

# ExtractRNA

Реагент для выделения суммарной РНК из биологических образцов

Номер по каталогу:  
BC032 — на 100 выделений

[Инструкция по применению](#)

## Оглавление

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

## 1. Назначение

«ExtractRNA» — монофазный водный раствор фенола и гуанидин изотиоцианата, предназначенный для быстрого выделения суммарной РНК высокого качества из широкого круга объектов: животные и растительные ткани, культуры клеток млекопитающих, бактерии, дрожжи.

Общая РНК, выделенная с помощью реагента «ExtractRNA», может быть использована для синтеза кДНК, ОТ-ПЦР, Нозерн-блота, трансляции *in vitro*, выделения поли(А) фракции и других молекулярно-биологических приложений.

**Только для использования в научно-исследовательских целях.**

## 2. Состав

Компонент	Количество
Реагент ExtractRNA	100 мл

## 3. Условия хранения и транспортировки

**Транспортировка:** при комнатной температуре.

**Хранение:** при +4 °С в защищенном от света месте.

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

## 4. Количество реакций

Реагент «ExtractRNA» рассчитан на 100 выделений РНК из рекомендуемого количества биоматериала (см. п. 6. Основные характеристики). В случае необходимости протокол может быть масштабирован для обработки большего количества биоматериала, что уменьшит количество анализируемых образцов.

## 5. Метод

Добавленный к образцу реагент моментально лизирует клетки, при этом целостность РНК сохраняется за счет высокоэффективного ингибирования активности РНКаз. Раствор после добавления хлороформа и центрифугирования разделяется на водную фазу, интерфазу и органическую фазу, при этом РНК, ДНК и белки оказываются в разных фазах.

## 6. Основные характеристики

- Чистота препарата РНК по спектрофотометрическим характеристикам:
  - 260/280:  $1.7 \pm 0.1$ ;
  - 260/230: чистота образцов сильно зависит от биологического материала и аккуратности работы. При недостаточной степени чистоты выделенную РНК рекомендуется очистить с помощью набора «CleanRNA Standard» (кат. # BC033, Евроген).
- Выход РНК:

Биологический материал		Количество	Значение, мкг
Ночная культура <i>E. coli</i>		2 мл	$145.6 \pm 10.2$
Культура клеток человека и животных (данные приведены для клеток HeLa)		$0.5 \times 10^5$	$7.8 \pm 0.6$
		$1.1 \times 10^6$	$17.1 \pm 3.0$
		$2.2 \times 10^6$	$29.0 \pm 2.9$
Ночная культура <i>P. pastoris</i>		2 мл	$15.6 \pm 2.8$
Цельная кровь человека или животных	с антикоагулянтом гепарин	200–300 мкл	от $0.6 \pm 0.1$ до $1.3 \pm 0.1$ (в зависимости от донора)
	с антикоагулянтом цитрат или ЭДТА	200 мкл	$0.3 \pm 0.1$
Эмбрион мыши <i>M. musculus</i> , фиксированный в IntactRNA		2.7 мг	$13.3 \pm 1.6$
Ткани человека или животных (данные приведены для тканей <i>M. musculus</i> , фиксированных в IntactRNA)	печень	10 мг	$26.2 \pm 1.0$
		50 мг	$293.6 \pm 33.3$
	легкие	10 мг	$5.1 \pm 0.6$
		50 мг	$25.5 \pm 0.9$
	мозг	10 мг	$10.0 \pm 1.3$
		25 мг	$18.5 \pm 0.8$
	мышцы	10 мг	$1.0 \pm 0.2$
		25 мг	$2.3 \pm 0.6$
Ткани растений (данные приведены для листьев <i>N. benthamiana</i> )	10 мг	$7.2 \pm 1.7$	
	50 мг	$18.0 \pm 3.0$	

## 7. Меры предосторожности

Реагент «ExtractRNA» содержит токсичные и раздражающие вещества: фенол и гуанидин-изотиоцианат, которые при попадании на кожу вызывают ожоги. При работе с «ExtractRNA» необходимо соблюдать меры безопасности:

- хранить в плотно закрытой таре;
- не допускать проглатывания, попадания на слизистые и кожу;
- при попадании компонентов набора на кожу или слизистые оболочки место контакта следует промыть большим количеством воды не менее 15 минут;
- при работе необходимо использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами.

