



Общество с ограниченной ответственностью

«Биолабмикс»

ИНН 5408278957 КПП 540801001

630090, Новосибирская обл., г. Новосибирск,

ул. Инженерная, дом № 28

Tel/Fax: +7(383)363-51-91, Tel: +7(383)363-22-40

E-mail: sales@biolabmix.ru

**Набор для выделения
суммарной РНК и микроРНК
из реагента «Ли́ра»
Руководство пользователя**

Кат. номер
LRU-100-50,
LRU-100-50-N

Оглавление

Оглавление	2
Описание	3
Особенности	4
Состав набора	4
Меры предосторожности	4
Материалы и оборудование необходимые для работы	5
Перед началом работы:	5
Протокол выделения РНК	6
Подготовка и лизис образца	6
1) Культуры эукариотических клеток. Монослойные культуры. Суспензия клеток.	6
2) Культуры эукариотических клеток. Монослойные культуры. Культуральные планшеты.	7
3) Культуры эукариотических клеток. Суспензионные культуры.	8
4) Культуры клеток бактерий. Грамотрицательные бактерии.	9
5) Культуры клеток бактерий. Грамположительные бактерии.	10
6) Ткани животных и растений	11
7.1) Биологические жидкости (цельная кровь, плазма, сыворотка, слюна и др.)	13
7.2) Суспензия клеток в стабилизаторе РНК и других аналогичных реагентах	13
8) Лейкоциты	14
Очистка лизата от ДНК	15
Разделение фаз	15
Протокол 1. Очистка суммарной РНК	16
Протокол 2. Очистка микроРНК	18
Анализ выделенной РНК	20
Дополнительные реагенты:	20
Условия хранения	20
Условия транспортировки	20

Набор для выделения суммарной РНК и микроРНК из реагента «Ли́ра»

Кат. номер LRU-100-50, LRU-100-50-N

Важно!

Мы постоянно совершенствуем протокол работы с набором, поэтому просьба использовать протокол, идущий в комплекте с набором. Последняя версия протокола доступна на сайте компании ООО «Биолабмикс» (www.biolabmix.ru). Наборы предназначены только для научно-исследовательских целей. Протокол обновлён 07.10.2024.

Описание

Набор предназначен для выделения и очистки суммарной РНК и малых форм РНК (до 200 н.т., включая микроРНК) из различных биологических образцов

1. культуры эукариотических и бактериальных клеток, лейкоциты;
2. ткани животных и растений;
3. биологические жидкости (цельная кровь, плазма, сыворотка, слюна и др.);
4. суспензия клеток в стабилизаторе РНК (St-100) и других аналогичных реагентах.

Набор сочетает методы фенол-хлороформной экстракции нуклеиновых кислот и их селективной сорбции на кремниевой мембране. Лизис образца происходит в реагенте «Ли́ра», содержащем фенол и тиоцианат гуанидина. 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 до 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.

Внимание! Лизис образцов для выделения суммарной РНК и микроРНК проводить по единому протоколу. Последующую очистку суммарной РНК проводить по протоколу 1, очистку микроРНК проводить по протоколу 2.

Особенности

Кат. номер LRU-100-50

Набор содержит реагент «Ли́ра», буферы для промывки колонки и элюции РНК, колонки для сорбции РНК.

Кат. номер LRU-100-50-N

Набор **НЕ содержит** реагент «Ли́ра». Набор содержит только буферы для промывки колонки и элюции РНК, колонки для сорбции РНК.

Важно! Для работы с набором необходимы реагент «Ли́ра» (кат. № LR-100, LR-200), или реагент «Лигр» (кат. № LRgr-100), или аналогичные фенол-гуанидиновые реагенты, протестированные для выделения РНК.

Состав набора

	LRU-100-50	LRU-100-50-N
Реагент «Ли́ра»	100 мл	НЕТ
Буфер для промывки WB (концентрат)	2x11 мл	2x11 мл
Буфер для элюции EB	15 мл	15 мл
Пробирки для сбора фильтрата с колонками для сорбции образца	100 шт	100 шт

Меры предосторожности

Осторожно! Реагент «Ли́ра» содержит фенол и тиоцианат гуанидина, 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 мощного средства (детергента). При необходимости покажитесь врачу.

