

RNA Solo

Набор для выделения суммарной РНК на микроцентрифужных колонках из клеток и мягких тканей человека и животных, бактерий, дрожжей

Номера по каталогу:

BC034T — на 10 выделений РНК

BC034S — на 50 выделений РНК

Инструкция по применению

Оглавление

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

1. Назначение

Набор RNA Solo предназначен для выделения суммарной РНК на микроцентрифужных колонках из клеток и мягких тканей человека и животных, бактерий, дрожжей.

Очищенную суммарную РНК можно использовать 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 набора

- Удаление примеси геномной ДНК с помощью ДНКазы без РНКазной активности (rDSN, рекомбинантная дуплекс-специфическая нуклеаза).
- Удобная процедура выделения не требует органической экстракции фенолом и хлороформом.
- Минимальный риск кросс-контаминации образцов (исключено повторное использование собираемых пробирок при удалении фильтрата).

3. Метод

Для выделения РНК из фрагментов тканей, дрожжей требуется предварительная механическая гомогенизация биоматериала в жидком азоте. Культивируемые клеточные культуры, лейкоциты, клеточные осадки, бактериальные культуры и другие биологические образцы, которые представляют собой отдельные клетки, лишённые плотной оболочки, не требуют дополнительной механической гомогенизации.

На первом этапе выделения РНК при добавлении к биоматериалу смеси «Лизис-раствора А» с β-меркаптоэтанолом 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 «Раствор В» с высоким содержанием соли. В этих условиях большая часть белков и геномной ДНК выпадает в осадок, который уплотняется центрифугированием. Осветленный лизат отбирают и смешивают со «Связывающим раствором С». Последующее центрифугирование приводит к осаждению РНК и остаточной ДНК в виде белого осадка [1].

На втором этапе происходит очищение РНК от остатков ДНК. Для этого осадок растворяют в буфере, содержащем rDSN, и инкубируют при 37 °С 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 набора

Компоненты набора	BC034T (10 выделений)	BC034S (50 выделений)
Модуль для выделения РНК		
Лизис-раствор А	2.5 мл	12 мл
Раствор В	1.2 мл	6 мл
Связывающий раствор С	17 мл	80 мл
Промывочный раствор для РНК (концентрат)	4.8 мл	24 мл (2 x 12 мл)
Деионизированная вода без РНКаз	1.5 мл	6 мл (4 x 1.5 мл)
Спин-колонки для выделения РНК в комплекте с собирательными пробирками	10 шт.	50 шт.
Собирательные пробирки	30 шт.	150 шт. (3 x 50 шт.)
Пробирки на 1.5 мл без РНКаз	10 шт.	50 шт.
Модуль для обработки ДНКазой		
ДНКазы rDSN (лиофилизированная)	50 е.а.	200 е.а. (2 x 100 е.а.)
Буфер для хранения ДНКазы	60 мкл	200 мкл
10X реакционный буфер для ДНКазы	100 мкл	500 мкл

5. Условия хранения и транспортировки

Транспортировка: при комнатной температуре.

ВНИМАНИЕ! После получения набора поместить «Модуль для обработки ДНКазой» в морозильную камеру (от -25 до -15 °C).

«ДНКазу rDSN» после растворения хранить при температуре от -25 до -15 °C не более 6 месяцев в пределах срока годности набора.

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

6. Основные характеристики

- Емкость колонки: до 50 мкг РНК.

Материал		Выход РНК, мкг*	Чистота препарата по спектрофотометрическим показателям*	
			260/280	260/230
10 мг	эмбрион	16–20	2	2.2
гомогенизированной фиксированной ткани в IntactRNA	мозг	16–20	2	2.2
	сердце	2.3–3.3	2–2.1	2.3–3.6
	почка	7.8–12.4	2	2.8–3.6
	печень	5.2–8.8	3	3–6.7
	легкие	3.5–4.5	2	1.8–2
	мышцы	4.3–5.1	1.8–2	1.9–2.3
2 мл ночной культуры <i>E.coli</i>		44–47	1.8–2.1	2–2.2
2 мл ночной культуры <i>Pichia pastoris</i>		3.8–5	2–2.2	1.9–2.6
0.5×10^6 HeLa		5.4–11.4	2–2.1	2.1–2.4
10^6 HeLa		9.6–20.8	2–2.1	2.1–2.4

*Выход и качество РНК напрямую зависят от свойств биоматериала, срока и способа хранения до выделения.

