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 «Лира» (клетки, ткани)

Кат. номер LRU-100-50

Важно!
Мы постоянно совершенствуем протокол работы с реагентом, поэтому просьба использовать протокол, идущий в комплекте с продуктом.
Протокол обновлён 07.12.2023.

Описание

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 «Лира», 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 (стр. 5), очистку микроРНК проводить по протоколу 2 (стр. 6).

Состав набора

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

Меры предосторожности

Осторожно! Реагент «Лира» 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 моющего средства (детергента). При необходимости покажитесь врачу.

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

Материалы и оборудование необходимые для работы

- Центрифуга способная достигать скорости не менее 10000 rcf
- Полипропиленовые микроцентрифужные пробирки на 1.5-2 мл
- Хлороформ
- Этанол, 95-100% раствор
- **Опционально.** Лизоцим, для выделения РНК из грамположительных бактерий

Перед началом работы:

- **Подготовка буфера WB**
- **1 промывка, 500 мкл WB**. К 100 мкл буфера WB (концентрат) добавить 400 мкл 95-100% этанола.
- **1 флакон.** К 11 мл буфера WB (концентрат) добавить 44 мл 95-100% этанола, чтобы получить 55 мл буфера WB.

Рекомендуется добавлять этанол к аликвоте буфера WB2, 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 TE буфере (0.01 M Tris-HCl, 0.001 M EDTA, pH 8.0).

Протокол выделения РНК

1) Подготовка и лизис образцов

- Клеточная суспензия

1. Осадок клеток ресуспендировать в 50 мкл PBS.

Примечание: не использовать более $10*10^6$ клеток млекопитающих или лимфоцитов и более $1*10^8$ клеток бактерий.

Примечание: при выделении РНК из грамположительных бактерий добавить 30 мкл раствора лизоцима (50 мг/мл) в ТЕ буфере (0.01 М Tris-HCl, 0.001 М EDTA, pH 8.0). Инкубировать 10 мин при Ткомн (15-25^{0}С).

2. Чистым одноразовым наконечником добавить 500-1000 мкл реагента «Лира».

Примечание: 1000 мкл реагента «Лира» при использовании более $1*10^6$ эукариотических клеток или $1*10^7$ бактериальных клеток, 500 мкл реагента «Лира» при использовании менее $1*10^6$ эукариотических клеток или $1*10^7$ бактериальных клеток. Не использовать менее 500 мкл реагента «Лира». Избыток реагента не ухудшает выделение.

Примечание: Объём реагента «Лира» должен быть не менее чем в 10 раз больше объёма суспензии.

3. Перемешать образец на вортексе 5-10 с или пипетированием.
4. Сбросить капли коротким центрифугированием.
5. Инкубировать 10 мин при 15-25ºС.

- Клеточный монослой

1. Удалить среду. К клеточному монослою добавить реагент «Лира» в количестве достаточном, чтобы покрыть всю площадь (ориентировочно 1000 мкл «Лиры» на 10 см^2). Инкубировать 10 мин при 15-25ºС.
2. Тщательно перемешать лизат пипетированием несколько раз. Перенести образец в чистую пробирку.

- Ткани животных и растений

1. Гомогенизировать образец в 500-1000 мкл реагента «Лира» до получения однородной смеси. Для обеспечения лучшей сохранности РНК гомогенизацию лучше проводить на льду или при +4 °С

Примечание: при гомогенизации реагент должен полностью покрывать образец.

Примечание: для обеспечения лучшей сохранности РНК гомогенизацию рекомендуется проводить на льду или при +4 °С. 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: 1000 мкл реагента «Лира» при использовании 10-100 мг образца, 500 мкл реагента «Лира» при использовании менее 10 мг образца. Не использовать менее 500 мкл реагента «Лира». Избыток реагента «Лира» не приводит к снижению выхода РНК.

2. Инкубировать 10 мин при 15-25ºС.