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

Материалы и оборудование необходимые для работы

1) Набор кат. № LRU-100-50

- Центрифуга способная достигать скорости не менее 12000 rcf и температуры + 4 °С
- Микропробирки на 1.5-2.0 мл
- Хлороформ
- Этанол, 95-100% раствор
- **Опционально.** PBS
- **Опционально.** Лизоцим. Для выделения РНК, ДНК или белков из грамположительных бактерий

2) Набор кат. № LRU-100-50-N

- Реагент «Лира» (кат. № LR-100, LR-200), или реагент «Лигр» (кат. № LRgr-100), или аналогичные фенол-гуанидиновые реагенты, протестированные для выделения РНК;
- Материалы и оборудование аналогичные п. 1 (кат. № LRU-100-50).

Перед началом работы:

- **Подготовка буфера WB.**

- **1 промывка, 500 мкл WB.** К 100 мкл буфера WB (концентрат) добавить 400 мл этанола (95-100%), чтобы получить 10 мл буфера WB. Перемешать.

- **1 флакон.** К 11 мл буфера WB (концентрат) добавить 44 мл этанола (95-100%), чтобы получить 55 мл буфера WB. Перемешать.

После добавления этанола плотно закрывать крышку. Рекомендуется добавлять этанол к аликвоте раствора WB, поскольку при хранении буфера с этанолом в течение нескольких месяцев этанол может частично испариться.

Протокол выделения РНК

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

Важно! при использовании реагента «Лигр» выполнять протокол аналогично, как при работе с реагентом «Ли́ра».

Подготовка и лизис образца

Для выделения РНК из биологического материала необходимо провести полный лизис образца с использованием реагента «Ли́ра» в течение 10 мин. Ниже приведены ориентировочные соотношения реагента «Ли́ра» и количество образца.

1) Культуры эукариотических клеток. Монослойные культуры. Суспензия клеток.

1. Снять клетки с поверхности культурального пластика методом, используемым в лаборатории, или стандартным методом, рекомендуемым для данной культуры клеток.
2. Перенести образец суспензии клеток (не более $1 \cdot 10^7$ клеток) в одноразовую микропробирку.
3. Осадить клетки центрифугированием 3 мин, 1000 rcf. Аккуратно отобрать супернатант. Ресуспендировать осадок клеток в 50 мкл PBS.
4. Чистым одноразовым наконечником добавить 500–1000 мкл реагента «Ли́ра».
 - При использовании $1 \cdot 10^6$ и более клеток добавить 1000 мкл реагента «Ли́ра».
 - При использовании менее $1 \cdot 10^6$ достаточно 500 мкл реагента «Ли́ра».
 - При использовании менее 500 мкл реагента «Ли́ра» есть риск случайного смешивания фенольной и водной фаз при отборе из-за их малого объема. Избыток реагента не ухудшает выделение.
 - Объем реагента «Ли́ра» должен быть не менее чем в 10 раз больше объема суспензии.
5. Тщательно перемешать пипетированием или на вортексе до получения гомогенной суспензии. Сбросить капли коротким центрифугированием.
6. Инкубировать 10 мин.
7. Далее перейдите к «Разделение фаз» или к «Опционально. Очистка лизата от ДНК».

Стоп: на данной стадии возможно приостановить эксперимент. Лизат можно хранить при -20 °С не менее недели, если работу планируется продолжить в течение суток, образец можно хранить при +4 °С.

2) Культуры эукариотических клеток. Монослойные культуры. Культуральные планшеты.

Ориентировочно 1 мл реагента «Лиры» достаточно на 10 см². Реагент должен полностью покрывать дно культуральной посуды. При необходимости увеличить объём реагента.

При работе с 12-, 24- или 96-луночными планшетами или с культуральной посудой с аналогичной площадью ячейки допускается лизис непосредственно в лунке.