7. Необходимое оборудование и дополнительные материалы

Необходимое оборудование

- Твердотельный термостат (2 шт. или 1 шт. с активным охлаждением).
- Настольная центрифуга для пробирок с ускорением до 11 000 g.
- Миницентрифуга-вортекс.
- Автоматические дозаторы на 20, 200 и 1 000 мкл.
- При работе с тканями животных и дрожжами: гомогенизатор Даунса, фарфоровая ступка, пестики для гомогенизации образцов (из полипропилена, металлические или керамические) или иной инструмент для разрушения тканей.

Дополнительные материалы

- β -меркаптоэтанол.
- Этиловый спирт (96%).
- PBS (опционально, при работе с фиксированным биоматериалом).
- Пробирки объемом 1.5 мл типа эппендорф.
- Стерильные наконечники с гидрофобным фильтром.
- Жидкий азот (при необходимости гомогенизации).

8. Меры предосторожности

При работе необходимо использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами.

«Лизис-раствор А» и «Связывающий раствор С» 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 при попадании на кожу может повлечь аллергическую реакцию. Имеет резкий запах, не подносить к лицу, не вдыхать пары. При пролипании промыть поверхность водой и проветрить помещение.

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

9. Биологический материал

Тип биологического материала	Рекомендуется использовать:
Эукариотические культуры клеток	$10^5 - 10^6$ клеток
Ткани животных и грибов (мягкие ткани животных, насекомые, черви, кишечнopolостные и пр.)	10–20 мг, линейные размеры образца должны быть в пределах от 0.2 до 2 мм
Бактерии	2 мл ночной культуры
Дрожжи	2 мл ночной культуры

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

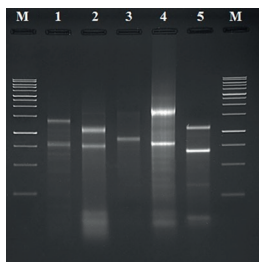


Рисунок 2 – пример результатов выделения тотальной РНК с помощью набора «RNA Solo».

На гель нанесены РНК, выделенные из биоматериала:

1 – Кишечная палочка (*Escherichia coli*);

2 – Печень мыши домашней (*Mus musculus*);

3 – Муха черная (*Bibio marci*);

4 – Дрожжи (*Pichia pastoris*);

5 – Коралловый полип (род *Clavularia*);

М – Маркер длин ДНК, 100 нг (1 kb DNA Ladder, кат. # NL001, Евrogen).

10. ПРОТОКОЛ

Общее время работы от 1.5 часов.

10.1. Подготовка растворов перед первым использованием набора

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

BC034T — 20 мл;

BC034S — по 50 мл в каждый флакон.

Перемешайте переворачиванием и поставьте галочку на крышке флакона.

- ▶ В набор BC034S входит 2 флакона с концентрированным «Промывочным раствором для РНК», рекомендуется добавлять этанол во второй флакон после расходования уже разведенного первого.

1.2. Растворите «ДНКазу rDSN»:

- добавьте «Буфер для хранения ДНКазы» в пробирку с лиофилизированной ДНКазой в количестве:

BC034T — 60 мкл,

BC034S — по 100 мкл в каждую пробирку;

- аккуратно перемешайте пипетированием, инкубируйте 5 мин при комнатной температуре, сбросьте капли центрифугированием;
- напишите на этикетке дату растворения ДНКазы. Растворенную ДНКазу необходимо хранить при температуре от -25 до -15 °C не более 6 месяцев.

