мкл.

▶ Для получения высокоцентрированного образца РНК следует наоборот уменьшить объем элюции до 15 мкл. Уменьшение объема элюции до 15 мкл приводит к снижению выхода РНК до 30%.

3.12. Центрифугируйте в течение 30 секунд. Элюат содержит очищенную РНК.

ВНИМАНИЕ! Все последующие манипуляции с РНК следует проводить на льду.

Избегайте избыточных циклов замораживания-размораживания. Перед длительным хранением РНК рекомендуется распределить на аликвоты и заморозить. Очищенная РНК хранится при температуре -20°C в течение 1 года.

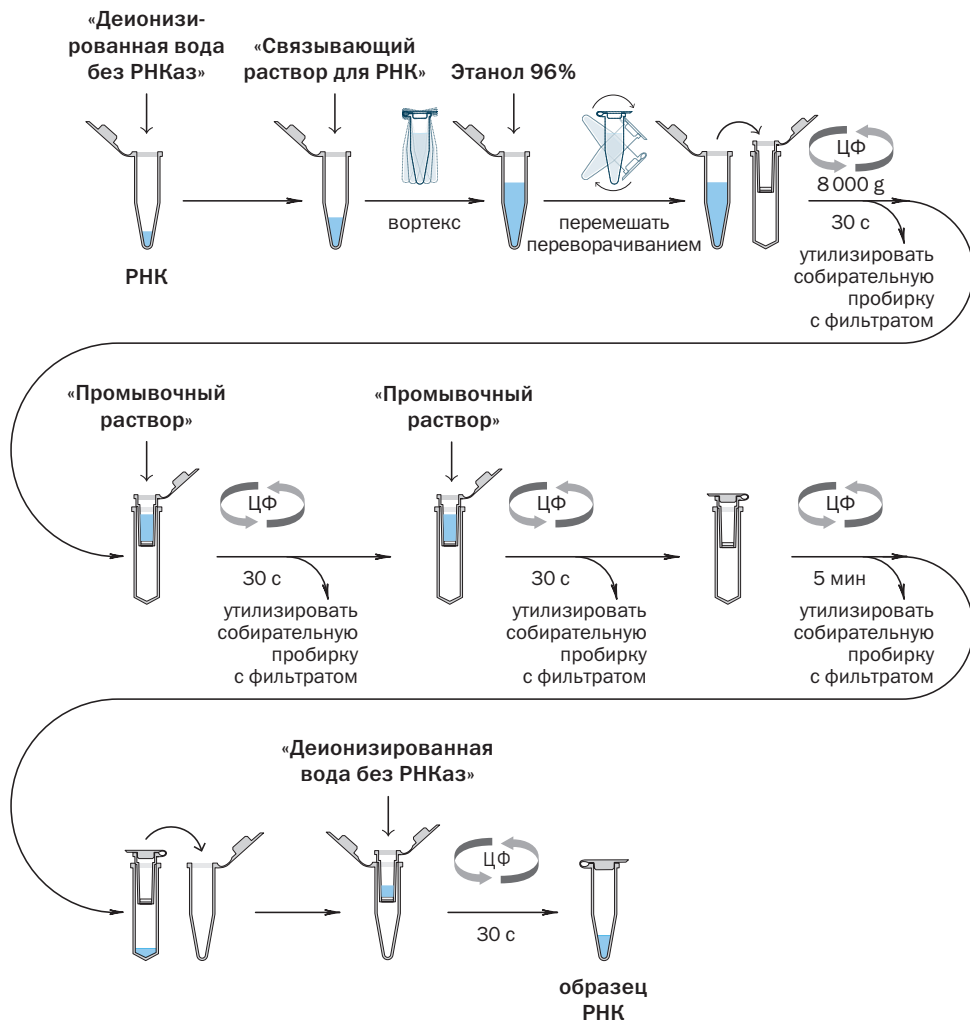


Рисунок 1 – схема очистки РНК.

Наборы и сервисы Евроген

Н >>> – ссылка на страницу НАБОРА

Выделение и очистка нуклеиновых кислот **Н** >>>

С >>> – ссылка на страницу СЕРВИСА

Реактивы для ПЦР и ПЦР-РВ **Н** >>>

Синтез и амплификация кДНК **Н** >>> **С** >>>

Клонирование ДНК **Н** >>> **С** >>>

Выявление контаминации микоплазмой **Н** >>>

Оценка ДНК **Н** >>>

Нормализация кДНК **Н** >>> **С** >>>

Практикум по геной инженерии **Н** >>>

Генотипирование **Н** >>>

Синтез олигонуклеотидов и зондов **С** >>>

Секвенирование по Сэнгеру **С** >>>

Синтез генов **С** >>>

Сайт-направленный мутагенез **С** >>>

Консультация по продуктам: support@evrogen.ru

Подробную информацию о наших наборах и сервисах можно получить на сайте www.evrogen.ru

ЗАО Евроген
Москва 117997
ул. Миклухо-Маклая 16/10, к. 15
Тел.: +7 (495) 784-7084
order@evrogen.ru
www.evrogen.ru