



Информация о продукте

Набор для выделения суммарной РНК и микроРНК из реагента «Ли́ра» (клетки, ткани) (LRU-100-50)

Важно!

Мы постоянно совершенствуем протокол работы с реагентом, поэтому просьба использовать протокол, идущий в комплекте с продуктом.

Протокол обновлён 6.03.2019.

Описание продукта

Набор предназначен для выделения и очистки суммарной РНК и малых форм РНК (до 200 н.т., включая микроРНК) из эукариотических и бактериальных клеток, тканей животных и растений. Набор сочетает методы фенол-хлороформной экстракции нуклеиновых кислот и их селективной сорбции на кремниевой мембране. Лизис образца происходит в реагенте «Ли́ра», содержащем фенол и гуанидин тиоцианат. Полученная гомогенная смесь после смешивания с хлороформом разделяется на нижнюю органическую фазу, интерфазу и верхнюю водную фазу. РНК, содержащаяся в водной фазе, сорбируется на колонке с кремниевым фильтром. Возможно выделение не менее 100-200 мкг суммарной РНК.

Набор рассчитан на выделение 100 образцов суммарной РНК либо 50 образцов малых форм РНК (до 200 н.т., включая микроРНК)

Выделенная РНК может быть использована для ОТ-ПЦР, нозерн-блота и других работ.

Состав набора

	LRU-100-50
Реагент «Ли́ра»	100 мл
Буфер для промывки WB (концентрат)	2x11 мл
Буфер для элюции EB (вода, очищенная от РНКаз)	15 мл
Пробирки для сбора фильтрата	2x50 шт
Колонки для сорбции образца	2x50 шт



Меры предосторожности

Осторожно! Реагент «Ли́ра» содержит фенол и гуанидин тиоцианат, оказывающие раздражающее и токсичное действие. При работе необходимо соблюдать правила общей и личной техники безопасности. Токсичен при попадании на кожу и внутрь. Вызывает ожоги.

При попадании на кожу промойте немедленно большим количеством воды и моющего средства (детергента). При необходимости покажитесь врачу.

Работу с реагентом «Ли́ра» необходимо проводить в вытяжном шкафу.

Условия хранения

Набор для выделения РНК LRU-100-50 может храниться при 2-25 °С в течение 12 месяцев.

Реагент «Ли́ра» хранить при 2-8 °С в течение 12 месяцев.

Материалы и оборудование необходимые для работы

Центрифуга способная достигать скорости не менее 10000 rcf

Полипропиленовые микроцентрифужные пробирки на 1.5-2 мл

Этанол, 96-99% раствор

Лизоцим, для выделения РНК из грамположительных бактерий

Перед началом работы:

Добавить 44 мл 96-99% этанола к буферу WB для получения 55 мл буфера, перемешать.

Для получения 500 мкл буфера добавить 400 мкл этанола к буферу WB.

Важно! Рекомендуется добавлять этанол к аликвоте буфера WB, поскольку при хранении буфера с этанолом в течение нескольких месяцев этанол может частично испариться.

Если планируется выделять РНК из грамположительных бактерий, приготовить раствор лизоцима с концентрацией 50 мг/мл в ТЕ буфере (0.01 M Tris-HCl (pH 8.0), 0.001 M EDTA).

Протокол выделения РНК.

Лизис образца

1а. Клеточная суспензия.

1.1а. Осадить клетки на центрифуге, удалить супернатант. Суспендировать клеточную суспензию в 10-30 мкл PBS.



1.2а. Лизировать клеточную суспензию в 500-1000 мкл реагента «Ли́ра» в течение 10 мин. Выделение проводить в расчёте 1000 мкл реагента «Ли́ра» на $1 \cdot 10^{10}$ эукариотических клеток или $1 \cdot 10^8$ бактериальных клеток, 500 мкл реагента «Ли́ра» при выделении из менее $1 \cdot 10^6$ клеток. Объём «Ли́ры» должен быть не менее чем в 10 раз больше объёма суспензии.