- ▶ *В набор BC034S входит 2 пробирки с ДНКазой, рекомендуется добавлять «Буфер для хранения ДНКазы» во вторую пробирку после расходования первой.*

10.2. Подготовка реагентов перед каждым циклом работы

2.1. «Лизис-раствор А» в процессе хранения образует осадок. Прогрейте флакон с «Лизис-раствором А» при $+56$ °C до полного растворения осадка и тщательно перемешайте.

Рекомендуется разаликвотировать прогретый (с полностью растворенным осадком) «Лизис-раствор А» по микроцентрифужным пробиркам (1.5 мл или 2 мл) для удобства использования в дальнейшей работе.

2.2. Приготовьте в чистой пробирке смесь для лизиса из расчета на 1 образец:

200 мкл «Лизис-раствора А»;

2 мкл β -меркаптоэтанола.

Смесь «Лизис-раствора А» с β -меркаптоэтанолом можно хранить не более 1 недели при температуре от $+2$ до $+8$ °C.

- ▶ *При необходимости выделения РНК из большого количества образцов, рекомендуется готовить смесь «Лизис-раствора А» с β -меркаптоэтанолом с запасом по объему — из расчета на 1 образец больше.*

2.3. Поместите пробирку с водой для элюции в термостат на $+56$ °C.

10.3. Гомогенизация биоматериала

ВНИМАНИЕ! Проводить работу на отдельном чистом рабочем месте. Во время работы использовать пластик, свободный от РНКаз.

Выделение 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.

3.1. Удалите консервант (опционально):

Если образцы биоматериала хранятся в консерванте, удалите его перед выделением РНК:

- добавьте равный объем буфера PBS, импульсно перемешайте на вортексе;
- центрифугируйте пробирку с биоматериалом в течение 5 минут при 3 000 g (7 000 об/мин для настольной центрифуги Eppendorf Minispin);
- тщательно отберите пипеткой консервант над осадком.

3.2. Проведите лизис в зависимости от типа образца

А. Небольшой клеточный осадок (до 1 млн клеток).

- Добавьте к осадку 200 мкл горячей смеси для лизиса и тщательно ресуспендируйте пипетированием или на вортексе.
- Инкубируйте лизат 5 минут при +56 °С.

Б. Фрагменты ткани, клеточные осадки (более 1 млн клеток), мелкие организмы и дрожжи.

- Тщательно гомогенизируйте фрагмент в жидком азоте. Постарайтесь выполнить разрушение ткани как можно быстрее, чтобы не допустить нагревание образца.
 - После гомогенизации добавьте к образцу 200 мкл горячей смеси для лизиса и тщательно перемешайте на вортексе.
 - Инкубируйте лизат 5 минут при +56 °С.
- *От скорости выполнения этого этапа будет зависеть качество выделенной РНК.*

10.4. Выделение РНК

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

- 4.1. Включите термостат на +37 °С.
- 4.2. К 200 мкл лизата добавьте 100 мкл «Раствора В», тщательно перемешайте смесь на вортексе. В растворе должны образоваться крупные белые хлопья.
- 4.3. Центрифугируйте в течение 10 минут.
- 4.4. Во время центрифугирования подготовьте и промаркируйте чистые пробирки объемом 1.5 мл по числу образцов.
- 4.5. Внесите в каждую пробирку по 1 мл «Связывающего раствора С».
- 4.6. Аккуратно, не захватывая осадок, отберите супернатант и перенесите в подготовленные пробирки с «Раствором С». Пробирки с осадком выбросьте.

ВНИМАНИЕ! При отборе супернатанта не захватывайте слизь, которая может образоваться над осадком. Допустимо часть лизата оставить в пробирке.