1. Удалить культуральную среду из лунки планшета
2. В лунку 12- или 24-луночного планшета добавить 500 мкл реагента «Лири», В лунку 96-луночного планшета добавить 100 мкл реагента «Лири».
3. Инкубировать 10 минут.
4. Аккуратно, избегая пенообразования, перемешать содержимое лунки пипетированием, убедиться, что клетки открепилась от ячейки или дна культуральной посуды. При необходимости увеличить время инкубации.
5. Перенести образец в чистую пробирку. Добавить дополнительную аликвоту реагента «Лири» к образцам, если требуется.
 - При использовании $1 \cdot 10^6$ и более клеток добавить реагент «Лири» до общего объёма 1000 мкл.
 - При использовании менее $1 \cdot 10^6$ добавить реагент «Лири» до общего объёма 500 мкл.
 - При использовании менее 500 мкл реагента «Лири» есть риск случайного смешивания фенольной и водной фаз при отборе из-за их малого объёма. Избыток реагента не ухудшает выделение.
6. Далее перейдите к «Разделение фаз» или к «Опционально. Очистка лизата от ДНК».

Стоп: на данной стадии возможно приостановить эксперимент. Лизат можно хранить при -20 °C не менее недели, если работу планируется продолжить в течение суток, образец можно хранить при +4 °C.

3) Культуры эукариотических клеток. Суспензионные культуры.

1. Перенести образец суспензии клеток (не более $1 \cdot 10^7$ клеток) в одноразовую микропробирку.
2. Осадить клетки центрифугированием 3 мин, 1000 rcf. Аккуратно отобрать супернатант. Ресуспендировать осадок клеток в 50 мкл PBS.
3. Чистым одноразовым наконечником добавить 500–1000 мкл реагента «Лира».
 - При использовании $1 \cdot 10^6$ и более клеток добавить 1000 мкл реагента «Лира».
 - При использовании менее $1 \cdot 10^6$ достаточно 500 мкл реагента «Лира».
 - При использовании менее 500 мкл реагента «Лира» есть риск случайного смешивания фенольной и водной фаз при отборе из-за их малого объема. Избыток реагента не ухудшает выделение.
 - Объем реагента «Лира» должен быть не менее чем в 10 раз больше объема суспензии.
4. Тщательно перемешать пипетированием или на вортексе до получения гомогенной суспензии. Сбросить капли коротким центрифугированием.
5. Инкубировать 10 мин.
6. Далее перейдите к «Разделение фаз» или к «Опционально. Очистка лизата от ДНК».

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 $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4) Культуры клеток бактерий. Грамотрицательные бактерии.

1. Перенести 0.5–2 мл суспензии ночной культуры клеток (не более $1 \cdot 10^8$ клеток) в одноразовую микропробирку.
2. Осадить клетки центрифугированием 1 мин, 10000 гcf. Аккуратно отобрать супернатант. Ресуспендировать осадок клеток в 50 мкл PBS.
3. Чистым одноразовым наконечником добавить 1000 мкл реагента «Лира».
 - Объём реагента «Лира» должен быть не менее чем в 10 раз больше объёма суспензии.
4. Тщательно перемешать пипетированием или на вортексе до получения гомогенной суспензии. Сбросить капли коротким центрифугированием.
5. Инкубировать 10 мин.
6. Далее перейдите к «Разделение фаз» или к «Опционально. Очистка лизата от ДНК».

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 $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5) Культуры клеток бактерий. Грамположительные бактерии.

Подготовка раствора лизоцима:

- Предварительно подготовить буфер для растворения лизоцима
 - 50 мМ Tris-HCl (pH 8), 10 мМ EDTA (pH 8), 50% глицерин
Примечание: в данном буфере раствор лизоцима возможно хранить не менее 6 месяцев при -20 °С.
 - 50 мМ Tris-HCl (pH 8), 10 мМ EDTA (pH 8)
Примечание: в данном буфере раствор лизоцима возможно хранить не более 1 недели при +4 °С.
- К навеске лизоцима чистым одноразовым наконечником добавить необходимый объём буфера для растворения лизоцима, чтобы получить раствор 50 мг/мл.
- Тщательно перемешать на вортексе.
- Инкубировать 30 мин при Tкомн (15-25 °С), периодически перемешивая до полного растворения лизоцима.

Примечание: лизоцим не входит в набор.

