

## **Информация о продукте**

### **Фенол, уравновешенный цитратным буфером (pH 4), для выделения РНК (PC-200)**

#### **Описание продукта**

Реагент предназначен для выделения РНК из различных биологических образцов (эукариотических или бактериальных клеток и др.). Реагент представляет собой прозрачный двухфазный раствор: нижняя фаза (органическая) содержит фенол, верхняя (водная) – цитратный буфер. Реагент служит для проведения фенол-хлороформной экстракции РНК из предварительно лизированного образца. РНК осаждается из водной фазы этанолом. Выделенная РНК содержит примесь ДНК, поэтому необходима обработка ДНКазой.

Состав цитратного буфера: 10 мМ цитрат натрия, pH 4.0.

#### **Меры предосторожности**

Осторожно! Реагент оказывает раздражающее и токсичное действие. При работе необходимо соблюдать правила общей и личной техники безопасности. Токсичен при попадании на кожу и внутрь. Вызывает ожоги.

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

#### **Материалы и оборудование необходимые для работы**

Центрифуга способная достигать скорости не менее 10000 g.

Полипропиленовые микроцентрифужные пробирки.

Вода, очищенная от РНКаз.

10% ратвор додецилсульфата натрия (ДСН).

Хлороформ.

Изопропанол.

Этанол, 70-80% раствор.

Ацетат натрия (3 М раствор)

## **Перед началом работы**

Перед использованием тщательно перемешать реагент, встряхнув бутылку (убедиться, что крышка плотно закрыта). Дать фазам разделиться в течение 2-4 ч при 15-25 °С. Для выделения РНК использовать только нижнюю фазу (органическая фаза). Верхняя фаза (водная фаза) предназначена для лучшего хранения реагента.

При уменьшении объёма нижней фазы в ходе использования реагента, можно удалить избыток верхней фазы для удобства использования.

## **Протокол выделения РНК**

Все стадии выделения проводить при 15-25 °С, если не оговорено особо.

***Примечание:** данный протокол является одним из возможных вариантов выделения РНК с применением фенола, уравновешенного цитратным буфером.*

1. Для выделения РНК из биологического материала необходимо провести полный лизис образца в течение 10 мин.

### **1а. Клеточная суспензия.**

Осадить клетки на центрифуге, удалить супернатант. Суспендировать  $5-10 \cdot 10^6$  эукариотических клеток или  $1 \cdot 10^7$  бактериальных клеток в 400 мкл воды, очищенной от РНКаз, затем добавить 50 мкл 10% раствора ДСН, 50 мкл 3 М ацетата натрия. Лизировать в течение 10 минут при периодическом перемешивании.

### **1б. Клеточный монослой.**

Удалить среду. К клеточному монослою добавить воду, очищенную от РНКаз, в количестве достаточном, чтобы покрыть всю площадь. 1 мл воды на 10 см<sup>2</sup>. Затем добавить 10% раствор ДСН до конечной концентрации 1% и 3 М ацетат натрия до конечной концентрации 0.3 М. Лизировать в течение 10-15 минут при периодическом перемешивании. Перенести лизат в чистую пробирку.

***Примечание:** рекомендуемый объём конечной смеси не менее 500 мкл. При меньших объёмах эффективность выделения не ухудшается, однако может быть сложно производить отбор водной фазы из-за её небольшого размера.*

2. Добавить равный объём смеси фенол/хлороформ в соотношении 1:1. Плотно закрыть крышку.

3. Энергично встряхнуть пробирку в течение 15 с. Инкубировать 5-10 мин, периодически перемешивая вручную, до образования однородной суспензии.
4. Центрифугировать 5 мин, 10000 г. После центрифугирования смесь разделится на нижнюю фазу (органическую), интерфазу и верхнюю фазу (водная)
5. Аккуратно перенести водную фазу (примерно половина общего объема) в чистую пробирку. Не отбирать верхнюю фазу полностью, избегать захвата интерфазы и нижней фазы.
6. К водной фазе добавить равный объем хлороформа. Плотнo закрыть крышку.
7. Повторить п. 3-5. 1 раз.
8. К водной фазе добавить равный объем изопропанола. Инкубировать 10 мин.

**Примечание:** при выделении РНК из малого количества образца, например, менее  $1 \cdot 10^6$  клеток, к водной фазе рекомендуется добавить 1/10-1/5 от объема водной фазы 3 М ацетата натрия или 10-20 мкг гликогена (при одновременном использовании ацетата натрия и гликогена добавлять каждый компонент последовательно, перемешивая смесь на каждом этапе). При этом пропорционально увеличить объем изопропанола.

9. Центрифугировать 5 мин, 10000 г.
10. Удалить супернатант, сбросить капли на центрифуге, аккуратно отобрать остатки супернатанта пипеткой.
11. К осадку добавить 0.5-1 мл 70-80% этанола. Аккуратно перевернуть пробирку 2-3 раза.

**Примечание:** на данном этапе можно приостановить эксперимент. РНК в 70% этаноле может храниться не менее 3 месяцев при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

12. Центрифугировать 5 мин, 10000 г.
13. Удалить супернатант, сбросить капли на центрифуге, аккуратно отобрать остатки супернатанта пипеткой.
14. Осадок сушить на воздухе в течение 10-15 мин.

**Важно:** не пересушивать осадок, иначе снизится растворимость РНК.

15. Суспендировать осадок в 50-500 мкл воды, очищенной от РНКаз.
16. Раствор РНК хранить при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**Примечание:** конечный продукт РНК содержит примесь ДНК. Для удаления ДНК рекомендуется провести обработку ДНКазой. После обработки ДНКазой

*добавить воду до суммарного объёма не менее 200 мкл, затем 1/10-1/5 объёма 3 M ацетата натрия. При работе с малыми количествами РНК для увеличения выхода добавить 10-20 мкг гликогена. Получившийся раствор смешать с равным объёмом изопропанола. После чего провести повторное осаждение РНК, п. 8-15.*

### **Анализ выделенной РНК.**

Целостность выделенной РНК можно проверить с помощью гель-электрофореза в 1-1.5% 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:

$A_{260} \cdot \text{разбавление} \cdot 40 \text{ мкг/мл} / \text{длина оптического пути (см)}$

Обычно длина оптического пути равна 1 см.

Характерные соотношения оптической плотности  $A_{260}/A_{280} \sim 1.7-2.0$ ,  $A_{260}/230 \geq 1.9$ .

ООО «Биолабмикс»  
630090 г. Новосибирск,  
Ул., Инженерная, 28  
Т/ф (383) 363-51-91  
<http://www.biolabmix.ru>