- 4.7. Тщательно перемешайте содержимое пробирок на вортексе.
- 4.8. Центрифугируйте в течение 10 минут. Слейте супернатант.
- 4.9. Добавьте к осадку 700 мкл «Промывочного раствора для РНК».
- 4.10. Центрифугируйте в течение 5 минут. Слейте супернатант. Сбросьте капли кратким центрифугированием на вортексе и аккуратно отберите остатки промывочного буфера.
- 4.11. Высушите осадок в течение 2 минут при +37 °С.
- 4.12. Во время выполнения п.4.10 и 4.11 приготовьте реакционную смесь с ДНКазой из расчета на 1 образец:
 - 42 мкл «Деионизированной воды без РНКаз»;
 - 5 мкл «10X реакционного буфера для ДНКазы»;
 - 3 мкл «ДНКазы rDSN».
- ▶ При работе с большим количеством образцов рекомендуется приготовить реакционную смесь в увеличенном объеме (с небольшим запасом).
- 4.13. К осадку добавьте 50 мкл реакционной смеси с ДНКазой, аккуратно перемешайте пипетированием до полного растворения осадка.
- 4.14. Инкубируйте в течение 10 минут при +37 °С.

- 4.15. Во время выполнения п. 4.14 подготовьте и промаркируйте микроцентрифужные колонки, помещенные в собирательные пробирки, по количеству образцов.
- 4.16. Внесите в каждую колонку по 500 мкл «Связывающего раствора С» и 50 мкл смеси, полученной после инкубации. Закройте крышку колонки, плотно прижмите колонку к собирательной пробирке и перемешайте содержимое переворачиванием.
- 4.17. Центрифугируйте колонки в течение 15 сек. Перенесите колонку в новую собирательную пробирку. Использованные собирательные пробирки с фильтратом утилизируйте.
- 4.18. Внесите по 700 мкл «Промывочного раствора для РНК» в каждую колонку.
- 4.19. Центрифугируйте колонки в течение 15 сек. Перенесите колонку в новую собирательную пробирку. Использованные собирательные пробирки с фильтратом утилизируйте.
- 4.20. Повторите п. 4.18.
- 4.21. Центрифугируйте в течение 1 мин для полного удаления остатков промывочного раствора.
- 4.22. Во время выполнения п. 4.21 подготовьте и промаркируйте пробирки объемом 1.5 мл, входящие в состав набора, по числу образцов.

ВНИМАНИЕ! Если на кольце внутри колонки остались капли «Промывочного раствора», удалите их пипеткой.

- 4.23. Перенесите колонки в промаркированные пробирки.
- 4.24. Нанесите в центр мембраны колонок по 50 мкл предварительно прогретой «Деионизированной воды без РНКаз», закройте крышки.
- 4.25. Инкубируйте в течение 1 минуты при комнатной температуре.
- 4.26. Центрифугируйте в течение 1 минуты.
- 4.27. Утилизируйте колонки, закройте крышки пробирок. Суммарная РНК может быть сразу использована для дальнейшей работы.

ВНИМАНИЕ! Все 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 от -25 до -15 °C до 1 года.

