

ExtractRNA Plant

Набор для выделения суммарной РНК из грибов и растений

Номера по каталогу:

BC030S — на 50 реакций

BC030L — на 250 реакций

Инструкция по применению

Оглавление

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

1. Назначение

Набор «ExtractRNA Plant» предназначен для выделения суммарной РНК из свежих растений (листья, цветки, семена, корни) и грибов. Очищенные препараты РНК могут использоваться 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. Преимущества

- Выделение РНК из широкого спектра растительного биоматериала.
- Стабильный выход высококачественной РНК.
- Эффективное удаление ингибиторов ОТ и ПЦР.
- Удаление примеси геномной ДНК с помощью ДНКазы без РНКазной активности.
- Удобная процедура выделения не требует органической экстракции фенолом и хлороформом.
- Легкая гомогенизация образцов благодаря использованию абразива.

3. Метод

Для выделения РНК из тканей растений и грибов требуется предварительная механическая гомогенизация биоматериала в лизирующем буфере или жидком азоте. На первом этапе выделения РНК при добавлении к биоматериалу смеси «Лизирующего раствора» с β -меркаптоэтанолом или DTT получается гомогенный лизат. При этом целостность РНК сохраняется за счет ингибирования активности РНКаз. От скорости разрушения клеток и перемешивания с лизирующей смесью зависит качество выделенного препарата РНК. К полученному лизату добавляют «Связывающий раствор 1» с высоким содержанием соли и веществ, способствующих удалению вторичных метаболитов из лизата. В этих условиях большая часть белков и геномной ДНК выпадает в осадок, который уплотняется центрифугированием. Осветленный лизат отбрасывают и смешивают с изопропанолом. Последующее центрифугирование приводит к осаждению РНК и остаточной ДНК в виде белого осадка. На втором этапе происходит очистка РНК от остатков ДНК. Для этого осадок растворяют в буфере, содержащем ДНКазу E, и инкубируют при 37 °C в течение 10 минут. На третьем этапе РНК очищается и концентрируется на колонке. После чего смывается с мембраны колонки водой, свободной от РНКаз.

4. Состав

Компоненты набора	BC030S (50 реакций)	BC030L (250 реакций)
Упаковка №1 из 2		
Лизирующий раствор	25 мл	125 мл
Связывающий раствор 1	25 мл	125 мл
Связывающий раствор 2	25 мл	125 мл
Промывочный раствор 1 (концентрат)	10 мл	50 мл
Промывочный раствор 2 (концентрат)	15 мл	80 мл (2 x 40 мл)
Деионизированная вода без РНКаз	7.5 мл (5 x 1.5 мл)	36 мл (3 x 12 мл)
Абразив	20 г	90 г
Спин-колонки SCB с крышками в комплекте с собирательными пробирками	50 шт.	250 шт. (5 x 50 шт.)
Собирательные пробирки	50 шт.	250 шт. (5 x 50 шт.)
Пробирки на 1.5 мл без РНКаз	50 шт.	250 шт. (5 x 50 шт.)
Упаковка №2 из 2		
ДНКазы Е (лиофилизированная)	150 е.а.	750 е.а. (5 x 150 е.а.)
Буфер для хранения ДНКазы Е	150 мкл	750 мкл (5 x 150 мкл)
10X Реакционный буфер для ДНКазы Е	250 мкл	1250 мкл (5 x 250 мкл)

5. Условия хранения и транспортировки

Транспортировка: при комнатной температуре.

Хранение: Модуль для обработки ДНКазой (упаковка №2 из 2) хранить при температуре –20 °С.

После растворения «ДНКазы Е» хранить при температуре –20 °С.

