



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 РНК из крови

Кат. номер R-Blood-50

Важно!

Мы постоянно совершенствуем протокол работы с реагентом, поэтому просьба использовать протокол, идущий в комплекте с продуктом. Последняя версия протокола доступна на сайте компании ООО «Биолабмикс» (www.biolabmix.ru). Набор предназначен только для научно-исследовательских целей. Протокол обновлён 13.08.2024.

Описание

Набор предназначен для выделения и очистки РНК из следующих образцов:

1. Цельная кровь, взятая в одноразовые пробирки с антикоагулянтами EDTA или цитратом натрия;
2. Культуры клеток.

Принцип действия набора основан на селективной сорбции нуклеиновых кислот на кремниевой мембране из предварительно лизированного образца, последующей промывке и элюции очищенного продукта.

В процессе выделения РНК из цельной крови происходит селективное разрушение эритроцитов буфером для лизиса эритроцитов RBC, лейкоциты осаждаются центрифугированием. Лейкоциты эффективно лизируются в буфере LB, при этом целостность РНК сохраняется. Далее лизат наносится на первую колонку, на которой происходит сорбция большей части ДНК (от 90%), содержащейся в образце. Очищенный лизат наносится на вторую колонку, на которой происходит сорбция РНК. На последних этапах протокола следуют промывки и элюция очищенного продукта.

Элюция РНК проходит в 15–40 мкл. Возможно выделение до 45 мкг РНК, в зависимости от количества и типа образца.

Важно! Большая часть ДНК удаляется в процессе выделения и обработка ДНКазой не требуется. Однако дальнейшее удаление ДНК может быть необходимо для некоторых приложений чувствительных к очень малым количествам ДНК.

Оглавление

Протокол 1. Выделение РНК из цельной крови.	5
Протокол 2. Выделение РНК из культур клеток животных.	8
Протокол 3. Выделение РНК из культур клеток бактерий.	12
Протокол 4. Очистка ДНК. Опционально.	15
Анализ выделенной РНК и ДНК.	16

Состав набора

R-Blood-50 50 выделений	
Буфер для лизиса эритроцитов RBC	5x120 мл
Буфер для лизиса LB	40 мл
Буфер для сорбции BB	60 мл
Буфер для промывки WB1	60 мл
Буфер для промывки WB2 (концентрат)	25 мл
Буфер для элюции EB	15 мл
Колонки 1D	50 шт.
Колонки 2R	50 шт.

Колонки 1D включают пробирки для сбора фильтрата и колонки для сорбции образца. Колонки с фильтром **большого** размера.

Колонки 2R включают пробирки для сбора фильтрата и колонки для сорбции образца. Колонки с фильтром **меньшего** размера.

RBC также доступен в виде отдельной позиции (см. **Дополнительные реагенты**).

Меры предосторожности

Осторожно! Буферы для лизиса LB и для промывки WB1 содержат раствор тиоцианата гуанидина, оказывающий раздражающее и токсичное действие. При работе необходимо соблюдать правила общей и личной техники безопасности. Токсичен при попадании на кожу и внутрь. Вызывает ожоги.

Осторожно! Буферы для сорбции BB и для промывки 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.

Внимание! При работе с биологическими жидкостями следует надевать одноразовые резиновые перчатки, так как исследуемый материал является потенциально инфицированным, способным длительное время сохранять или передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции. Все использованные материалы дезинфицировать в соответствии с требованиями МУ-287-113.

Эксплуатация

Компоненты: RBC, LB, BB, WB1, WB2, EB стабильны в течение всего срока годности при соблюдении условий хранения (см. на упаковке) и достаточной герметизации флаконов.

Условия работы

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

Относительная влажность воздуха не более 80 %;

Атмосферное давление 630 – 800 мм. рт. ст.

Оборудование и материалы, не входящие в набор

- Центрифуга с ротором для микропробирок на 1.5–2 мл, скорость 12000 rcf, охлаждение до +4 °С;
- **Опционально:**
Центрифуга с ротором для пробирок не менее 15 мл, скорость 400 rcf, охлаждение до +4 °С. Для удобства при подготовке осадка лейкоцитов;
- Вортекс;
- Одноканальные дозаторы переменного объёма и наконечники для них;
- Перчатки резиновые;
- Микропробирки на 1.5 мл;
- Этанол, 96–100% раствор;
- 2-меркаптоэтанол, 14.3 М раствор (коммерчески доступный раствор обычно имеет концентрацию 14.3 М) или альтернативный вариант – водный раствор 2 М дитиотриэтола (ДТТ);

Перед началом работы

Подготовка буфера LB.