## 8. Необходимое оборудование и дополнительные материалы

- Твердотельный термостат.
  - Настольная центрифуга для пробирок с ускорением до 11 000 g.
  - Вортекс.
  - Автоматические дозаторы на 20, 200 и 1 000 мкл.
  - Микроцентрифужные пробирки объемом 1.5 мл.
  - Наконечники для дозатора с фильтрами.
  - Гомогенизатор Даунса, керамические ступка с пестиком или пластиковые пестики.
  - Жидкий азот.
  - Изопропиловый спирт.
  - Этанол 80%.
  - Вода, свободная от нуклеаз.
- Не рекомендуется использовать диэтилпиروкарбонат (DEPC) для обработки воды и других компонентов.

## 9. Биологический материал

Набор реагентов «ExtractRNA» позволяет выделять РНК из следующих видов биоматериала: суспензионная или адгезионная культура клеток человека или животных, дрожжи, цельная кровь (РНК допускается выделять только из свежей крови, хранившейся не более трех суток при +4 °С) и другие ткани человека, животных или растений. Рекомендованные количества биоматериала приведены в п. 6. Основные характеристики.

## 10. ПРОТОКОЛ

Общее время работы: 2 часа.

**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.

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

## 10.1. Подготовка биоматериала

### Гомогенизация

**ВНИМАНИЕ!** Этап гомогенизации следует проводить быстро. В случае использования жидкого азота следите, чтобы ткани и клетки в процессе гомогенизации не размораживались.

Количество биоматериала, необходимое для гомогенизации, см. в п. 6 Основные характеристики.

1.1. Растительные ткани, клетки, дрожжи, плотные ткани млекопитающих (например, мышечная) необходимо гомогенизировать в жидком азоте с использованием керамической ступки с пестиком или полипропиленового пестика в пробирке.

Добавьте к гомогенизированному материалу 1 мл «ExtractRNA».

1.2. Мягкие ткани млекопитающих, в том числе кровь, допустимо сразу смешать с 1 мл «ExtractRNA» и гомогенизировать пипетированием и тщательным перемешиванием с помощью вортекса.

1.3. Ткани, содержащие нерастворимые частицы (например, минеральный скелет или хитин), необходимо гомогенизировать в жидком азоте с помощью стеклянного гомогенизатора Даунса или полипропиленового пестика в пробирке.

Добавьте к гомогенизированному материалу 1 мл «ExtractRNA».

1.4. Клетки, выращенные в монослое, гомогенизируйте непосредственно в культуральной чашке, предварительно отобрав культуральную среду.

► *Не промывайте клетки во избежание деградации РНК.*

Добавьте к клеткам «ExtractRNA» из расчета 1 мл на 10 см<sup>2</sup> (чашка Петри диаметром 35 мм), перемешайте суспензию пипетированием.

► *На чашку диаметром 60 мм требуется 3 мл «ExtractRNA», 100 мм — 8 мл.*

1.5. Для гомогенизации суспензии клеток предварительно осадите клетки центрифугированием (3 000–5 000 g в течение 2 минут), отберите культуральную жидкость.

► *Не промывайте клетки во избежание деградации РНК.*

Добавьте к осадку клеток «ExtractRNA» из расчета 1 мл на 10<sup>6</sup>–10<sup>7</sup> клеток, перемешайте суспензию пипетированием.

### Лизис

1.6. Инкубируйте лизат при комнатной температуре в течение 10 минут, чтобы произошла полная диссоциация нуклеопротеидных комплексов. Тщательно перемешайте лизат пипетированием и с помощью вортекса.