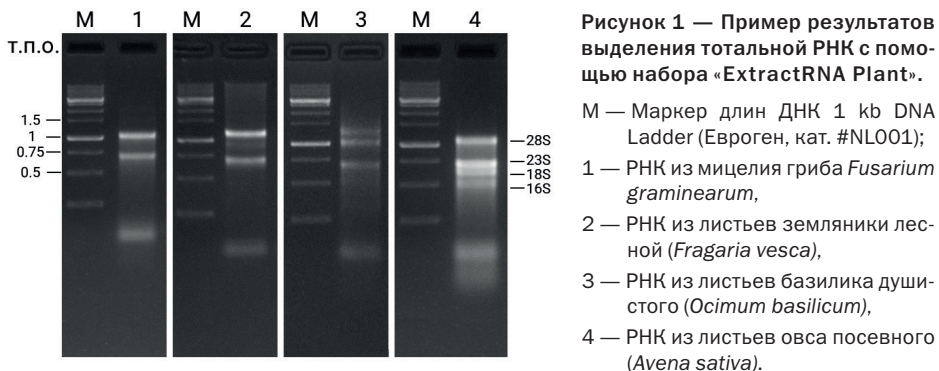
Все остальные компоненты набора хранить при комнатной температуре в сухом, защищенном от света месте.

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

6. Основные характеристики

Характеристика	Значение
Выход РНК*	
из корней, цветков или листьев растений	До 20 мкг
из семян растений	До 5 мкг
из мицелия грибов	До 5 мкг
Объем выделенного образца (элюат)	50–200 мкл
Емкость колонок	До 20 мкг
Размер фрагментов выделяемой РНК (подвижность относительно маркера длин в агарозном геле, см. Рисунок 1)	~1200 п.н. (25–28S рРНК) ~600 п.н. (18S рРНК) ~100 п.н. (5–5.8S рРНК) Также возможно наличие РНК пластид: 23S и 16S рРНК с несколько меньшим размером, чем 25S и 18S рРНК
Чистота препарата	A260/280 ≥ 1.7 A260/230 ≥ 1.7
Ингибиторы ОТ и ПЦР	Не выявляются

* Выход зависит от вида растения, стадии развития и эффективности гомогенизации.



7. Меры предосторожности

Все компоненты набора в используемых концентрациях и при соблюдении вышеуказанных рекомендаций не представляют опасности для здоровья человека. «Лизирующий раствор», «Связывающий раствор 1», «Связывающий раствор 2» и «Промывочный раствор 1» при попадании в глаза и на кожные покровы могут вызвать раздражение. При попадании реагентов на кожу или слизистые оболочки место контакта следует промыть большим количеством воды.

β -меркаптоэтанол (не входит в состав набора) при попадании на кожу может повлечь аллергическую реакцию. Имеет резкий запах, не подносить к лицу, не вдыхать пары. При разливе промыть поверхность водой и проветрить помещение.

Все компоненты набора в используемых концентрациях и при соблюдении вышеуказанных рекомендаций не представляют опасности для здоровья человека.

8. Необходимое оборудование и дополнительные материалы

- Твердотельный термостат или водяная баня.
- Настольная центрифуга для пробирок с ускорением до 11 000 g.
- Вортекс.
- Мини-центрифуга.
- Автоматические дозаторы на 20, 200 и 1 000 мкл.
- Микроцентрифужные пробирки объемом 1.5 мл.
- Наконечники для дозаторов с фильтрами.
- Изопропанол.
- Этанол 96%.
- β -меркаптоэтанол или DTT.

9. Биологический материал

Вид материала	Количество
Свежие растения (листья, корни и цветки) и грибы	50–100 мг
Семена растений	20–50 мг

Наилучшие результаты достигаются при выделении из живых или свежих объектов. Также можно использовать свежезамороженный в жидком азоте или сохраненный с использованием консерванта биоматериал (например, IntactRNA, кат. #BC031, Евроген).

10. Протокол

Общее время работы: от 1.5 часов с обработкой ДНКазой и от 1 часа без обработки ДНКазой.

10.1. Подготовка растворов

1.1. Добавьте этанол (96%) во флакон с концентрированным «Промывочным раствором 1» в количестве:

BC030S — 30 мл,

BC030L — 150 мл.

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 1». Непосредственно перед использованием отберите аликвоту концентрата в чистый флакон (175 мкл на 1 образец) и добавьте в него этанол (525 мкл на 1 образец). Тщательно перемешайте раствор переворачиванием.
- ▶ Внимательно следите за количеством израсходованного концентрата «Промывочного раствора 1», 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 1», 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 1», указанный на этикетке, $VW_{\text{расх}}$ — израсходованное количество концентрата «Промывочного раствора 1», $VE_{\text{исх}}$ — объем этанола по инструкции, см. «Подготовка растворов», 1.1.

