



ExtractRNA

Реагент для выделения суммарной РНК
из биологических образцов

Номер по каталогу BC032

[Инструкция по применению](#)

Реагент ExtractRNA предназначен только для исследовательских работ,
выполняемых профессионально подготовленными пользователями.

Содержание

I.	Состав и условия хранения	1
II.	Меры предосторожности и утилизация	1
III.	Необходимые материалы	2
IV.	Протокол выделения суммарной РНК	3
IV.1.	Гомогенизация пробы	3
IV.2.	Разделение фаз	3
IV.3.	Выделение РНК	4
IV.4.	Рекомендации по выделению РНК	6
V.	Решение проблем	7

I. Состав и условия хранения

Продукт	Кат. #	Объем	Кол-во процедур
Реагент ExtractRNA	BC032	100 мл	100 выделений из 100 мг ткани

Транспортировка: при комнатной температуре.

Хранение: при 2-8°C в темном месте.

Срок хранения: при соблюдении условий хранения и транспортировки – 1 год.

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.

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.

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

II. Меры предосторожности и утилизация

Реагент ExtractRNA содержит фенол (токсичное и раздражающее вещество) и гуанидин-изотиоцианат (раздражающее вещество), при попадании на кожу вызывает ожоги.

- ▶ **Не допускайте попадания реагента на кожу или слизистые оболочки, а также вдыхания его паров!**

При работе с реагентом следует надевать защитные латексные или н/э перчатки, очки и халат, проводить все операции в вытяжном шкафу. При попадании на кожу рук или слизистые оболочки, немедленно

III Необходимые материалы

обработайте место слабым раствором соды и промойте большим количеством проточной воды не менее 15 минут. При необходимости, обратитесь за медицинской помощью.

При разливе реагента, нарушении герметичности тары, а также при утилизации остатков, смешать утилизируемую жидкость в соотношении не менее чем 1:1 с раствором слабой щелочи (0.1M гидроксид натрия/калия (NaOH/KOH) или раствор пищевой соды NaHCO₃). В случае отсутствия вышеназванных реагентов можно воспользоваться раствором обычного хозяйственного мыла в воде. Нейтрализовать не менее 10 минут.

Небольшие количества нейтрализованного раствора (до 1 мл) можно слить в канализацию, разбавив большим количеством воды. Тряпки или губки поместить в п/э пакет и выбросить, место пролива промыть мыльной водой. Проветрить помещение не менее 3 часов. Утилизация реагента должна проводиться в соответствии с правилами утилизации химических отходов.

III. Необходимые материалы

- Хлороформ
- Изопропиловый спирт
- 80% этиловый спирт
- Вода, свободная от РНКаз
- ▶ *Не рекомендуется использовать диэтилпиروкарбонат (DEPC) для обработки воды и других компонентов.*
- Центрифуга с охлаждением, обеспечивающая ускорение не менее 12 000 g
- Настольный термостат (55-60°C)
- Стерильные микроцентрифужные пробирки (1.5-2 мл)
- Устройство для разрушения и гомогенизации тканей:
Для замороженных тканей – жидкий азот, ступка с пестиком.
Для свежих или зафиксированных в консервирующих растворах (например, в фиксаторе IntactRNA, Евроген, кат. #BC031) тканей рекомендуется использовать гомогенизатор Даунса, шариковый

гомогенизатор (бисерная мельница). Также можно измельчить ткани скальпелем.

IV. Протокол выделения суммарной РНК

IV.1. Гомогенизация пробы

- 1) Гомогенизируйте образец в растворе ExtractRNA в соответствии с рекомендациями для вашего типа пробы (см. **IV.4. Рекомендации по выделению РНК**).
- 2) Инкубируйте лизат при комнатной температуре в течение 10-15 мин, чтобы произошла полная диссоциация нуклеопротеидных комплексов.
- 3) Центрифугируйте лизат при 12 000-15 000 g в течение 10 минут для удаления нерастворенных фрагментов. Супернатант перелейте в новую пробирку.

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

- ▶ Лизаты могут храниться при комнатной температуре в течение нескольких часов, при -70°C в течение одного месяца.
- ▶ Замороженные лизаты следует размораживать при комнатной температуре. При необходимости, прогрейте образец при 37°C на водяной бане в течение 5-10 мин до полного растворения солей. Избегайте длительного прогрева лизатов, это может вызвать деградацию РНК.

IV.2. Разделение фаз

- 1) Добавьте 0.2 мл хлороформа на каждый 1 мл реагента ExtractRNA, добавленного на этапе гомогенизации (см. **IV.1. Гомогенизация пробы**).
- 2) Закройте пробирку, активно перемешайте содержимое пробирки с помощью встряхивания (вручную) в течение 15 секунд. Не используйте вортекс.
- 3) Инкубируйте смесь в течение 3-5 минут при комнатной температуре, периодически встряхивая образец.

IV Протокол выделения суммарной РНК

4) Центрифугируйте образец при 12 000 g в течение 15 минут при 4°C.

▶ 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, составляющей 45-50% от общего объема смеси.