- Вариант 1.

Добавить 20 мкл 2-меркаптоэтанола (2-ME) к 1 мл буфера LB. Буфер LB с 2-меркаптоэтанолом готовить в день постановки выделения РНК, не хранить.

- Вариант 2.

Добавить 40 мкл 2 М раствора дитиотриэтола (DTT) к 1 мл буфера LB. Буфер LB с дитиотриэтолом (DTT) готовить в день постановки выделения РНК, не хранить. Использовать свежеприготовленный раствор 2 М DTT или однократно замороженные аликвоты.

Примечание: при выделении РНК из крови всегда добавлять в буфер LB 2-ME или DTT. При работе с культурами клеток возможна работа без 2-ME или DTT в зависимости от культур клеток. Например, при работе с культурами клеток богатыми РНКазами необходимо добавлять в буфер LB 2-ME или DTT.

Подготовка буфера WB2.

- **1 промывка, 500 мкл WB2.** К 100 мкл буфера WB2 (концентрат) добавить 400 мкл этанола (96-100%).

- **R-Blood-50. 1 флакон.** К 25 мл буфера WB2 (концентрат) добавить 100 мл этанола (96-100%), чтобы получить 125 мл буфера WB2.

После добавления этанола плотно закрывать крышку. Рекомендуется добавлять этанол к аликвоте буфера WB2, поскольку при хранении буфера с этанолом в течение нескольких месяцев этанол может частично испариться.

Протокол 1. Выделение РНК из цельной крови.

1) Подготовка лейкоцитов

Важно! Заранее охладить буфер для лизиса эритроцитов RBC при +4 °С. Использование охлаждённого буфера позволяет обеспечить лучшую сохранность РНК при выделении.

1. Пробирку с цельной кровью аккуратно перемешать, не допускать расслоения образца на плазму и клеточную фракцию. В отдельную пробирку отобрать до 1.5 мл цельной крови.
2. К образцу крови добавить 5 объёмов охлаждённого буфера для лизиса эритроцитов RBC от исходного объёма крови. Например, при использовании 1.5 мл крови добавить 7.5 мл буфера RBC.

Рекомендация. При отсутствии центрифуги для пробирок от 15 мл и более лизис эритроцитов удобнее провести в пробирке на 15 или 50 мл. Затем разделить образец по микропробиркам на 1.5–2 мл. При последующем ресуспендировании осадка лейкоцитов в буфере RBC или PBS объединить образец в одну пробирку.

3. Аккуратно перемешать, переворачивая пробирку, убедится, что раствор гомогенный.
4. Инкубировать 15 мин при +4 °С. Перемешивать, переворачивая пробирку, каждые 5 мин.
5. Центрифугировать 400 rcf, 10 мин, 4 °С. Полностью удалить супернатант, не задевая осадок.
5. Ресуспендировать осадок в 2 объёмах буфера RBC от исходного объёма крови. Например, при использовании 1.5 мл крови использовать 3 мл RBC.
5. Центрифугировать 400 rcf, 10 мин, 4 °С. Полностью удалить супернатант, не задевая осадок.
6. Ресуспендировать осадок клеток в PBS пипетированием в соответствии с таблицей 1 (см. ниже).

Примечание: убедиться, что осадок полностью ресуспендирован и не находится на стенке пробирки. Если клетки остались в виде осадка на стенке пробирки, то это может снизить эффективность лизиса клеток и привести к снижению выхода РНК.

Таблица 1. Объёмы PBS для ресуспендирования осадка лейкоцитов и буфера LB для лизиса лейкоцитов.

Количество лейкоцитов на 1 мл крови	PBS	LB
5*10 ⁵ клеток и менее	50 мкл	350 мкл
5–10*10 ⁶ клеток	70 мкл	650 мкл

2) Лизис лейкоцитов.

Важно! Убедиться, что в буфер для лизиса LB добавлен 2-ME или DTT (см. раздел **Перед началом работы**)

1. К суспензии лейкоцитов, полученному в разделе 1 (см. раздел **Подготовка лейкоцитов**) добавить аликвоту буфера для лизиса LB в соответствии с таблицей 1 (см. выше).

Опционально: если ожидаемый выход РНК менее 1–2 мкг, то при выделении РНК добавить 5 мкл (5 мг/мл) полиА РНК (кат. № polyA-500). При использовании полиА РНК возможно повысить выход РНК.