▶ При работе с клетками, выращенными в монослое, перенесите лизат из чашки Петри в пробирку. Если объем лизата больше 1 мл, то разделите его на аликвоты объемом примерно 1 мл.

▶ Лизат бактериальных клеток и крови необходимо инкубировать при 55 °С в течение 10 минут.

▶ После инкубации допускается приостановить выполнение протокола: лизаты можно хранить при –70 °С в течение 1 месяца или при +4 °С в течение двух месяцев. Лизаты следует размораживать при комнатной температуре. При необходимости для растворения солей прогрейте лизат при +37 °С на водяной бане, избегайте длительного прогрева.

1.7. Центрифугируйте лизат в течение 10 минут. Не касаясь осадка, аккуратно перенесите супернатант в новую пробирку.

▶ На поверхности лизата богатых жиром образцов может образоваться жировая пленка. При отборе супернатанта следует избегать попадания верхнего жирового слоя.

## 10.2. Разделение фаз

2.1. К супернатанту добавьте 0.2 мл хлороформа.

2.2. Закройте пробирку, активно перемешайте содержимое с помощью встряхивания в течение 15 секунд. Не используйте вортекс.

2.3. Центрифугируйте пробирку в течение 10 минут.

▶ В ходе центрифугирования произойдет разделение смеси на три фазы: нижнюю — органическую фенол-хлороформную фазу желтоватого оттенка, интерфазу белого цвета и верхнюю бесцветную водную фазу. РНК находится в водной фазе.

2.4. Наклоните пробирку на 45° и аккуратно, не касаясь интерфазы, отберите водную фазу в новую пробирку.

▶ Рекомендуется оставлять 1 мм водной фазы над интерфазой.

## 10.3. Выделение РНК

▶ Соблюдайте меры предосторожности, чтобы избежать загрязнения образца РНКазами.

3.1. К водной фазе добавьте 0.5 мл хлороформа.

3.2. Закройте пробирку, активно перемешайте содержимое в течение 15 секунд. Не используйте вортекс.

3.3. Центрифугируйте пробирку в течение 5 минут.

3.4. Аккуратно отберите верхнюю водную фазу и перенесите ее в чистую пробирку.

3.5. К водной фазе добавьте 0.5 мл 100% изопропанола. Перемешайте с помощью вортекса.

3.6. Центрифугируйте пробирку в течение 10 минут.

3.7. Тщательно отберите супернатант, оставив осадок РНК на дне пробирки.

▶ *Осадок РНК может быть невидим.*

3.8. Аккуратно по стенке пробирки добавьте 1 мл 80% этанола.

▶ *Образцы в этаноле могут храниться при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  и ниже в течение нескольких лет.*

3.9. Центрифугируйте пробирку в течение 5 минут.

3.10. Аккуратно удалите супернатант. Следите за тем, чтобы осадок не был утерян.

3.11. Повторите п.п. 3.8–3.10.

3.12. Высушите осадок при комнатной температуре в течении 5–7 минут или в термостате при  $60\text{--}65\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 1–2 минуты.

▶ *Не пересушивайте осадок! Пересохший осадок РНК плохо растворяется в воде.*

3.13. К осадку РНК добавьте воду, свободную от нуклеаз, в необходимом объеме. Перемешайте пипетированием и с помощью вортекса, сбросьте капли центрифугированием.

▶ *Для улучшения растворения рекомендуется прогреть образец при  $55\text{--}60\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 3–5 минут.*

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  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 1 года.

■ **ВНИМАНИЕ!** Препарат РНК содержит примесь геномной ДНК. Для удаления ДНК воспользуйтесь «ДНКазой E» (кат. ## EK007S/M, Евроген) и проведите переосаждение реакционной смеси этанолом.



