Инструкция по применению

ZYMO RESEARCH
The Beauty of Science is to Make Things Simple

Набор реагентов для выделения РНК из биологических образцов Quick- RNA™ Miniprep Kit

Каталожный номер:
R1054 – 50 реакций
R1055 – 200 реакций

Производитель:
Займо Рисеч Корпорейшн (Zymo Research Corp.)
17062 Мёрфи авеню, Ирвин, Калифорния, 92614 США.
Тел.: 949-679-1190, факс: 949-266-9452

Назначение: набор реагентов для выделения РНК из различных биологических образцов с помощью центрифужных мини-колонок. Выделенная РНК без примесей ДНК подходит для различных методик молекулярной биологии: секвенирования, в том числе нового поколения NGS, обратной транскрипции и ПЦР, гибридизации и др.

Состав набора:

Quick-RNA™ Miniprep Kit	R1050 50 реакций	R1051 200 реакций	Температура хранения
RNA Lysis Buffer Буфер для лизирования клеток	50 мл	2 x 100 мл	Комнатная
RNA Prep Buffer Буфер для пробоподготовки РНК	25 мл	100 мл	Комнатная
RNA Wash Buffer (concentrate)[1] Буфер для промывания РНК, концентрат	24 мл	2 x 48 мл	Комнатная
DNase/RNase-Free Water Вода без РНКаз, ДНКаз	6 мл	30 мл	Комнатная
DNase I (lyophilized)[2] Фермент ДНКаза I, лиофилизированная	1	4	-20C после разведения
DNA Digestion Buffer Буфер для расщепления ДНК	4 мл	16 мл	Комнатная
Spin-Away Filters Центрифужные фильтры для очистки образца	50 шт	200 шт	Комнатная
Zymo-Spin™ IIICG Columns Микроколонки для центрифугирования	50 шт	200 шт	Комнатная
Collection Tubes Собирающие пробирки	100 шт	400 шт	Комнатная
Instruction Manual **Инструкция**	1	1	-

[1]Добавить 96 мл 100% этанола (104 мл 95% этанола) к 24 мл буфера для промывания (**RNA Wash Buffer** concentrate) или 192 мл 100% этанола (208 мл 95% этанола) к 48 мл буфера для промывания (**RNA Wash Buffer** concentrate)
[2]Перед использованием развести лиофилизированную ДНКазу I (**DNase I**) по инструкции на упаковке. Храните аликвоты замороженными при -20°C.

Спецификация:
Тип образцов: образцы клеток и тканей, дрожжи, растения или бактерии. Совместимость со стабилизирующим раствором DNA/RNA Shield и RNA*later*.

Хранение образцов: Образцы, гомогенизированные в лизирующем буфере RNA Lysis Buffer стабильны и могут храниться замороженными для последующего выделения РНК.
Исходный объем образца: до 10^7 клеток и 50 мг тканей
Емкость связывания: до 100 мкг РНК можно элюировать в объеме от 50 мкл воды без РНКаз
Объем элюции: от 50 мкл
Чистота: высокоочищенная РНК (A260/A280 >1.8, A260/A230 >1.8), готовая для проведения секвенирования, ОТ-ПЦР, гибридизации и т.п.
Хранение РНК: элюированную РНК необходимо заморозить, можно добавить ингибиторы РНКаз для длительного хранения.
Необходимое оборудование: микроцентрифуга

Вся работа должна проводиться в чистом помещении на поверхностях обработанных ингибиторами РНКаз.

Описание набора

Набор для выделения РНК **Quick-RNA™ Miniprep Kit** это инновационный продукт, разработанный для простого, надежного и быстрого выделения РНК без примесей ДНК из разнообразных клеток (*до 10^7*) и образцов тканей (*до 50 мг*). Процедура совмещает уникальную буферную систему с технологией микроцентрифужных колонок Clean-Spin™, что позволяет получить концентрированную тотальную РНК (включая малые РНК размером от 17 до 200 нуклеотидов) всего за 10 минут.
Процедура проста. Добавьте лизирующий буфер **RNA Lysis Buffer** к образцу, а затем проведите очистку на микроцентрифужных колонках **Zymo-Spin Columns**. В результате вы получите высококонцентрированную РНК *без примесей ДНК*, которая подходит для методик ОТ-ПЦР, гибридизации, секвенирования и т.п. Кроме того, набор можно использовать для обогащения малых и больших РНК, выделяя их в разные фракции.

Подготовка реагентов

- ✓ Добавить96 мл 100% этанола (104 мл 95% этанола) к 24 мл буфера для промывания (**RNA Wash Buffer** concentrate, R1054) или 192 мл 100% этанола (208 мл 95% этанола) к 48 мл буфера для промывания (**RNA Wash Buffer** concentrate, R1055)
- ✓ Перед использованием развести лиофилизированную ДНКазу I (**DNase I**) по инструкции на пробирке. Хранить аликвоты замороженными при -20°C.

Протоколы

Выделение РНК состоит из трех этапов: (I) Лизис и гомогенизация образца, (II) Просветление образца и удаление геномной ДНК и (III) выделение РНК.

Все этапы выполняются при комнатной температуре (20-30°C)

I. Лизис и гомогенизация образца

Рекомендуемые объемы буфера для лизиса RNA Lysis Buffer

RNA Lysis Buffer	**300 мкл**	**600 мкл**
Клетки	До 5 x 10^6	>5 x 10^6
Ткани	<20 мг	≤50 мг

Адгезивные клетки
Лизис клеток следует проводить непосредственно в посуде для культивирования, удалив питательную среду, внести буфер для лизиса **RNA Lysis Buffer** непосредственно в клеточный монослой.
Клетки в суспензии

Осадить клетки (≤500 x g), удалить супернатант полностью и затем ресуспендировать осадок клеток в буфере для лизиса **RNA Lysis Buffer.** Краткосрочно встряхнуть на вортексе.