1.2. Добавьте этанол (96%) во флакон с концентрированным «Промывочным раствором 2» в количестве:

BC030S — 60 мл,

BC030L — по 160 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 2». Непосредственно перед использованием отберите аликвоту концентрата в чистый флакон (280 мкл на 1 образец) и добавьте в него этанол (1.12 мл на 1 образец). Тщательно перемешайте раствор переворачиванием.
- ▶ Внимательно следите за количеством израсходованного концентрата «Промывочного раствора 2», 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 2», 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 2», указанный на этикетке, $VW_{\text{расх}}$ — израсходованное количество концентрата «Промывочного раствора 2», $VE_{\text{исх}}$ — объем этанола по инструкции, см. «Подготовка растворов», 1.2.

1.3. Растворите «ДНКазу Е»:

- добавьте 150 мкл «Буфера для хранения ДНКазы Е» в пробирку с лиофилизированной «ДНКазой Е»;
- аккуратно перемешайте пипетированием, инкубируйте 5 мин при комнатной температуре, сбросьте капли центрифугированием;

► Для более эффективного удаления ДНК рекомендуется растворить ДНКазу за сутки перед использованием.

- напишите на этикетке дату растворения ДНКазы. Растворенную ДНКазу необходимо хранить при температуре -20°C .

1.4. Если во флаконах с «Лизирующим раствором» или «Связывающим раствором 1» и «Связывающим раствором 2» образовался осадок, то перед началом работ прогрейте растворы при температуре от $+37$ до $+50^{\circ}\text{C}$ до полного растворения осадка.

10.2. Выделение РНК

ВНИМАНИЕ! Все дальнейшие центрифугирования проводятся при 11 000 g (13 000 об/мин для настольной центрифуги Eppendorf Minispin) при комнатной температуре.

ВНИМАНИЕ! Прямо перед работой в необходимое количество «Лизирующего раствора» добавьте β -меркаптоэтанол или 2М DTT в объеме 50–100 мкл на 1 образец. Большое количество восстанавливающих дисульфидные связи агентов повышает выход РНК, особенно для богатых вторичными метаболитами растений на поздних стадиях вегетации.

10.2.1. Гомогенизация образцов

2.1.1. Подготовьте и промаркируйте пробирки объемом 1.5 мл для каждого образца.

2.1.2. Выполните гомогенизацию одним из способов:

Гомогенизация в фарфоровой ступке с абразивом.

В ступку добавьте «Абразив» в количестве 100–200 мкл*, поместите образец ткани и добавьте 500 мкл смеси лизирующего раствора с β -меркаптоэтанолом или DTT и 100 мкл воды. Тщательно разотрите образец, перелейте суспензию в подготовленную пробирку объемом 1.5 мл.

* Для измерения количества абразива используйте градуированную пробирку.

Гомогенизация с использованием пестика-гомогенизатора.

Поместите образец в пробирку объемом 1.5 мл, добавьте «Абразив» в количестве 50–100 мкл*, добавьте 500 мкл смеси лизирующего раствора с β -меркаптоэтанолом или DTT. Тщательно разотрите образец пестиком-гомогенизатором (например, кат. ## RM001T/S, Евроген).

* Для измерения количества абразива используйте градуированную пробирку.

Гомогенизация в жидком азоте.

В ступку поместите образец ткани и налейте жидкий азот. Тщательно разотрите образец до порошкообразного состояния. Пересыпьте порошок в подготовленную пробирку объемом 1.5 мл, добавьте 500 мкл смеси лизирующего раствора с β -меркаптоэтанолом или DTT.

► *Предварительно можно измельчить материал ножницами.*

10.2.2. Выделение РНК без обработки ДНКазой

ВНИМАНИЕ! При выделении РНК без обработки ДНКазой в препарате РНК будет присутствовать ДНК.

2.2.1. Инкубируйте образцы в течение 10 минут при комнатной температуре, тщательно перемешайте на вортексе.

2.2.2. Добавьте по 500 мкл «Связывающего раствора 1» в каждую пробирку. Тщательно перемешайте на вортексе и инкубируйте при комнатной температуре в течение 2 минут.