5) Держа пробирку наклонно (под углом 45°), аккуратно отберите водную фазу, избегая касания интерфазы или органической фазы. Для получения образцов РНК хорошего качества важно избежать отбора интерфазы.

6) Переместите водную фазу в новую пробирку.

▶ При выделении РНК из небольшого количества образца (менее 10^6 клеток или 10 мг ткани) в водную фазу рекомендуется добавить 5-10 мкг соосадителя нуклеиновых кислот *Satellite Red* (Евроген, кат. #BC001). Концентрация соосадителя не должна превышать 4 мг/мл.

IV.3. Выделение РНК

На этом этапе нужно соблюдать соответствующие меры предосторожности, чтобы избежать загрязнения препарата РНКазами.

1) Добавьте в водную фазу 0.5 мл 100% изопропанола на каждый 1 мл реагента, использованного для гомогенизации (см. **IV.1. Гомогенизация пробы**).

2) Инкубируйте смесь при комнатной температуре в течение 10 мин.

3) Центрифугируйте образец при 12 000 g в течение 10 мин при комнатной температуре.

▶ Понижение температуры может привести к выпадению солей в осадок.

4) Тщательно отберите супернатант, оставив осадок РНК на дне пробирки.

▶ Осадок РНК может быть невидим.

5) Аккуратно, по стенке пробирки, добавьте 2 мл 75% этанола на каждый 1 мл изопропанола, использованного в п.1.

- ▶ *Образцы в этаноле могут храниться при -20°C и ниже в течение нескольких лет.*
- 6) Образец центрифугируйте на максимальной скорости в течение 5 мин при комнатной температуре.
- 7) Удалите этанол.
- ▶ *Внимательно следите, чтобы в процессе отмывки осадок не был смыт со дна пробирки и утерян.*
- 8) Высушите осадок на воздухе в пробирке с открытой крышкой в течении 5-7 мин. Не оставляйте высохший образец на воздухе слишком долго: пересохший осадок РНК плохо растворяется в воде. Не используйте для сушки подогрев или вакуумное центрифугирование (Speed Vac).
- 9) Растворите РНК в необходимом объеме свободной от РНКаз воды. Перемешайте раствор пипетированием для лучшего растворения осадка. Встряхните раствор на вортексе, сбросьте капли центрифугированием.
- ▶ *Для улучшения растворения образец рекомендуется прогреть при $55-60^{\circ}\text{C}$ в течение 3-5 минут.*
- 10) Заморозьте образец.

Выделенная РНК может сразу же быть использована для любых приложений. Все дальнейшие работы с препаратом следует вести на льду. Перед длительным хранением препарат РНК рекомендуется распределить на аликвоты и заморозить. Замороженная РНК хранится при температуре -20°C и ниже в течение 1 года. Избегайте избыточных циклов замораживания-размораживания образца.

При использовании пробы для любых ПЦР-анализов следует учитывать, что фракция РНК всегда содержит примесь геномной ДНК. В ряде случаев образец РНК следует дополнительно обработать ДНКазой, свободной от РНКазной активности.

Ожидаемый выход РНК.

Из 1 мг ткани млекопитающих можно получить от 1 до 10 мкг РНК.

Стандартная процедура выделения с применением ExtractRNA рассчитана на небольшое количество стартового материала (до 50 мл

суспензии клеток или 5 мг ткани), однако, в случае необходимости, операции могут быть масштабированы для обработки большого количества исходного материала.

IV.4. Рекомендации по выделению РНК

- **Общие рекомендации**

Гомогенизацию в растворе ExtractRNA следует проводить при комнатной температуре. Объем используемого реагента ExtractRNA должен превышать объем образца не менее, чем в 10 раз. Недостаточное количество реагента может привести к загрязнению образца РНК геномной ДНК.

Постарайтесь выполнить процедуру выделения РНК максимально быстро (не более 1 часа), от скорости выполнения будет зависеть качество РНК.

- **Свежие и зафиксированные ткани**

Пинцетом поместите образец в емкость для гомогенизации с предварительно добавленным реагентом ExtractRNA. Необходимо использовать 1 мл ExtractRNA на каждые 50-100 мг ткани. Гомогенизируйте ткани в реагенте.

- ▶ *Мягкие ткани можно гомогенизировать пипетированием.*

Для разрушения тканей, содержащих нерастворимые частицы (например, минеральный скелет или хитин), требуется стеклянный гомогенизатор Даунса или полипропиленовый пестик для пробирок. Чтобы избежать деградации РНК, ткань, особенно свежую, следует гомогенизировать как можно быстрее и тщательнее.

- **Замороженные ткани**

(a) Измельчите замороженную ткань в мелкий порошок пестиком в ступке под жидким азотом. Следует периодически добавлять жидкий азот во избежание оттаивания образца.

(b) Быстро перенесите 50-100 мг измельченной ткани в пробирку, содержащую 1 мл реагента ExtractRNA.

- ▶ *Образец можно не перетирать, если ткань перед заморозкой была рассечена на небольшие фрагменты (толщиной не более 0.3-0.5 см).*

- **Выращенные в монослое клетки**

Клетки, выращенные в монослое, следует лизировать непосредственно в культуральной чашке.