Подготовка и лизис бактерий:

1. Перенести 0.5-2 мл суспензии ночной культуры клеток (не более $1 \cdot 10^8$ клеток) в одноразовую микропробирку.
2. Осадить клетки центрифугированием 1 мин, 10000 gcf. Аккуратно отобрать супернатант.
3. Ресуспендировать осадок клеток в 50 мкл PBS пипетированием.
4. Чистым одноразовым наконечником добавить 30 мкл раствора лизоцима (50 мг/мл).
5. Перемешать образец на вортексе 5-10 с. Сбросить капли коротким центрифугированием. Инкубировать 10 мин при Tкомн (15-25°C).
6. Чистым одноразовым наконечником добавить 1000 мкл реагента «Лира».
 - Объём реагента «Лира» должен быть не менее чем в 10 раз больше объёма суспензии.
7. Тщательно перемешать пипетированием или на вортексе до получения гомогенной суспензии. Сбросить капли коротким центрифугированием.
8. Инкубировать 10 мин.
9. Далее перейдите к «Разделение фаз» или к «Опционально. Очистка лизата от ДНК».

Стоп: на данной стадии возможно приостановить эксперимент. Лизат можно хранить при -20 °С не менее недели, если работу планируется продолжить в течение суток, образец можно хранить при +4 °С.

6) Ткани животных и растений

Внимание! Сохранность РНК зависит от условий сбора и хранения образцов тканей. Для длительного хранения рекомендуется использовать Стабилизатор РНК (Кат. № St-100) и аналогичные реагенты, обеспечивающие сохранность РНК при длительном хранении.

Внимание! Рекомендуется использовать одноразовую систему гомогенизации либо провести полное удаление образца из системы гомогенизации после работы, чтобы избежать загрязнения последующих проб.

Внимание! Выход РНК сильно зависит от качества гомогенизации образца. Если возможно, рекомендуется добиться получения однородной суспензии образца.

- **Гомогенизация с использованием жидкого азота**

Внимание! При использовании данного метода гомогенизации реагент «Лира» добавляется к образцу ткани после гомогенизации.

1. Поместить навеску образца ткани животных (10–100 мг) или ткани растений (50–100 мг) в чистую пробирку.
2. Тщательно измельчить образец в ступке с помощью одноразового пестика.
3. Перенести измельчённый образец в жидком азоте в одноразовую микропробирку на 1.5 мл.
4. Подождать, пока азот испарится, но не допускать того, чтобы ткань начала таять. Добавить 1000 мкл реагента «Лира».
5. После гомогенизации инкубировать образец 10 мин.
6. Далее перейдите к «Разделение фаз» или к «Опционально. Очистка лизата от ДНК».

- **Гомогенизация с использованием механического гомогенизатора**

1. Поместить навеску образца ткани животных (10–100 мг) или ткани растений (50–100 мг) в чистую пробирку.
2. К образцу ткани добавить 1000 мкл реагента «Лира».
3. Провести гомогенизацию образца. Измельчить используя механический гомогенизатор тканей, например, FastPrep-24™ 5G (MP Biomedicals), TissueRuptor II (QIAGEN).

Примечание: рекомендуется охлаждать образец на льду между циклами гомогенизации.

4. После гомогенизации инкубировать образец 10 мин.
5. Далее перейдите к «Разделение фаз» или к «Опционально. Очистка лизата от ДНК».

- **Гомогенизация с использованием одноразовых пестиков для микропробирок**

1. Поместить навеску образца ткани животных (10–100 мг) или ткани растений (50–100 мг) в чистую пробирку.
2. К образцу ткани добавить 500 мкл реагента «Лира».

3. Тщательно перетереть образец пестиков.

Примечание: одноразовые, стерильные пестики представлена в каталоге (Кат. № pest-10).

4. После гомогенизации добавить дополнительно 500 мкл реагента «Лира», инкубировать образец 10 мин.

5. Далее перейдите к «**Разделение фаз**» или к «**Опционально. Очистка лизата от ДНК**».

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 $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

7.1) Биологические жидкости (цельная кровь, плазма, сыворотка, слюна и др.)

1. Поместить в чистую пробирку 100–200 мкл образца крови, плазмы, слюны, или другого образца.

Опционально. При наличии крупных примесей провести механическую гомогенизацию образца с использованием механического гомогенизатора или одноразовых пестиков (см. раздел (б) «Ткани животных и растений»).

2. Добавить 4 объёма реагента «Ли́ра» на 1 объём образца.