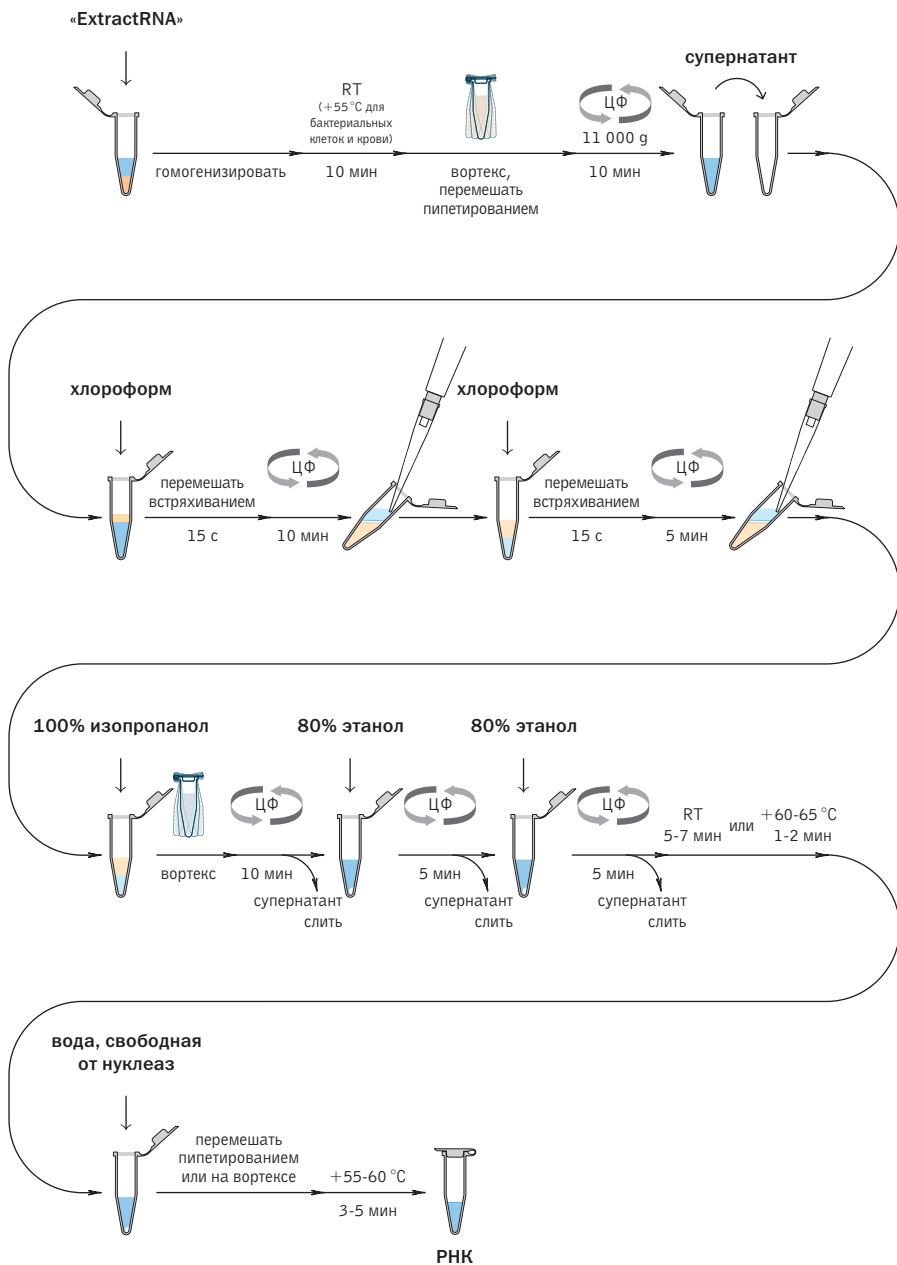


Рисунок 1 – схема выделения РНК.