Важно: при выделении РНК из грамположительных бактерий добавить 30 мкл раствора лизоцима (50 мг/мл) в ТЕ буфере (0.01 М Tris-HCl (pH 8.0), 0.001 М EDTA).

1б. Клеточный монослой.

1.1б. Удалить среду. К клеточному монослою добавить реагент «Ли́ра» в количестве достаточном, чтобы покрыть всю площадь (ориентировочно 1 мл «Ли́ры» на 10 см^2). Провести лизис клеток в течение 10 мин.

1.2б. Тщательно перемешать лизат пипетированием несколько раз. Перенести образец в чистую пробирку.

1в. Ткани животных и растений

1.1а. Гомогенизировать образец в 500-1000 мкл реагента «Ли́ра» до получения однородной смеси. После гомогенизации инкубировать образец 10 мин. При гомогенизации реагент должен полностью покрывать образец. Выделение проводить в расчёте 1000 мкл реагента «Ли́ра» на 50-100 мг образца, 500 мкл реагента «Ли́ра» при выделении из 10 мг и менее. Если гомогенизация проводится на автоматическом гомогенизаторе рекомендуется охлаждать образец на льду между циклами гомогенизации, а также перед тем как приступить к следующей стадии протокола.

Примечание: не рекомендуется использовать менее 500 мкл реагента «Ли́ра» для лизиса образца, т.к. могут возникнуть проблемы при отборе водной фазы (см. ниже раздел «разделение фаз») из-за её небольшого размера. Избыток реагента «Ли́ра» не приводит к снижению выхода РНК.

Стоп: на данной стадии возможно приостановить эксперимент. Лизат можно хранить при $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ не менее недели, если работу планируется продолжить в течение суток, образец можно хранить при $+4 \text{ }^\circ\text{C}$.

2. Центрифугировать лизат 10 мин, 10000 gcf.

Примечание: осаждается более 90% ДНК.

3. Перенести супернатант в чистую пробирку.



Разделение фаз

1. Добавить 1/5 объёма хлороформа от исходного объёма «Лиры» (200 мкл хлороформа на 1000 мкл «Лиры») к супернатанту (см. выше п. 3 раздела «лизис образца»). Плотно закрыть крышку.

Важно: убедиться, что крышка закрыта плотно, иначе хлороформ может вытечь при переворачивании пробирки.

2. Энергично встряхнуть пробирку в течение 15 с. Инкубировать 5 мин, периодически перемешивая вручную. При перемешивании должна образоваться однородная суспензия.

3. Центрифугировать 10 мин, 10000 гсф при +4 °С. После центрифугирования смесь разделится на нижнюю фазу (органическую), интерфазу и верхнюю фазу (водная).

Примечание: если центрифугирование проводить при комнатной температуре, то в конечном образце возможна примесь ДНК.

4. Аккуратно перенести водную фазу, содержащую РНК, (примерно половина общего объёма) в чистую пробирку. Не отбирать верхнюю фазу полностью, избегать захвата интерфазы и нижней фазы.

Нанесение образца на колонку.

Примечание: для выделения суммарной РНК продолжить работу по протоколу «Нанесение образца на колонку. Суммарная РНК», для выделения микроРНК и других малых РНК продолжить работу по протоколу «Нанесение образца на колонку. микроРНК».

Нанесение образца на колонку. Суммарная РНК

1. Подготовить колонку для нанесения образца.

2. К водной фазе (см. выше п.4 раздела «разделение фаз») добавить равный объём 96-99% этанола, перемешать пипетированием, нанести не более 700 мкл образца на колонку. Если образовался осадок, то его также нанести на колонку. Центрифугировать 30 с, 10000 гсф. Удалить фильтрат.