Пример. При объёме образца 100 мкл добавить 400 мкл реагента «Ли́ра», при объёме образца 200 мкл – 800 мкл реагента «Ли́ра».

3. Тщательно перемешать пипетированием или на вортексе до получения гомогенной суспензии. Сбросить капли коротким центрифугированием.

4. Инкубировать 10 мин.

5. Далее перейдите к «Разделение фаз» или к «Опционально. Очистка лизата от ДНК».

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 $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

7.2) Суспензия клеток в стабилизаторе РНК и других аналогичных реагентах

1. Поместить в чистую пробирку 100–200 мкл образца суспензии клеток в стабилизаторе РНК (St-100), других аналогичных реагентах, в физрастворе, PBS и др.

- Не использовать более $5\text{--}10\cdot 10^6$ эукариотических клеток или $1\text{--}10\cdot 10^7$ (или 0.5–2 мл ночной культуры) бактериальных клеток на 800 мкл реагента «Ли́ра».

2. Добавить 4 объёма реагента «Ли́ра» на 1 объём образца.

Пример. При объёме образца 100 мкл добавить 400 мкл реагента «Ли́ра», при объёме образца 200 мкл – 800 мкл реагента «Ли́ра».

3. Тщательно перемешать пипетированием или на вортексе до получения гомогенной суспензии. Сбросить капли коротким центрифугированием.

4. Инкубировать 10 мин.

5. Далее перейдите к «Разделение фаз» или к «Опционально. Очистка лизата от ДНК».

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 $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

8) Лейкоциты

1. Подготовить осадок лейкоцитов, использовать не более 1–2 мл свежей крови.
Ресуспендировать осадок в 50 мкл PBS.

Важно! Для подготовки осадка лейкоцитов использовать только свежую незамороженную кровь. В зависимости от образца, условий транспортировки и других факторов образец крови можно хранить сутки при +4 °С.

Примечание: для подготовки осадка лейкоцитов можно использовать Буфер для лизиса эритроцитов RBC (Кат. № RBC-120, RBC-5x120, RBC-10x-50).

2. Чистым одноразовым наконечником добавить 1000 мкл реагента «Лира» к суспензии лейкоцитов.
3. Тщательно перемешать пипетированием или на вортексе до получения гомогенной суспензии. Сбросить капли коротким центрифугированием.
4. Инкубировать 10 мин.
5. Далее перейдите к «**Разделение фаз**» или к «**Опционально. Очистка лизата от ДНК**».

Стоп: на данной стадии возможно приостановить эксперимент. Лизат можно хранить при -20 °С не менее недели, если работу планируется продолжить в течение суток, образец можно хранить при +4 °С.

Очистка лизата от ДНК

1. Центрифугировать лизат 10 мин, 10000 rcf при +4 °С.

Примечание: осаждается более 90% ДНК.

2. Перенести супернатант в чистую пробирку.

Стоп: на данной стадии возможно приостановить эксперимент. Лизат можно хранить при -20 °С не менее недели, если работу планируется продолжить в течение суток, образец можно хранить при +4 °С.

Разделение фаз

1. Добавить 1/5 объёма хлороформа от исходного объёма лизата (при работе с жидкими образцами) или реагента «Ли́ра», использованного для лизиса (при работе с осадками клеток и фрагментами тканей). Плотно закрыть крышку.

Пример. Например, добавить 200 мкл хлороформа на 1000 мкл лизата или реагента «Ли́ра».

Важно! Убедиться, что крышка закрыта плотно, иначе хлороформ может вытечь при переворачивании пробирки.

Примечание: избыток хлороформа не ухудшает разделение фаз.

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 rcf 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, в чистую пробирку.

Важно: не отбирать водную фазу полностью. Избегать захвата интерфазы и нижней фазы.

Примечание: объём отбираемой водной фазы должен быть не более 40% от общего объёма. Например, при объёме реагента «Ли́ра» 1000 мкл, объёме хлороформа 200 мкл, рекомендуется отбирать водную фазу объёмом не более 400–500 мкл.

5. Далее перейдите к «Очистка суммарной РНК» или «Очистка микроРНК».

