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 R-Plants для выделения РНК из растений

Кат. номер: R-Plants-10, R-Plants-50, R-Plants-250

Важно!

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

Наборы предназначены только для научно-исследовательских целей.

Протокол обновлён 04.10.2023.

Описание продукта

Набор предназначен для выделения и очистки РНК из следующих образцов:

1. Листья, хвоя, тычинки, зелёные части растений
2. Плоды, ягоды, семена
3. Мхи, лишайники, грибы
4. Одноклеточные водоросли

Принцип действия набора основан на селективной сорбции нуклеиновых кислот из предварительно лизированного образца на мембране из диоксида кремния, последующей промывке и элюции очищенного продукта. В процессе выделения целостность РНК сохраняется. Целостность выделяемой РНК зависит от условий хранения, получения и типа образца. При работе с коллекционными образцами либо с образцами с высокой стадией деградации возможно выделение лишь фрагментированной РНК из-за её деградации в таких образцах.

Для гомогенизации образцов тканей могут быть использованы одноразовые, стерильные пестики (Кат. № pest-10), которые присутствуют в каталоге ООО «Биолабмикс». Пестики не входят в состав набора.

Важно! Выделенная РНК содержит примесь ДНК. При использовании РНК в приложениях, чувствительных к наличию ДНК, например, ПЦР (ОТ-ПЦР) обязательна обработка ДНКазой. ДНКаза не входит в состав набора, фермент присутствует в каталоге ООО «Биолабмикс» отдельной позицией (Кат. № EM-100, EM-250, EM-1250).

Состав набора

	R-Plants-10 10 выделений	R-Plants-50 50 выделений	R-Plants-250 250 выделений ВАРИАНТ 1	R-Plants-250 250 выделений ВАРИАНТ 2
Буфер для лизиса LB	10 мл	50 мл	4x60 мл	3x80 мл
Буфер для нанесения на колонку BB	10 мл	50 мл	4x60 мл	3x80 мл
Буфер для промывки WB1	6 мл	30 мл	3x50 мл	2x75 мл
Буфер для промывки WB2 (концентрат)	1.1 мл	6 мл	3x10 мл	2x15 мл
Буфер для элюции EB	5 мл	15 мл	60 мл	60 мл
Пробирки для сбора фильтрата и колонками для сорбции образца	10 шт.	50 шт.	250 шт.	250 шт.

Набор R-Plants-250 поставляется в одном из двух вариантов

Меры предосторожности

Осторожно! Буферы BB, WB1 содержат изопропанол, оказывающий раздражающее и токсичное действие. Не проводить работы с раствором в непосредственной близости от открытого огня. При попадании на кожу промойте немедленно большим количеством воды и моющего средства (детергента). При необходимости обратитесь за медицинской помощью.

Эксплуатация

Компоненты: LB, BB, WB1, WB2, EB стабильны после вскрытия флаконов при температуре от +15°C до +25°C в течение всего срока годности при условии достаточной герметизации флаконов

Внимание! Не нагревать набор выше температуры +25°C, несоблюдение температурного режима хранения и транспортировки снижает эффективность выделения и сохранности выделяемой РНК.

Условия работы

Температура окружающей среды от +15 до +25 °C;

Относительная влажность воздуха не более 80%;

Атмосферное давление 630 – 800 мм. рт. ст.

Оборудование и материалы, не входящие в набор

- Центрифуга для микропробирок на 1.5-2 мл, скорость 12000 rcf;
- Вортекс;
- Одноканальные дозаторы переменного объёма и наконечники для них;
- Перчатки резиновые;
- Микропробирки на 1.5 мл;
- Этанол, 96-100% раствор;
- β-меркаптоэтанол, 14.3 М раствор (коммерчески доступный раствор обычно имеет концентрацию 14.3 М);
- 2 М раствор дитиотреитола (DTT);
- Лёд, ледяная баня (2-10^{0}C).