Важно! При использовании полиА РНК выделенную РНК нельзя будет проанализировать с помощью гель-электрофореза, УФ-спектрометрии или флуориметрии.

2. Тщательно перемешать образец пипетированием. Не использовать вортекс. Убедиться, что получилась однородная суспензия.

3. Инкубировать 10 мин при 15–25 °С.

3) Нанесение на колонку. Очистка от ДНК.

1. Не более 800 мкл лизата нанести на колонку 1D. Плотно закрыть крышку колонки.

Важно! Не перепутать, колонка 1D имеет фильтр большего диаметра, чем колонка 2R.

2. Центрифугировать 30 с, 12000 gcf. Сохранить фильтрат.

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

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

3. Фильтрат перенести в чистую пробирку.

4. Колонку 1D можно выбросить.

Опционально: колонку 1D можно использовать для дальнейшей очистки и элюции ДНК (см. протокол 4).

Важно! Если планируется выделение ДНК, то обязательно ознакомиться с протоколом перед началом работы.

4) Нанесение на колонку. Сорбция РНК.

1. К полученному фильтрату добавить равный объем буфера для сорбции ВВ.

Например, при объеме лизата 400 мкл добавить 400 мкл буфера ВВ. Тщательно перемешать пипетированием перед нанесением на колонку.

2. Не более 800 мкл образца нанести на колонку 2R, включая возможный осадок, образовавшийся после смешивания лизата с буфером ВВ. Плотно закрыть крышку колонки.

Важно! Не перепутать, колонка 1D имеет фильтр большего диаметра, чем колонка 2R.

3. Центрифугировать 30 с, 12000 rcf. Удалить фильтрат.

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

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

5) Промывка колонки.

1. Нанести на колонку 500 мкл буфера для промывки WB1. Центрифугировать 30 с, 12000 rcf. Удалить фильтрат.

2. Нанести на колонку 500 мкл буфера для промывки WB2. Центрифугировать 30 с, 12000 rcf. Удалить фильтрат.

Примечание: не забудьте предварительно добавить к буферу WB2 этанол.

3. Повторно нанести на колонку 700 мкл буфера для промывки WB2.

Центрифугировать 30 с, 12000 rcf. Удалить фильтрат.

4. Центрифугировать колонку 3 мин, 12000 rcf для полного удаления буфера WB2.

6) 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 15 до 40 мкл буфера для элюции EB. Инкубировать 2 мин при комнатной температуре (15–25 °C). Центрифугировать 2 мин, 12000 rcf.

- **Важно!** Рекомендуемый объём элюции 20 мкл. При элюции меньшим объёмом требуется аккуратно наносить аликвоту буфера на центр фильтра колонки, иначе возможно снижение выхода РНК.
- **Важно!** При содержании в 1 мл крови более $5 \cdot 10^6$ лейкоцитов или ожидаемый выход РНК более 20 мкг, то рекомендуемый объём элюции 30 мкл. При элюции меньшим объёмом возможно снижение выхода РНК.
- Буфер для элюции – вода, очищенная от РНКаз.

3. Элюат, содержащий РНК, хранить при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Опционально. Большая часть ДНК удаляется в процессе выделения и обработка ДНКазой не требуется. Однако дальнейшее удаление ДНК может быть необходимо для некоторых приложений чувствительных к очень малым количествам ДНК. Рекомендуем поставить контрольные анализы, чтобы удостоверится оказывает ли влияние примесь ДНК на конечный результат.

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.

Протокол 2. Выделение РНК из культур клеток животных.

1) Подготовка клеток.

– Культуры клеток животных. Монослойные культуры.

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 $10 \cdot 10^6$ клеток) в одноразовую микропробирку.
3. Осадить клетки центрифугированием 3 мин, 1000 rcf. Аккуратно отобрать супернатант.
4. Ресуспендировать осадок клеток в PBS пипетированием в соответствии с таблицей 2 (см. ниже).

Примечание: убедиться, что осадок полностью ресуспедирован и не находится на стенке пробирки. Если клетки остались в виде осадка на стенке пробирки, то это может снизить эффективность лизиса клеток и привести к снижению выхода РНК.

5. Перейти к разделу 2 (Лизис клеток).

Таблица 2. Объемы PBS для ресуспендирования осадка лейкоцитов и буфера LB для лизиса лейкоцитов.