2.2.3. Центрифугируйте пробирки в течение 10 минут.

2.2.4. Подготовьте и промаркируйте новые пробирки объемом 1.5 мл для каждого образца.

2.2.5. Перенесите 500 мкл образца в новые пробирки, добавьте 250 мкл изопропанола, тщательно перемешайте на вортексе.

2.2.6. Подготовьте и промаркируйте необходимое количество микроцентрифужных колонок с собирательными пробирками.

2.2.7. Перенесите весь объем образца в колонки.

2.2.8. Центрифугируйте в течение 1 минуты. Слейте супернатант из собирательной пробирки. Верните колонку в ту же собирательную пробирку.

2.2.9. Добавьте по 700 мкл «Промывочного раствора 1» в каждую колонку, центрифугируйте в течение 30 секунд. Слейте супернатант из собирательной пробирки. Верните колонку в ту же собирательную пробирку.

2.2.10. Добавьте по 700 мкл «Промывочного раствора 2» в каждую колонку, центрифугируйте в течение 1 минуты. Слейте супернатант из собирательной пробирки. Верните колонку в ту же собирательную пробирку.

2.2.11. Повторите п. 2.2.10, перенесите колонку в новую собирательную пробирку.

2.2.12. Центрифугируйте пустую колонку в течение 1 минуты.

ВНИМАНИЕ! Если на кольце внутри колонки остались капли промывочного раствора, удалите их пипеткой.

2.2.13. Оставьте открытые колонки при комнатной температуре на 5 минут для испарения остатка спирта.

2.2.14. Подготовьте и промаркируйте новые пробирки объемом 1.5 мл для каждого образца. Перенесите колонки в промаркированные пробирки.

2.2.15. Нанесите в центр мембраны колонки по 100 мкл «Деионизированной воды без РНКаз». Инкубируйте пробирки при комнатной температуре в течение 2 минут. Центрифугируйте в течение 1 минуты для сбора РНК (в препарате РНК будет присутствовать ДНК).

► Для увеличения концентрации РНК можно уменьшить объем «Деионизированной воды без РНКаз» до 50 мкл. Не используйте менее 50 мкл «Деионизированной воды без РНКаз», так как из-за неполного смачивания мембраны колонки может произойти частичная потеря РНК.

Очищенная РНК хранится при -70°C до 1 года.

10.2.3. Выделение РНК с обработкой ДНКазой

2.3.1. Инкубируйте образцы в течение 10 минут при комнатной температуре, тщательно перемешайте на вортексе.

2.3.2. Добавьте по 500 мкл «Связывающего раствора 1» в каждую пробирку. Перемешайте содержимое пробирки переворачиванием и инкубируйте при комнатной температуре в течение 2 минут.

2.3.3. Центрифугируйте пробирки в течение 5 минут.

2.3.4. Подготовьте и промаркируйте новые пробирки объемом 1.5 мл для каждого образца.

2.3.5. Перенесите 500 мкл образца в новые пробирки, добавьте 500 мкл изопропанола, тщательно перемешайте на вортексе.

2.3.6. Центрифугируйте в течение 10 минут.

2.3.7. Слейте супернатант. Сбросьте капли кратким центрифугированием на вортексе и аккуратно отберите остатки супернатанта.

2.3.8. Высушите осадок в течение 2 минут при $+37^{\circ}\text{C}$.

2.3.9. Во время выполнения пп. 2.3.6–2.3.8 приготовьте реакционную смесь с ДНКазой из расчета на 1 образец:

- 42 мкл «Деионизированной воды без РНКаз»;
- 5 мкл «10X Реакционного буфера для ДНКазы E»;
- 3 мкл «ДНКазы E».

► При работе с большим количеством образцов рекомендуется приготовить реакционную смесь с небольшим запасом.

2.3.10. К осадку добавьте 50 мкл реакционной смеси с ДНКазой, аккуратно перемешайте пипетированием до полного растворения осадка.

2.3.11. Инкубируйте в течение 10 минут при $+37^{\circ}\text{C}$

2.3.12. Во время выполнения п. 2.3.11 подготовьте и промаркируйте необходимое количество микроцентрифужных колонок с собирательными пробирками.