## 11. Возможные проблемы и способы их решения

Возможные проблемы	Возможные причины	Варианты решения
1. Неполное разделение фаз после центрифугирования.	После добавления хлороформа лизат не был перемешан должным образом.	Тщательно встряхните пробирку рукой. Повторно центрифугируйте.
	Было добавлено мало хлороформа (ошибка дозирования).	Добавьте 0.2 мл хлороформа, повторите центрифугирование.
2. Низкий выход РНК.	Неполное разрушение клеток при гомогенизации.	Повторите выделение. Обратите внимание на гомогенизацию материала, если это необходимо, то тщательно разотрите ткани в жидком азоте; несколько раз вортируйте и пипетируйте лизат в течение инкубации с реагентом.
	Осадок РНК пересушен.	Не следует сушить осадок более 10 минут. В случае, если осадок плохо растворяется после высушивания, инкубируйте пробирку в течение 10–15 минут при 55–60°C, в процессе прогрева усиленно ресуспендируйте содержимое пробирки пипетированием.
	Стартовый материал состоит из старых или мертвых тканей, в которых мало РНК или она вовсе отсутствует.	Проанализируйте источник ткани, сделайте несколько заборов ткани из разных частей организма.
3. Дегградация РНК.	Раствор РНК загрязнен РНКазой или содержит ионы магния.	Используйте воду, свободную от РНКаз, не используйте буфер, содержащий ионы магния.
	Место работы контаминировано РНКазой.	Не совмещайте за одним столом работу с использованием РНКазы и разделку живых тканей с работой с препаратом РНК. Работу с образцами РНК следует проводить в отдельном боксе или на отдельном рабочем месте.
	Замороженные ткани растаяли при комнатной температуре до добавления реагента.	Повторите выделение РНК, добавляя реагент непосредственно к замороженной пробе, не позволяя ей растаять.
	Клетки, выращенные в культуральной среде, были промыты водой перед добавлением реагента.	Не промывайте клетки от культуральной среды. После отбора культуральной жидкости следует сразу добавить реагент.

Возможные проблемы	Возможные причины	Варианты решения
	Клетки, выращенные в культуральной среде, были обработаны трипсином.	Не обрабатывайте клетки трипсином, если они предназначены для выделения РНК.
	Живые ткани были не сразу зафиксированы или заморожены.	Стартовый материал должен быть заморожен немедленно после отбора, не подвергаться оттаиванию в процессе хранения. При фиксации консервантом следует соблюдать инструкции к реагенту для фиксации. В любом случае живая ткань, отделенная от целого организма, должна быть сразу же заморожена или зафиксирована.
4. Примеси геномной ДНК.	При отборе водной фазы были перенесены частицы интерфазы.	Выполнить отбор водной фазы более тщательно. При необходимости к водной фазе можно добавить 1/2 объема реагента, перемешать, затем добавить 1/5 объема хлороформа, встряхнуть, центрифугировать для разделения фаз и повторно отобрать водную фазу.
	Соотношение объема фрагмента ткани и объема реагента было нарушено.	Объем образца не должен превышать 10% от объема реагента, используемого для лизиса. Для улучшения качества РНК лучше увеличить количество реагента в 1.5–2 раза.
	Стартовый материал обогащен жировыми включениями, полисахаридами, кальциевыми отложениями и пр.	После тщательной гомогенизации и лизиса в течении 10-15 минут следует провести дополнительное центрифугирование образца для удаления дебриса (нерастворимый осадок) или жирового слоя (пленка сверху). Очищенный лизат перенести в чистую пробирку и перейти к стадии 10.2. Разделение фаз.

## Возможно приобрести дополнительно

Кат. #	Продукт	Количество
BC031	Фиксатор IntactRNA	100 фиксаций
BC033	CleanRNA Standard	25 реакций
EK007S	ДНКаза E	100 е.а.
EK007M		500 е.а.
PB207S	Вода деионизированная, свободная от нуклеаз	7.5 мл (5 x 1.5 мл)
PB207M		50 мл
PB207L		1 л

## 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](mailto:support@evrogen.ru)

Подробную информацию о наших наборах и сервисах  
можно получить на сайте [www.evrogen.ru](http://www.evrogen.ru)

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