Выделение суммарной РНК	Выделение микроРНК
Протокол 1 Очистка суммарной РНК	Протокол 2 Очистка микроРНК

Протокол 1. Очистка суммарной РНК

1) Нанесение на колонку

1. Подготовить колонку для нанесения образца.
2. К водной фазе (см. «Разделение фаз») добавить равный объём 95–100% этанола. Перемешать пипетированием, нанести не более 800 мкл образца на колонку. Если образовался осадок, то его также нанести на колонку.
3. Центрифугировать 30 с, 10000 gcf при 15–25 °С. Удалить фильтрат.

Примечание: если после центрифугирования часть раствора осталась на колонке, повторить центрифугирование, увеличив время и/или скорость центрифугирования.

Примечание: если объём образца более 800 мкл, повторно нанести избыток на ту же колонку и повторить центрифугирование.

2) Промывка колонки

1. Нанести на колонку 500 мкл буфера для промывки WB. Центрифугировать 30 с, 10000 gcf при 15–25 °С. Удалить фильтрат.

Примечание: не забудьте предварительно добавить к буферу WB этанол.

2. Повторно нанести на колонку 500 мкл буфера WB. Центрифугировать 30 с, 10000 gcf при 15–25 °С. Удалить фильтрат.
3. Центрифугировать колонку 3 мин, 10000 gcf при 15–25 °С для полного удаления буфера WB.

3) Элюция суммарной РНК

1. Перенести колонку в новую микропробирку на 1.5–2 мл (не входит в состав набора). Плотно прижать колонку к пробирке.
2. Нанести на центр фильтра колонки от 60 до 200 мкл буфера для элюции EB. Инкубировать 1 мин при комнатной температуре (15–25 °С). Центрифугировать 1 мин, 10000 gcf.
 - **Важно!** Рекомендуемый объём элюции 100 мкл. При элюции меньшим объёмом требуется аккуратно наносить аликвоту буфера на центр фильтра колонки, иначе возможно снижение выхода РНК.
 - При элюции РНК в 100–200 мкл выход РНК выше на 10–30%, чем при элюции в 60 мкл.
 - Повторная элюция новой аликвотой буфера для элюции EB или элюатом позволяет увеличить выход РНК на 10–30%. При элюции объёмом менее 100 мкл рекомендуется использовать новую аликвоту буфера для элюции. При элюции объёмом 100 мкл и более допускается повторно нанести элюат на колонку.
 - Буфер для элюции – вода, очищенная от РНКаз.
3. Элюат, содержащий РНК, хранить при –20 °С.

Опционально. Провести обработку выделенной РНК ДНКазой. При использовании термостабильной ДНКазы (Кат. № EM-100, EM-250, EM-1250, ООО «Биолабмикс»)

для полного удаления ДНК достаточно использовать 0.1 ед. на 1 мкг полученного раствора РНК.

Примечание: более 90% ДНК удаляется в процессе выделения и обработка ДНКазой может не требуется в зависимости от дальнейшего использования РНК. Однако дальнейшее удаление ДНК может быть необходимо для некоторых приложений чувствительных к очень малым количествам ДНК.

Протокол 2. Очистка микроРНК

1) Нанесение на колонку. Очистка от длинных РНК

1. Подготовить колонку для нанесения образца.

2. К водной фазе (см. «Разделение фаз») добавить 1/3 объёма 95–100% этанола.

Перемешать пипетированием, нанести не более 800 мкл образца на колонку.

Если образовался осадок, то его также нанести на колонку.

Примечание: например, при объёме водной фазы 400 мкл добавить 130 мкл этанола.

3. Центрифугировать 30 с, 10000 гcf при 15–25 °С. Перенести фильтрат в чистую пробирку.

Примечание: если после центрифугирования часть раствора осталась на колонке, повторить центрифугирование, увеличив время и/или скорость центрифугирования.

Примечание: если объём образца более 800 мкл, повторно нанести избыток на ту же колонку и повторить центрифугирование.

4. Подготовить новую колонку для нанесения фильтрата.

5. К фильтрату добавить равный объём 95–100% этанола. Перемешать пипетированием, нанести не более 800 мкл образца на колонку. Если образовался осадок, то его также нанести на колонку.