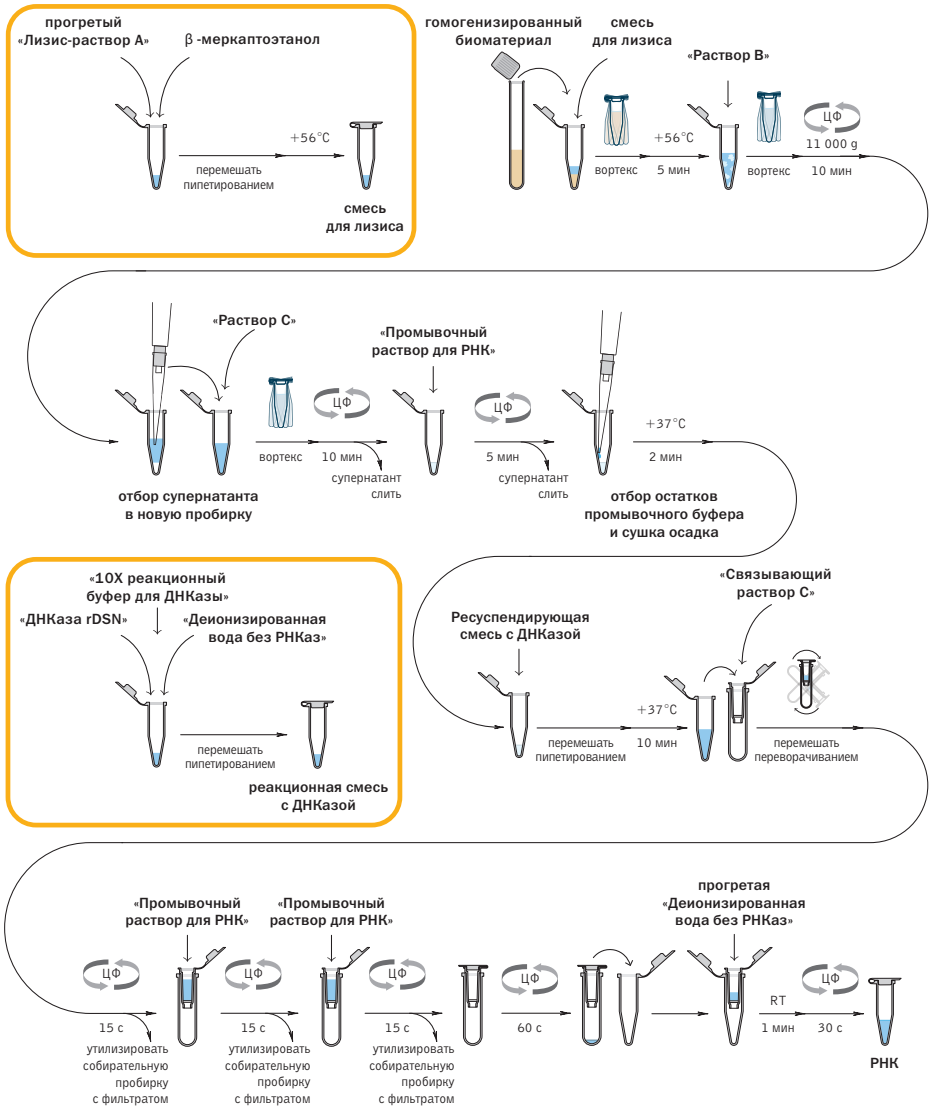


Рисунок 1 – схема выделения РНК.

11. Возможные проблемы и способы их решения

Несмотря на то, что в ходе выделения РНК обрабатывается ДНКазой rDSN, она может содержать остаточное количество коротких фрагментов ДНК до 200 нуклеотидов в концентрации 0.001–0.002 нг/мкл (при выделении РНК из 1 млн клеток линии HeLa). В некоторых крайне чувствительных приложениях ДНК даже в столь низкой концентрации может мешать основной реакции. В таком случае рекомендуется разбавить выделенную РНК в 10–100 раз (в зависимости от концентрации выделенной РНК).

12. Приложение

Определение качества РНК

Многие молекулярно-биологические и генетические методы требуют использование препарата РНК высокого качества. Поэтому необходимым этапом является проверка целостности РНК перед переходом к следующим этапам анализа.

Агарозный гель

Основной метод анализа — постановка аликвоты выделенной РНК в денатурирующем агарозном геле с добавлением интеркалирующего красителя. Интактная общая РНК, нанесенная на денатурирующий гель, будет иметь две четкие полосы 28S и 18S рРНК для эукариотических организмов и 23S и 16S рРНК для прокариотических организмов. Соотношение интенсивности полос 28S рРНК к 18S рРНК (и 23S к 16S рРНК), равное 2:1 является хорошим показателем того, что РНК полностью не повреждена. Частично деградированная РНК будет иметь размытый вид, не будет иметь острых полос рРНК или не будет демонстрировать соотношение 2:1. Полностью разложившаяся РНК будет выглядеть как мазок с очень низким молекулярным весом.

Список литературы

1. Nwokeoji A.O., Kilby P.M., Portwood D.E., Dickman M.J. RNASwift: a rapid, versatile RNA extraction method free from phenol and chloroform, *Analytical Biochemistry* (2016), doi:10.1016/j.ab.2016.08.001.

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**

NGS секвенирование **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