Перед началом работы

- Подготовка буфера WB2

- 1 выделение, 500 мкл WB2.
  К 100 мкл буфера WB2 (концентрат) добавить 400 мкл этанола.
- 10 выделений.
  К 1.1 мл буфера WB2 (концентрат) добавить 4.4 мл этанола, чтобы получить 5.5 мл буфера WB2.
- 50 выделений.
  К 6 мл буфера WB2 (концентрат) добавить 24 мл этанола, чтобы получить 30 мл буфера WB2.
- 250 выделений. Вариант 1.
  К 10 мл буфера WB2 (концентрат) добавить 40 мл этанола, чтобы получить 50 мл буфера WB2.
- 250 выделений. Вариант 2.
  К 15 мл буфера WB2 (концентрат) добавить 60 мл этанола, чтобы получить 75 мл буфера WB2.

Рекомендуется добавлять этанол к аликвоте буфера WB2, поскольку при хранении буфера с этанолом в течение нескольких месяцев этанол может частично испариться.

Протокол выделения РНК

1) Подготовка образцов

Внимание! При работе с высушенными образцами необходимо учитывать каким способом был подготовлен материал. В случае работы с коллекционными и старыми экземплярами возможно снижение количества и качества выделяемой РНК за счёт температурной или временной деградации. В таком случае убедитесь, что у Вас есть возможность провести выделение из различных частей растения и провести выделение в нескольких повторах.

При наличии загрязнений (почва, насекомые и прочее) образцы необходимо промыть в очищенной воде, после удалить остаток жидкости одноразовыми бумажными салфетками.

Внимание! При работе с твёрдыми образцами убедитесь, что вы пользуетесь одноразовыми системами гомогенизации либо проведите полное удаление образца из системы гомогенизации после работы, чтобы избежать загрязнения последующих проб.

Внимание! Если необходимо поместить образцы тканей на **длительное хранение**, рекомендуется использовать **стабилизатор РНК (St-100)** или аналогичные реагенты и хранить образцы при -80°C. Стабилизатор РНК протестирован с листьями, хвоей и молодыми корнями. Несоблюдение температурных режимов хранения образцов приводит к быстрой деградации РНК ещё до момента выделения. Убедитесь в том, что ваши образы были подготовлены и хранились должным образом.

- Листья, хвоя, тычинки и подобные части растений.

При работе с мягкими частями растений рекомендуется использовать свежесрезанные образцы (желательно полученных с молодых растений или частей растений), лиофилизированные образцы, замороженные образцы в стабилизаторе РНК (St-100).

Вид образца	Рекомендованная масса образца на 1 выделение
Свежие образцы	Не более 100 мг
Замороженные образцы	Не более 100 мг
Образцы в стабилизаторе РНК	Не более 100 мг
Хвоя	Не более 100 мг
Сухие лиофилизированные образцы	Не более 30 мг
Тычинки (полностью)	Не более 50 мг

- Плоды, ягоды, семена.

При работе с образцами семян рекомендуется использовать механические гомогенизаторы либо мельницы. Выделение РНК возможно только из хорошо гомогенизированных образцов. Снижение качества гомогенизации приводит к снижению выхода РНК.

При работе с мягкими образцами их можно высушить с помощью этилового или изопропилового спирта.

1. Перенести навеску в одноразовую пробирку на 1.5 мл. К навеске добавить 800 мкл спирта. Образец тщательно гомогенизировать с помощью одноразового пестика.
2. Центрифугировать 1 мин, 10000 rcf. Удалить супернатант, не задевая осадок.
3. Повторно добавить 800 мкл спирта. Повторно гомогенизировать образец, допускается использовать пестик повторно.
4. Центрифугировать 1 мин, 10000 rcf. Удалить супернатант, не задевая осадок.
5. Осадок сушить 15 мин комнатной температуре.

Вид образца	Рекомендованная масса образца на 1 выделение
Плоды свежие	Не более 50 мг
Ягоды свежие	Не более 50 мг
Семена	Не более 50 мг

- Мхи, лишайники.

При работе с мхами и лишайниками убедится, что качественно удалён субстрат, к которому крепился образец. В противном случае в выделенном образце будет присутствовать РНК субстрата.

Вид образца	Рекомендованная масса образца на 1 выделение
Мох	Не более 30 мг
Лишайник	Не более 30 мг

Убедитесь, что при лизисе весь образец будет помещён в буфер LB.

- Грибы.

При работе с плотными образцами грибов рекомендуется использовать механические гомогенизаторы либо мельницы. Выделение РНК возможно только из хорошо гомогенизированных образцов. Снижение качества гомогенизации приводит к снижению выхода РНК.

При работе с мягкими образцами их можно высушить с помощью этилового или изопропилового спирта.