Количество клеток	PBS	LB
$5 \cdot 10^6$ клеток и менее	50 мкл	350 мкл
$5 \cdot 10^6$ клеток	70 мкл	650 мкл

– Культуры клеток животных. Монослойные культуры. Культуральные планшеты.

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-, 24- или 96-луночного планшета добавить аликвоту буфера для лизиса LB в соответствии с таблицей 3 (см. ниже).

Таблица 2. Объемы PBS для ресуспендирования осадка лейкоцитов и буфера LB для лизиса лейкоцитов.

Планшет	LB
12-луночный	400 мкл
24-луночный	200 мкл
96-луночный	200 мкл

3. Инкубировать 10 минут. Аккуратно, избегая пенообразования, перемешать содержимое лунки пипетированием, убедиться, что клетки открепилась от ячейки.

4. Чистым одноразовым наконечником перенести образец в одноразовую микропробирку.

6. Перейти к разделу 3 (**Нанесение на колонку. Очистка от ДНК**).

– **Культуры клеток животных. Суспензионные культуры.**

1. Перенести образец суспензии клеток (не более $2-3 \cdot 10^6$ клеток) в одноразовую микропробирку.

2. Осадить клетки центрифугированием 3 мин, 1000 *rcf*. Аккуратно отобрать супернатант.

3. Ресуспендировать осадок клеток в PBS пипетированием в соответствии с таблицей 2 (см. выше).

Примечание: убедиться, что осадок полностью ресуспендирован и не находится на стенке пробирки. Если клетки остались в виде осадка на стенке пробирки, то это может снизить эффективность лизиса клеток и привести к снижению выхода РНК.

4. Перейти к следующему разделу (раздел 2, **Лизис клеток**).

2) Лизис клеток.

1. К суспензии клеток добавить аликвоту буфера для лизиса LB в соответствии с таблицей 2 (см. выше).

Опционально: если ожидаемый выход РНК менее 1–2 мкг, то при выделении РНК добавить 5 мкл (5 мг/мл) полиА РНК (кат. № polyA-500). При использовании полиА РНК возможно повысить выход РНК.

Важно! При использовании полиА РНК выделенную РНК нельзя будет проанализировать с помощью гель-электрофореза, УФ-спектрометрии или флуориметрии.

2. Тщательно перемешать образец пипетированием. Не использовать вортекс. Убедится, что получилась однородная суспензия.

3. Инкубировать 10 мин при 15–25 °С.

2) Нанесение на колонку. Очистка от ДНК.

1. Не более 800 мкл лизата нанести на колонку 1D. Плотно закрыть крышку колонки.

Важно! Не перепутать, колонка 1D имеет фильтр большего диаметра, чем колонка 2R.

2. Центрифугировать 30 с, 12000 *rcf*. Сохранить фильтрат.

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

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

3. Фильтрат перенести в чистую пробирку.

4. Колонку 1D можно выбросить.

Опционально: колонку 1D можно использовать для дальнейшей очистки и элюции ДНК (см. протокол 4).

Важно! Если планируется выделение ДНК, то обязательно ознакомьтесь с протоколом перед началом работы.

3) Нанесение на колонку. Сорбция РНК.

1. К полученному фильтрату добавить равный объем буфера для сорбции ВВ.

Например, при объеме лизата 400 мкл добавить 400 мкл буфера ВВ. Тщательно перемешать пипетированием перед нанесением на колонку.

2. Не более 800 мкл образца нанести на колонку 2R, включая возможный осадок, образовавшийся после смешивания лизата с буфером ВВ. Плотнo закрыть крышку колонки.

Важно! Не перепутать, колонка 1D имеет фильтр большего диаметра, чем колонка 2R.

3. Центрифугировать 30 с, 12000 гcf. Удалить фильтрат.

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

Примечание: если объем образца более 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 гcf. Удалить фильтрат.

2. Нанести на колонку 500 мкл буфера для промывки WB2. Центрифугировать 30 с, 12000 гcf. Удалить фильтрат.

Примечание: не забудьте предварительно добавить к буферу WB2 этанол.

3. Повторно нанести на колонку 500 мкл буфера для промывки WB2.

Центрифугировать 30 с, 12000 гcf. Удалить фильтрат.

4. Центрифугировать колонку 3 мин, 12000 гcf для полного удаления буфера WB2.

6) Элюция РНК.

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

2. Нанести на центр фильтра колонки от 15 до 40 мкл буфера для элюции EB.

Инкубировать 2 мин при комнатной температуре (15–25 °С). Центрифугировать 2 мин, 12000 гcf.