Стоп: на данной стадии возможно приостановить эксперимент. Лизат можно хранить при -20^{0}С не менее недели, если работу планируется продолжить в течение суток, образец можно хранить при +4^{0}С.

2) Очистка образца 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^{0}С не менее недели, если работу планируется продолжить в течение суток, образец можно хранить при +4^{0}С.

3) Разделение фаз

1. Добавить 1/5 объёма хлороформа от исходного объёма «Лиры» (200 мкл хлороформа на 1000 мкл «Лиры») к супернатанту (этап «очистка образца от ДНК»). 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 rcf при +4 ^{0}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.

Важно: не отбирать водную фазу полностью.

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

Протокол 1. Очистка суммарной РНК

1) Нанесение на колонку
    1. Подготовить колонку для нанесения образца.
    2. К водной фазе (см. выше этап «Разделение фаз») добавить равный объём 96-99% 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 rcf при 15-25 ºС. Удалить фильтрат.

Примечание: если после центрифугирования часть раствора осталась на колонке, повторить центрифугирование, увеличив время и/или скорость центрифугирования. 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 rcf при 15-25 ºС. Удалить фильтрат.

Примечание: не забудьте предварительно добавить к буферу WB этанол.
Необязательно. Повторно нанести на колонку 500 мкл буфера WB. Центрифугировать 30 с, 10000 rcf при 15-25 ºС. Удалить фильтрат.

    2. Центрифугировать колонку 3 мин, 10000 rcf при 15-25 ºС 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 60 мкл буфера для элюции EB. Инкубировать 1 мин при комнатной температуре (15-25 ^{0}C).
    3. Центрифугировать 1 мин, 10000 rcf при 15-25 ºС.

- При увеличении объёма элюции увеличивается количество РНК и снижается концентрация РНК.
- Вторая элюция новой аликвотой буфера для элюции EB или повторное нанесение элюата на колонку позволяет дополнительно увеличить количество РНК.
- Буфер для элюции – вода, очищенная от РНКаз.

    4. 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 0.05 ед. на 1 мкг полученного раствора РНК.

Протокол 2. Очистка микроРНК

1) Нанесение на колонку

1. Подготовить колонку для нанесения образца.
2. К водной фазе (см. выше этап «Разделение фаз») добавить 1/3 объёма 96-99% 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 rcf при 15-25 ºС. 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 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 96-99% 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 мклк, объёме первой аликвоты этанола 130 мкл суммарный объём составит 530 мкл. К фильтрату добавить 530 мкл этанола.

Примечание: если после центрифугирования часть раствора осталась на колонке, повторить центрифугирование увеличив время и/или скорость центрифугирования. 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 rcf при 15-25 ºС. Удалить фильтрат.

Примечание: не забудьте предварительно добавить к буферу WB этанол.

Необязательно. Повторно нанести на колонку 500 мкл буфера WB. Центрифугировать 30 с, 10000 rcf при 15-25 ºС. Удалить фильтрат.

2. Центрифугировать колонку 3 мин, 10000 rcf при 15-25 ºС 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 60 мкл буфера для элюции EB. Инкубировать 1 мин при комнатной температуре (15-25 ^{0}C).
3. Центрифугировать 1 мин, 10000 rcf при 15-25 ºС.

- При увеличении объёма элюции увеличивается количество РНК и снижается концентрация РНК.
- Вторая элюция новой аликвотой буфера для элюции EB или повторное нанесение элюата на колонку позволяет дополнительно увеличить количество РНК.
- Буфер для элюции – вода, очищенная от РНКаз.

4. 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 0.05 ед. на 1 мкг полученного раствора РНК.

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 λ = 260 нм.

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

A_{260} * разбавление * 40 мкг/мл.

Характерные соотношения оптической плотности A_{260}/A_{280} ~1.7-2.0.

В каталоге ООО «Биолабмикс» представлены реагенты для проведения агарозного гель-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).

Условия хранения:

Набор для выделения РНК LRU-100-50 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.