1. Перенести навеску в одноразовую пробирку на 1.5 мл. К навеске добавить 800 мкл этилового спирта. Образец тщательно гомогенизировать с помощью одноразового пестика.
2. Центрифугировать 1 мин, 10000 rcf. Удалить супернатант, не задевая осадок.
3. Повторно добавить 800 мкл спирта. Повторно гомогенизировать образец, допускается использовать пестик повторно.
4. Центрифугировать 1 мин, 10000 rcf. Удалить супернатант, не задевая осадок.
5. Осадок сушить 15 мин комнатной температуре.

Вид образца	Рекомендованная масса образца на 1 выделение
Грибы свежие	Не более 30 мг

- Одноклеточные водоросли.

При работе с суспензиями водорослей рекомендуется осадить образцы центрифугированием при 300-1000 rcf (в зависимости от вида образца). В случае, если образец при центрифугировании плохо осаждается, добавить 1/2 объёма 96% этанола от объёма образца. Полученный осадок промыть 80% этанолом. Центрифугировать 1 мин, 10000 rcf. Удалить супернатант, не задевая осадок.

Вид образца	Рекомендованная масса образца на 1 выделение
Суспензия одноклеточных водорослей	Не более 200 мкл

2) Лизис образцов.

Важно! Гомогенизацию и дальнейшее выделение необходимо проводить в помещениях, в которых **НЕ ПРОВОДЯТСЯ** работы с РНКазой. Даже небольшие количества РНКазы, находящиеся в воздухе либо на поверхности лабораторного оборудования, могут привести к полной деградации образца.

При работе рекомендуется использовать одноразовые наконечники с фильтрами. Гомогенизацию образцов рекомендуется проводить одноразовыми чистыми матрицами либо пестиками. Не желательно проводить гомогенизацию в многократно использованной ступке, поскольку в ступке могут содержаться примеси после работы с предыдущими образцами, которые могут отрицательно повлиять на результаты анализа либо привести к частичной или полной деградации РНК.

Важно! При работе с образцами богатыми РНКазами, рекомендуется добавление 20 мкл β-меркаптоэтанола или 40 мкл 2 М дитиотреитола (DTT) на одно выделение. При работе с β-меркаптоэтанолом используйте защитную одежду и работайте вытяжном шкафу и хорошо проветриваемом помещении. 2 М DTT должен храниться

при -20°C, расфасованный на аликвоты, которые рекомендуется размораживать не более 2-3 раз.

- Гомогенизация в жидком азоте.

1. Отобрать образец тканей растений. При работе с образцами в стабилизаторе РНК (St-100) осушить образец с помощью чистой салфетки. Взвесить образец.
2. Полностью покрыть образец жидким азотом, тщательно гомогенизировать образец.

Примечание: качество гомогенизации влияет на выход РНК. Рекомендуется добиться получения однородной суспензии образца.

3. Быстро и аккуратно перенести измельчённый образец в чистую пробирку, содержащую 750 мкл буфера для лизиса LB и 20 мкл β-меркаптоэтанола, тщательно перемешать.
4. Инкубировать 10 минут на льду.

Важно! При гомогенизации в жидком азоте рекомендуется использовать по возможности чистые одноразовые ступки и пестики. При работе с многоразовой ступкой и пестиком проводить её очистку с помощью растворов детергентов, последующего замачивания в 3% растворе перекиси водорода в течение 10 минут и промывкой дистиллированной водой. Не желательно проводить гомогенизацию в многократно использованной ступке, поскольку в ступке могут содержаться примеси образцов после работы с предыдущими образцами, которые могут отрицательно повлиять на результаты анализа либо привести к частичной или полной деградации РНК.

- Гомогенизация с использованием одноразовых пестиков.

1. Отобрать образец тканей растений. При работе с образцами в стабилизаторе РНК (St-100) осушить образец с помощью чистой салфетки. Взвесить образец.
2. Быстро и аккуратно перенести образец в чистую пробирку, содержащую 750 мкл буфера для лизиса LB и 20 мкл β-меркаптоэтанола, тщательно перемешать. Для более удобной гомогенизации допустимо добавлять буфер для лизиса LB порционно (например, 250 мкл LB и 20 мкл меркаптоэтанола при гомогенизации и 500 мкл после гомогенизации).
3. Одноразовым пестиком тщательно перетереть образец до образования насыщенного цветного раствора.