Примечание: если после центрифугирования часть раствора осталась на колонке, повторить центрифугирование увеличив время и/или скорость центрифугирования. Если объём образца больше 700 мкл, повторно нанести избыток на ту же колонку и повторить центрифугирование.

Нанесение образца на колонку. микроРНК

1. Подготовить колонку для нанесения образца.



2. К водной фазе (см. раздел «разделение фаз», п. 4) добавить равный 1/3 объёма 96-99% этанола (например, к 300 мкл водной фазы добавить 100 мкл этанола), перемешать пипетированием, нанести не более 700 мкл образца на колонку. Если образовался осадок, то его также нанести на колонку. Центрифугировать 30 с, 10000 gcf. Перенести фильтрат в чистую пробирку.

***Примечание:** если после центрифугирования часть раствора осталась на колонке, повторить центрифугирование увеличив время и/или скорость центрифугирования. Если объём образца больше 700 мкл, повторно нанести избыток на ту же колонку и повторить центрифугирование.*

3. Подготовить новую колонку для нанесения фильтрата.

4. К фильтрату из п. 2 добавить равный объём 96-99% этанола (например, к 400 мкл фильтрата добавить 400 мкл этанола). Нанести образец на колонку. Центрифугировать 30 с, 10000 gcf. Удалить фильтрат.

Промывка колонки после нанесения образца.

***Примечание:** протокол для промывки колонки одинаков для суммарной РНК и микроРНК.*

1. Нанести на колонку 500 мкл буфера для промывки WB. Центрифугировать 30 с, 10000 gcf. Удалить фильтрат.

***Примечание:** не забудьте предварительно добавить к буферу WB этанол.*

Необязательно. Повторно нанести на колонку 500 мкл буфера для промывки WB. Центрифугировать 30 с, 10000 gcf. Удалить фильтрат.

2. Центрифугировать колонку 3 мин, 10000 gcf для полного удаления буфера WB.

3. Перенести колонку в новую микроцентрифужную пробирку (не входит в состав набора) на 1.5-2 мл.

4. Аккуратно нанести на центр фильтра колонки 60 мкл буфера для элюции EB. Инкубировать 1 мин при комнатной температуре (15-25 °С). Центрифугировать 1 мин, 10000 gcf.

***Примечание:** для увеличения выхода РНК повторно провести элюцию новой порцией элюата. Повторное нанесение элюата на колонку также позволяет увеличить выход РНК, но в меньшей степени, чем в первом варианте, однако получается более концентрированный раствор РНК. Третья и последующие элюции незначительно увеличивают выход РНК (менее 10%). При элюции объёмом менее 60 мкл необходимо аккуратно наносить буфер на фильтр, иначе возможно снижение выхода РНК.*

Буфер для элюции – вода, очищенная от РНКаз.



Концентрация суммарной РНК, выделенной из $1 \cdot 10^6$ эукариотических клеток, после первой элюции в 60 мкл составляет около 100 нг/мкл.

8. Элюат, содержащий РНК, хранить при -20 °С.

Важно! Образец РНК может содержать малые примеси ДНК, поэтому перед использованием в ОТ-ПЦР рекомендуется провести обработку ДНКазой.

Анализ выделенной РНК.

Целостность выделенной геномной РНК можно проверить с помощью гель-электрофореза в 1% агарозном геле.

Количество выделенной РНК можно оценить с помощью УФ-спектрометрии.

Характерный максимум поглощения для РНК при $\lambda = 260$ нм.

Посчитать концентрацию РНК (мкг/мл) можно по следующей формуле:

$A_{260} \cdot \text{разбавление} \cdot 40$ мкг/мл.

Характерные соотношения оптической плотности $A_{260}/A_{280} \sim 1.7-2.0$.

ООО «Биолабмикс»
630090 г. Новосибирск,
Ул., Инженерная, 28
Тел.: +7 (383) 363-51-91
www.biolabmix.ru
sales@biolabmix.ru