2.3.13. Внесите в каждую колонку по 500 мкл «Связывающего раствора 2» и 50 мкл смеси, полученной после инкубации. Закройте крышку колонки, плотно прижмите колонку к собирательной пробирке и перемешайте содержимое переворачиванием.

- 2.3.14. Центрифугируйте в течение 1 минуты. Слейте супернатант из собирающей пробирки. Верните колонку в ту же собирающую пробирку.
- 2.3.15. Добавьте по 700 мкл «Промывочного раствора 1» в каждую колонку, центрифугируйте в течение 30 секунд. Слейте супернатант из собирающей пробирки. Верните колонку в ту же собирающую пробирку.
- 2.3.16. Добавьте по 700 мкл «Промывочного раствора 2» в каждую колонку, центрифугируйте в течение 1 минуты. Слейте супернатант из собирающей пробирки. Верните колонку в ту же собирающую пробирку.
- 2.3.17. Повторите п. 2.2.16, перенесите колонку в новую собирающую пробирку.
- 2.3.18. Центрифугируйте пустую колонку в течение 1 минуты.

ВНИМАНИЕ! Если на кольце внутри колонки остались капли промывочного раствора, удалите их пипеткой.

- 2.3.19. Оставьте открытые колонки при комнатной температуре на 5 минут для испарения остатка спирта.
- 2.3.20. Подготовьте и промаркируйте новые пробирки объемом 1,5 мл для каждого образца. Перенесите колонки в промаркированные пробирки.
- 2.3.21. Нанесите в центр мембраны колонки по 100 мкл «Деионизированной воды без РНКаз». Инкубируйте пробирки при комнатной температуре в течение 2 минут. Центрифугируйте в течение 1 минуты для сбора очищенной РНК.

► Для увеличения концентрации РНК можно уменьшить объем «Деионизированной воды без РНКаз» до 50 мкл. Не используйте менее 50 мкл «Деионизированной воды без РНКаз», так как из-за неполного смачивания мембраны колонки может произойти частичная потеря РНК.

Очищенная РНК хранится при -70°C до 1 года.

11. Возможные проблемы и способы их решения

Возможные проблемы	Возможная причина	Варианты решения
1. Низкий выход РНК.	1. Неполное разрушение клеток или тканей на этапе гомогенизации. 2. Использовано избыточное количество исходного растительного материала.	1. Убедитесь, что гомогенизация проведена тщательно. В полученном гомогенizате не должно быть видимых фрагментов неповрежденной ткани. При необходимости увеличьте время или интенсивность гомогенизации, убедитесь в достаточном количестве абразива. При измельчении в жидком азоте ткани должны быть постоянно заморожены. 2. Не превышайте количество биоматериала, указанное в инструкции. Перегруз может привести к неполному лизису, засорению мембраны колонки и снижению выхода РНК.

Возможные проблемы	Возможная причина	Варианты решения
	<p>3. Неполное элюирование РНК с мембраны.</p> <p>4. Остаточный этанол в колонке ингибирует элюирование РНК.</p> <p>5. Особенность флуориметрического измерения концентрации РНК.</p>	<p>3. Повторите стадию элюирования, предварительно инкубировав колонку с «Водой, свободной от РНКаз», в течение 5–7 минут при комнатной температуре перед центрифугированием. Это особенно важно при работе с образцами, содержащими большое количество полисахаридов или фенольных соединений.</p> <p>4. Убедитесь, что колонка была полностью высушена после промывки. Для полного удаления этанола выполните дополнительное центрифугирование в новой пробирке в течение 1 минуты и высушивание мембраны на воздухе.</p> <p>5. В препаратах тотальной РНК растений присутствует значительная доля низкомолекулярных РНК (таких как 4S,5S рРНК пластид и 5S, 5.8S рРНК), которые вносят большой вклад в общее поглощение на 260 нм. Несмотря на то, что флуориметрические методы более специфичны и чувствительны, некоторые флуоресцентные красители хуже связываются с низкомолекулярными РНК, что приводит к отсутствию вклада низкомолекулярных РНК в измеренную с помощью этих красителей концентрацию. При необходимости можно удалить низкомолекулярные РНК из препарата тотальной РНК методом осаждения РНК с хлоридом лития.</p>
<p>2. Деградация РНК.</p>	<p>1. Контаминация образца РНКазами или несоблюдение условий, предотвращающих деградацию РНК.</p> <p>2. Неправильное хранение или недостаточная стабилизация растительного материала.</p>	<p>1. Работайте исключительно в перчатках, используйте стерильные наконечники и пробирки, свободных от РНКаз. Все операции проводите на чистой, выделенной поверхности.</p> <p>2. Сразу после взятия растительного материала быстро замораживайте их в жидком азоте. Избегайте хранения при –20 °С без стабилизатора, поскольку это может привести к активации эндогенных РНКаз. Избегайте повторных циклов замораживания и оттаивания образцов.</p>
<p>3. Наличие следовых количеств геномной ДНК в препарате РНК после обработки ДНКазой.</p>	<p>Используемая ДНКаза эффективно гидролизует длинные фрагменты геномной ДНК, однако может оставлять короткие фрагменты (до 200 пар нуклеотидов) в следовых количествах.</p>	<p>Рекомендации: разбавить препарат РНК в 10–100 раз (в зависимости от исходной концентрации) в буфере, свободном от РНКаз.</p>