Примечание: качество гомогенизации влияет на выход РНК. Если возможно, рекомендуется добиться получения однородной суспензии образца.

Примечание: одноразовые стерильные пестики (Кат. № pest-10) присутствуют в каталоге ООО «Биолабмикс».

4. Инкубировать 10 минут на льду.

- Гомогенизация с использованием механического гомогенизатора.

1. Отобрать образец тканей растений. При работе с образцами в стабилизаторе РНК (St-100) осушить образец с помощью чистой салфетки. Взвесить образец.

2. Быстро и аккуратно перенести образец в чистую пробирку, содержащую 750 мкл буфера для лизиса и 20 мкл β-меркаптоэтанола и, если требуется, матрицу для гомогенизации.
3. Измельчить используя механический гомогенизатор тканей, например, FastPrep-24™ 5G (MP Biomedicals), TissueRuptor II (QIAGEN).
4. Инкубировать 10 минут на льду.

Примечание: при использовании матрицы для гомогенизации (порошок или шарики) её количество должно быть таким, чтобы буфер для лизиса LB полностью покрывал матрицу для гомогенизации и образец ткани. Если количество буфера для лизиса LB недостаточно, то увеличить объём буфера для лизиса LB либо уменьшить количество матрицы для гомогенизации.

Примечание: желательно использовать механический гомогенизатор с охлаждением.

Важно! Использование механических гомогенизаторов может привести к частичной или полной деградации РНК. Необходимо тщательно протестировать желаемые условия гомогенизации с использованием выбранного оборудования и, если используется, матрицы для гомогенизации. При использовании жестких матриц снижается выход целой РНК.

3) Нанесение на колонку.

1. Центрифугировать лизат 5 мин, 12000 rcf, при +4°C. Отобрать супернатант и перенести в чистую пробирку.

Примечание: при выделении из зелёных частей растений зелёный пигмент образует отдельную верхнюю фазу, отбор супернатанта производить, не задевая зелёный пигмент.

2. Добавить равный объём буфера для нанесения на колонку BB, тщательно перемешать. Инкубировать 1 минуту при комнатной температуре.
3. Нанести не более 800 мкл образца на колонку. Плотно закрыть крышку колонки.
4. Центрифугировать 30 с, 12000 rcf при +4°C. Удалить фильтрат.

Примечание: если после центрифугирования часть раствора осталась на колонке, повторить центрифугирование увеличив время и/или скорость центрифугирования, не добавляя новую порцию образца или буфера LB.

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

4) Промывка колонки.

1. Нанести на колонку 500 мкл буфера для промывки WB1. Центрифугировать 30 с, 12000 rcf, при +4°C. Удалить фильтрат.
2. Нанести на колонку 500 мкл буфера для промывки WB2. Центрифугировать 30 с, 12000 rcf, при +4°C. Удалить фильтрат.

Примечание: не забудьте предварительно добавить к буферу WB2 этанол.

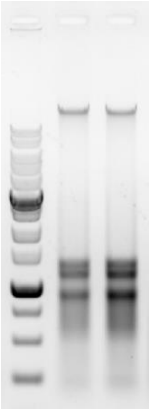
3. Центрифугировать колонку 3 мин, 12000 rcf, при +4°C для полного удаления буфера WB2.

5) Элюция 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 ЕВ. Инкубировать 1 мин при комнатной температуре (15-25°С). Центрифугировать 1 мин, 10000 rcf, при +25°С.
   - При увеличении объёма элюции увеличивается количество РНК и снижается концентрация РНК.
   - Вторая элюция **новой аликвотой** буфера для элюции ЕВ или **повторное нанесение элюата** на колонку позволяет дополнительно увеличить количество РНК.
   - 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. № ЕМ-100, ЕМ-250, ЕМ-1250, ООО «Биолабмикс») для полного удаления ДНК достаточно использовать 0.1 ед. на 1 мкг полученного раствора РНК.

Анализ выделенной РНК



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

Важно! При работе с РНК всегда используйте свежие агарозные гели и растворы для электрофореза.

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 хранить при температуре от +15 до +25 °С. Срок годности см. на упаковке.

Условия транспортировки:

Транспортировку набора, производить при температуре от +15 до +25 °С.