- **Важно!** Рекомендуемый объем элюции 20 мкл. При элюции меньшим объемом требуется аккуратно наносить аликвоту буфера на центр фильтра колонки, иначе возможно снижение выхода РНК.

- **Важно!** При работе с $5 \cdot 10^6$ клеток и более или ожидаемый выход РНК более 20 мкг, то рекомендуемый объем элюции 30 мкл. При элюции меньшим объемом возможно снижение выхода РНК.

- Буфер для элюции – вода, очищенная от РНКаз.

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

Опционально. Большая часть ДНК удаляется в процессе выделения и обработка ДНКазой не требуется. Однако дальнейшее удаление ДНК может быть необходимо для некоторых приложений чувствительных к очень малым количествам ДНК. Рекомендуем поставить контрольные анализы, чтобы удостовериться оказывает ли влияние примесь ДНК на конечный результат.

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.

Протокол 3. Выделение РНК из культур клеток бактерий.

1) Подготовка клеток.

– **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 gcf. Аккуратно отобрать супернатант.
3. Ресуспендировать осадок клеток в 50 мкл PBS пипетированием.

Примечание: убедиться, что осадок полностью ресуспендирован и не находится на стенке пробирки. Если клетки остались в виде осадка на стенке пробирки, то это может снизить эффективность лизиса клеток и привести к снижению выхода РНК.

4. Перейти к следующему разделу (раздел 2, **Лизис клеток**).

– **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 $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

 - 50 мМ Tris–HCl (pH 8), 10 мМ EDTA (pH 8)

Примечание: в данном буфере раствор лизоцима возможно хранить не более 1 недели при $+4\text{ }^\circ\text{C}$.
 - 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 $T_{ком}$ ($15\text{--}25^\circ\text{C}$), периодически перемешивая до полного растворения лизоцима.
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.
- Примечание:** убедиться, что осадок полностью ресуспендирован и не находится на стенке пробирки. Если клетки остались в виде осадка на стенке пробирки, то это может снизить эффективность лизиса клеток и привести к снижению выхода РНК.
4. Чистым одноразовым наконечником добавить 30 мкл раствора лизоцима (50 мг/мл).

Примечание: лизоцим не входит в набор.

5. Перемешать образец на вортексе 5-10 с. Сбросить капли коротким центрифугированием. Инкубировать 10 мин при Tкомн (15-25°C).
6. Перейти к следующему разделу (раздел 2, **Лизис клеток**).

2) Лизис клеток.

1. К суспензии клеток добавить 650 мкл буфера для лизиса LB.

Опционально: если ожидаемый выход РНК менее 1-2 мкг, то при выделении РНК добавить 5 мкл (5 мг/мл) полиА РНК (кат. № polyA-500). При использовании полиА РНК возможно повысить выход РНК.

Важно! При использовании полиА РНК выделенную РНК нельзя будет проанализировать с помощью гель-электрофореза, УФ-спектрометрии или флуориметрии.

2. Тщательно перемешать образец пипетированием. Не использовать вортекс. Убедится, что получилась однородная суспензия.
3. Инкубировать 10 мин при 15-25 °С.

2) Нанесение на колонку. Очистка от ДНК.

1. Не более 800 мкл лизата нанести на колонку 1D. Плотнo закрыть крышку колонки.

Важно! Не перепутать, колонка 1D имеет фильтр большего диаметра, чем колонка 2R.

2. Центрифугировать 30 с, 12000 *rcf*. Сохранить фильтрат.

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

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

3. Фильтрат перенести в чистую пробирку.
4. Колонку 1D можно выбросить.

Опционально: колонку 1D можно использовать для дальнейшей очистки и элюции ДНК (см. протокол 4).

Важно! Если планируется выделение ДНК, то обязательно ознакомиться с протоколом перед началом работы.

3) Нанесение на колонку. Сорбция РНК.

1. К полученному фильтрату добавить равный объём буфера для сорбции ВВ.

Например, при объёме лизата 400 мкл добавить 400 мкл буфера ВВ. Тщательно перемешать пипетированием перед нанесением на колонку.

2. Не более 800 мкл образца нанести на колонку 2R, включая возможный осадок, образовавшийся после смешивания лизата с буфером ВВ. Плотнo закрыть крышку колонки.

Важно! Не перепутать, колонка 1D имеет фильтр большего диаметра, чем колонка 2R.

3. Центрифугировать 30 с, 12000 гсф. Удалить фильтрат.