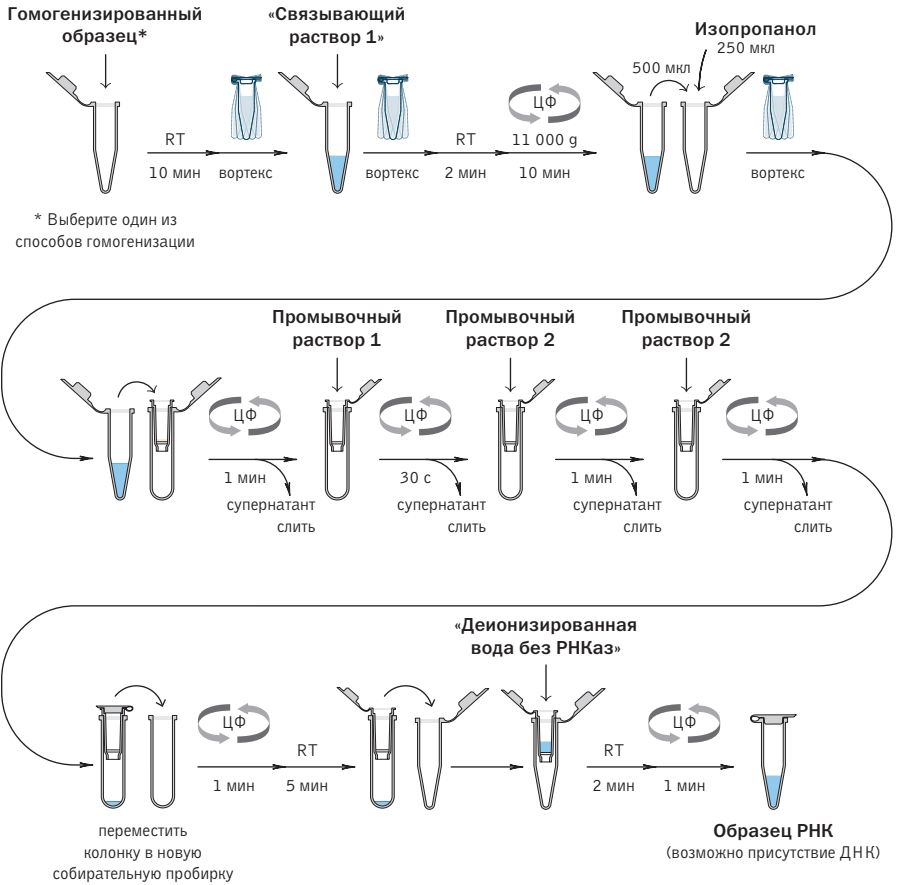


Рисунок 1 — схема выделения РНК без обработки ДНКазой

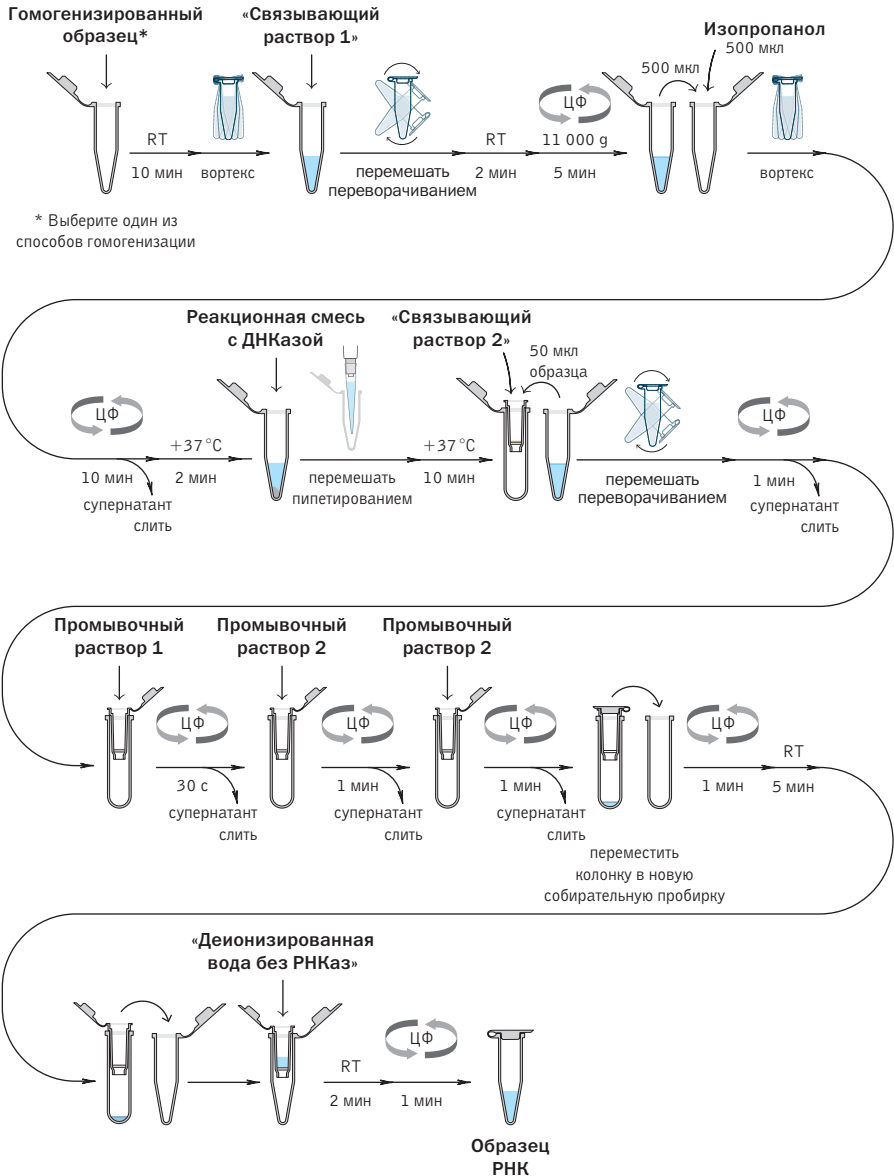


Рисунок 2 — схема выделения РНК с обработкой ДНКазой

Наборы и сервисы Евроген

Выделение и очистка нуклеиновых кислот [Н](#)▶▶▶

Реактивы для ПЦР и ПЦР-РВ [Н](#)▶▶▶

Синтез и амплификация кДНК [Н](#)▶▶▶

Клонирование ДНК [Н](#)▶▶▶ [С](#)▶▶▶

Выявление контаминации микоплазмой [Н](#)▶▶▶

Оценка ДНК [Н](#)▶▶▶

Нормализация кДНК [Н](#)▶▶▶

Практикум по геной инженерии [Н](#)▶▶▶

Генотипирование [Н](#)▶▶▶

Синтез олигонуклеотидов и зондов [С](#)▶▶▶

Секвенирование по Сэнгеру [С](#)▶▶▶

Синтез генов [С](#)▶▶▶

Сайт-направленный мутагенез [С](#)▶▶▶

[Н](#)▶▶▶ – ссылка на страницу
НАБОРА

[С](#)▶▶▶ – ссылка на страницу
СЕРВИСА

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