(a) Отберите культуральную среду.

▶ Не следует промывать клетки во избежание деградации РНК.

(b) Сразу добавьте реагент ExtractRNA из расчета 1 мл на 10 см² поверхности чашки.

(c) Перемешайте суспензию пипетированием.

▶ На чашку диаметром 35 мм требуется 1 мл реагента ExtractRNA, на чашку диаметром 60 мм – 3 мл реагента, на чашку диаметром 100 мм – 8 мл реагента.

- **Суспензия клеток (млекопитающих, растений, бактерий или дрожжей)**

(a) Осадите клетки центрифугированием при 3000-5000 g в течение 2 минут.

(b) Отберите культуральную жидкость.

▶ Не следует промывать клетки во избежание деградации РНК.

(c) К осадку сразу добавьте реагент ExtractRNA из расчета 1 мл на $1 \times 10^6 - 10^7$ клеток.

(d) Перемешайте суспензию пипетированием.

▶ Для повышения эффективности лизиса суспензию бактерий и дрожжей в ExtractRNA можно инкубировать при 50-55°C в течение 10 мин. Для гомогенизации таких клеток можно использовать бисерную мельницу.

V. Решение проблем

Проблема	Возможная причина	Рекомендуемое решение
Неполное разделение фаз после центрифугирования	После добавления хлороформа лизат не был перемешан должным образом.	Если хлороформ уже добавлен, энергично встряхните пробирку рукой, дайте образцу постоять при комнатной температуре и повторите центрифугирование.

Продолжение на следующей странице

Проблема	Возможная причина	Рекомендуемое решение
	Лизат центрифугировали при неправильной температуре.	Убедитесь, что центрифугирование после добавления хлороформа проводилось при 4°C.
	Было добавлено мало хлороформа.	Добавьте 0,1 мл хлороформа, повторите центрифугирование.
Низкий выход РНК	Неполное разрушение клеток при гомогенизации.	Увеличьте продолжительность и/или интенсивность гомогенизации образца. Увеличьте объем добавляемого реагента.
	Осадок РНК пересушен.	Не следует сушить осадок более 10 мин. В случае, если осадок плохо растворяется после высушивания, инкубируйте пробирку в течение 10-15 мин при 55-60°C, в процессе прогревания усиленно ресуспендируйте содержимое пробирки пипетированием.
	Небольшие количества количества стартового материала.	Если возможно, снизьте количество добавляемого к образцам реагента до 0.3-0.5 мл (объем образца не должен превышать 10% от объема реагента). Используйте соосадитель при выделении РНК (см. IV.2.6.)
	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.
Деградация РНК	Раствор РНК загрязнен РНКазой или содержит ионы магния.	Используйте воду, свободную от РНКаз, не используйте буфер, содержащий ионы магния.

Продолжение на следующей странице

Проблема	Возможная причина	Рекомендуемое решение
	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.
	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.

Продолжение на следующей странице

Проблема	Возможная причина	Рекомендуемое решение
Примеси геномной ДНК	При отборе водной фазы была 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.
	Центрифугирование на стадии разделения фаз было проведено при более высокой температуре.	Убедитесь, что центрифугирование проводилось при +4°C.
	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 мин 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 IV.2. Разделение фаз.
	Стартовый материал содержит мало РНК.	Обработайте выделенный препарат РНК ДНКазой, свободной от РНКазной активности. Инактивируйте ДНКазу согласно рекомендациям производителя. Переосадите препарат спиртом при комнатной температуре для удаления мелких фрагментов ДНК.

Продукты и услуги компании Евроген

P – продукты

S – услуги

Молекулярная биология

Выделение и очистка нуклеиновых кислот, маркеры длин ДНК **P**

ПЦР, синтез кДНК и RACE **P S**

Клонирование ДНК **P S**

Нормализация кДНК **P S**

Учебные наборы **P**

Синтез олигонуклеотидов и секвенирование **S**

Секвенирование следующего поколения (NGS) **S**

Синтез генов и направленный мутагенез **S**

Приготовление библиотек кДНК **S**

Сложные сервисы **S**

Клеточная биология

Флуоресцентные белки **P**

Генетически-кодируемые сенсоры и фотосенсибилизаторы **P**

Антитела против флуоресцентных белков **P**

Временная трансфекция и создание стабильно трансфицированных клеточных линий **S**

Конструирование лентивирусных частиц **S**

Лентивирусные конструкции для РНК-интерференции **S**

Молекулярная медицина

Наборы для детекции мутаций в протоонкогенах **P**

Услуги в области молекулярной онкологии **S**

Услуги в области молекулярной генетики наследственных заболеваний **S**

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

Техническая поддержка: customer-support@evrogen.ru

ЗАО Евроген
Москва 117997
ул. Миклухо-Маклая 16/10, корпус
70 (Технопарк ИБХ)
Тел.: +7 (495) 988-4083
Факс: +7 (495) 988-4085
www.evrogen.ru
order@evrogen.ru