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

Примечание: если объём образца более 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 гсф. Удалить фильтрат.

2. Нанести на колонку 500 мкл буфера для промывки WB2. Центрифугировать 30 с, 12000 гсф. Удалить фильтрат.

Примечание: не забудьте предварительно добавить к буферу WB2 этанол.

3. Повторно нанести на колонку 500 мкл буфера для промывки WB2. Центрифугировать 30 с, 12000 гсф. Удалить фильтрат.

4. Центрифугировать колонку 3 мин, 12000 гсф для полного удаления буфера WB2.

6) 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 15 до 40 мкл буфера для элюции EB. Инкубировать 2 мин при комнатной температуре (15–25 °С). Центрифугировать 2 мин, 12000 гсф.

- **Важно!** Рекомендуемый объём элюции 20 мкл. При элюции меньшим объёмом требуется аккуратно наносить аликвоту буфера на центр фильтра колонки, иначе возможно снижение выхода РНК.
- **Важно!** Если ожидаемый выход РНК более 20 мкг, то рекомендуемый объём элюции 30 мкл. При элюции меньшим объёмом возможно снижение выхода РНК.
- Буфер для элюции – вода, очищенная от РНКаз.

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

Опционально. Большая часть ДНК удаляется в процессе выделения и обработка ДНКазой не требуется. Однако дальнейшее удаление ДНК может быть необходимо для некоторых приложений чувствительных к очень малым количествам ДНК. Рекомендуем поставить контрольные анализы, чтобы удостоверится оказывает ли влияние примесь ДНК на конечный результат.

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.

Протокол 4. Очистка ДНК. Опционально.

Примечание: ниже приведён протокол для очистки и элюции ДНК с колонки 1D. Если планируется выделение ДНК параллельно с РНК, просьба заранее ознакомиться с данным протоколом. Промывку и элюцию колонок 1D (для выделения ДНК) и 1R (для выделения РНК) можно проводить одновременно.

Важно! Колонку 1D после сорбции ДНК и перед началом промывки хранить не более 30 мин при 2–25 °С.

1) Промывка колонки 1D.

1. Нанести на колонку 1D 500 мкл буфера для промывки WB1. Центрифугировать 30 с, 12000 *rcf*. Удалить фильтрат.
2. Нанести на колонку 1D 500 мкл буфера для промывки WB2. Центрифугировать 30 с, 12000 *rcf*. Удалить фильтрат.

Примечание: не забудьте предварительно добавить к буферу WB2 этанол.

3. Повторно нанести на колонку 1D 500 мкл буфера для промывки WB2. Центрифугировать 30 с, 12000 *rcf*. Удалить фильтрат.
4. Центрифугировать колонку 3 мин, 12000 *rcf* для полного удаления буфера WB2.

2) Элюция ДНК.

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 100 мкл буфера для элюции EB. Инкубировать 3 мин при комнатной температуре (15–25 °С). Центрифугировать 2 мин, 12000 *rcf*.
 - **Важно!** Рекомендуемый объём элюции 100 мкл. При элюции меньшим объёмом требуется аккуратно наносить аликвоту буфера на центр фильтра колонки, иначе возможно снижение выхода ДНК.
 - Буфер для элюции – вода, очищенная от РНКаз.
3. Элюат, содержащий ДНК, хранить при –20 °С.

Анализ выделенной РНК и ДНК

Целостность выделенных РНК и ДНК можно проверить с помощью геле-электрофореза в 1% агарозном геле.

Количество выделенных РНК и ДНК можно оценить с помощью УФ-спектрометрии.

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

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

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

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

$A_{260} \cdot \text{разбавление} \cdot 50$ мкг/мл.

Характерные соотношения оптической плотности $A_{260}/A_{280} \sim 1.8 - 2.0$.

Примечание: если в процессе выделения была использована полиА РНК, то анализ выделенной РНК и ДНК не получится провести с помощью геле-электрофореза, УФ-спектрометрии или флуориметрии. Для анализа рекомендуется использовать ПЦР.

Дополнительные реагенты:

- Буфер для лизиса эритроцитов RBC (Кат. № RBC-100, RBC-500).
- Раствор полиА, 5 мг/мл (Кат. № polyA-500).
- Термолабильная ДНКаза, 2 ед/мкл (Кат. № EM-100, EM-250, EM-1250).
- Набор для выделения ДНК и РНК из реакционных смесей (Кат. № DR-10, DR-50, DR-250).
- 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 для визуализации НК (Кат. № EtBr-10).
- 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.