Примечание: например, при объёме водной фазы 400 мкл, объёме первой аликвоты этанола 130 мкл суммарный объём составит 530 мкл. К фильтрату добавить 530 мкл этанола.

6. Центрифугировать 30 с, 10000 гcf при 15–25 °С. Перенести фильтрат в чистую пробирку.

Примечание: если после центрифугирования часть раствора осталась на колонке, повторить центрифугирование, увеличив время и/или скорость центрифугирования.

Примечание: если объём образца более 800 мкл, повторно нанести избыток на ту же колонку и повторить центрифугирование.

3) Промывка колонки

1. Нанести на колонку 500 мкл буфера для промывки WB. Центрифугировать 30 с, 10000 гcf при 15–25 °С. Удалить фильтрат.

Примечание: не забудьте предварительно добавить к буферу WB этанол.

2. Повторно нанести на колонку 500 мкл буфера WB. Центрифугировать 30 с, 10000 гcf при 15–25 °С. Удалить фильтрат.

3. Центрифугировать колонку 3 мин, 10000 гcf при 15–25 °С для полного удаления буфера WB.

4) Элюция микроРНК

1. Перенести колонку в новую микропробирку на 1.5–2 мл (не входит в состав набора). Плотно прижать колонку к пробирке.

2. Нанести на центр фильтра колонки от 60 до 200 мкл буфера для элюции EB. Инкубировать 1 мин при комнатной температуре (15–25 °С). Центрифугировать 1 мин, 10000 rcf.

- **Важно!** Рекомендуемый объём элюции 100 мкл. При элюции меньшим объёмом требуется аккуратно наносить аликвоту буфера на центр фильтра колонки, иначе возможно снижение выхода РНК.
- При элюции РНК в 100–200 мкл выход РНК выше на 10–30%, чем при элюции в 60 мкл.
- Повторная элюция новой аликвотой буфера для элюции EB или элюатом позволяет увеличить выход РНК на 10–30%. При элюции объёмом менее 100 мкл рекомендуется использовать новую аликвоту буфера для элюции. При элюции объёмом 100 мкл и более допускается повторно нанести элюат на колонку.
- Буфер для элюции – вода, очищенная от РНКаз.

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

Опционально. Провести обработку выделенной РНК ДНКазой. При использовании термолабильной ДНКазы (Кат. № EM-100, EM-250, EM-1250, ООО «Биолабмикс») для полного удаления ДНК достаточно использовать 0.1 ед. на 1 мкг полученного раствора РНК.

Примечание: более 90% ДНК удаляется в процессе выделения и обработка ДНКазой может не требуется в зависимости от дальнейшего использования РНК. Однако дальнейшее удаление ДНК может быть необходимо для некоторых приложений чувствительных к очень малым количествам ДНК.

Анализ выделенной РНК

Целостность выделенной 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 $A_{260}/A_{280} \sim 1.7-2.0$.

Дополнительные реагенты:

Реагенты для выделения НК

- Стерильные пестики для гомогенизации образцов тканей в микропробирках (Кат. № pest-10).
- Стабилизатор РНК (Кат. № St-100).
- Буфер для лизиса эритроцитов RBC (Кат. № RBC-120, RBC-5x120, RBC-10x-50).
- Реагент «Лира» (Кат. № LR-100, LR-200).
- Реагент «Лигр» (Кат. № LRgr-100).

Реагенты для электрофореза

- Буферы для электрофореза в агарозном геле: трис-ацетатный буфер (Кат. № BE-DNA-500, BE-DNA-1000), трис-боратный буфер (Кат. № TBE-500).
- Раствор бромистого этидия (Кат. № EtBr-10) для визуализации НК.
- Буферы для внесения образцов ДНК и РНК в гель (Кат. № D-3001, D-3002, D-3003).

Ферменты для выделения НК

- Термолабильная ДНКаза, 2 ед/мкл (Кат. № EM-100, EM-250, EM-1250).
- Протеиназа К (Кат. № EP-1200).

Условия хранения

Набор для выделения РНК хранить при комнатной температуре (15–25 °С). Реагент «Лира» хранить при 2–8 °С. Срок годности см. на упаковке.

Условия транспортировки

Транспортировку набора производить при температуре от +15 до +25 °С. Допускается транспортировка при температуре не выше +25 °С в течение 14 суток.