Ткани и трудно лизируемые образцы
Свежие или замороженные образцы тканей (животных, растений, насекомых, дрожжи или бактерии) можно механически гомогенизировать непосредственно в лизирующем буфере **RNA Lysis Buffer.**
В качестве альтернативы, для трудно лизируемых образцов можно использовать обработку Протеиназой К.

Жидкости/Очистка реакции
РНК, обработанную ДНКазой, РНК после реакций мечения и транскрипции можно сразу залить 4-мя объемами буфера для лизиса **RNA Lysis Buffer** на один объем образца (4:1) и хорошо перемешать.

Образцы в растворе DNA/RNA Shield
Довести образцы, находящиеся в растворе DNA/RNA Shield до комнатной температуры (20-30°C). Затем добавить 1 объем буфера для лизиса **RNA Lysis Buffer** (1:1), перемешать и начать процедуру Выделения РНК.
Образцы в растворе DNA/RNA Shield можно обработать Протеиназой К (см. стр. 5).

Образцы в растворе RNA*later*.
Для обработки образцов клеток и жидкостей в реагенте RNA*later* (без удаления реагента): Добавить 1 объем воды без РНКаз или ФСБ (фосфатно-солевой буфер) к образцу в соотношении 1:1. Затем добавить 4 объема буфера для лизиса **RNA Lysis Buffer** (4:1) и перемешать.
В качестве альтернативы можно удалить реагент RNA*later* и приступить к этапу Лизис и гомогенизация образца в зависимости от типа образца.

II. Просветление образца и удаление геномной ДНК

Следующий протокол рекомендован для клеток и тканей (животных/растительных), его можно пропустить в случае бесклеточных образцов и образцов с малым количеством материала (≤10^5 клеток).

1. Просветлить лизат центрифугированием при ≥10,000 x g в течение 1 минуты.
2. Перенести супернатант в желтый фильтр для очистки образца **Spin-Away Filter**, помещенный предварительно в собирающую пробирку **Collection Tube**, центрифугировать при ≥10,000 x g в течение 1 минуты для удаления большей части геномной ДНК.

Сохранить слив для выделения РНК!

III. Выделение РНК

Все этапы выполняются при комнатной температуре и центрифугировании при 10.000 – 16.000 x g.

1. Добавить 1 объем этанола (95-100%) к образцу в лизирующем буфере **RNA Lysis Buffer** (1:1). Хорошо перемешать.
2. Перенести смесь в зеленую микроцентрифужную колонку **Zymo-Spin IIICG Column**, предварительно помещенную в собирающую пробирку Collection Tube и центрифугировать 30 секунд. Удалить слив.

Для образцов объемом более 700 мкл необходимо повторить процедуру нанесения образца на колонку и центрифугирования

3. **Обработка ДНКазой I в колонке** (Не обязательно)

Этот этап можно использовать для удаления остатков ДНК. Перед работой развести ДНКазу I как указано на упаковке.

а. Предварительно промыть колонку 400 мкл лизирующим буфером **RNA Lysis Buffer**. Центрифугировать 30 секунд. Удалить слив.

б. На каждый образец для обработки приготовить реакционную смесь с ДНКазой I в чистой пробирке без РНКаз (не входят в набор):

ДНКаза I	5 мкл
Буфер для расщепления ДНК	75 мкл

в. Добавить 80 мкл реакционной **смеси с ДНКазой I** непосредственно на матрикс колонки. Инкубировать при комнатной температуре (20-30°C) в течение 15 минут. Затем центрифугировать в течение 30 секунд.

4. Добавить 400 мкл буфера для пробоподготовки **RNA Prep Buffer** в колонку и центрифугировать 30 секунд. Удалить слив.
5. Добавить 700 мкл буфера для промывания **RNA Wash Buffer** и центрифугировать колонку в течение 30 секунд. Удалить слив.
6. Добавить 400 мкл буфера для промывания **RNA Wash Buffer** и центрифугировать 2 минуты, чтобы полностью удалить остатки промывающего буфера. Перенести колонку в чистую пробирку без нуклеаз (не входит в набор).
7. Добавить 100 мкл ультрачистой воды **DNase/RNase-Free Water** непосредственно на матрикс колонки и центрифугировать 30 секунд.

Для получения более концентрированной РНК можно использовать ≥50 мкл для элюции.

Полученную РНК необходимо сразу заморозить при -70°C

<u>Выделение малых и больших РНК в отдельные фракции</u>

Эта процедура совместима только с образцами животных клеток (до 10^6) или предварительно выделенной РНК

Все этапы выполняются при комнатной температуре и центрифугировании при 10.000 – 16.000 x g.

1. Смешать равные объемы лизирующего буфера **RNA Lysis Buffer** и этанола (95-100%).

Например: смешать 50 мкл буфера и 50 мкл этанола

2. Добавить 2 объема смеси буфер/этанол к образцу РНК (минимальный объем которого не менее 50 мкл) или 300 мкл буфер/этанол к осадку клеток и перемешать.

Например: смешать 100 мкл буфер/этанол и 50 мкл образца.

3. Перенести смесь в микроцентрифужную колонку **Zymo-Spin Column** и центрифугировать 30 секунд. **Сохранить слив!**
4.

Колонка: РНК > 200 нуклеотидов	**Слив: РНК 17 – 200 нуклеотидов**
Продолжить шаг 5	Добавить 1 объем этанола и перемешать. Пример: добавить 150 мкл этанола к 150 мкл слива. Перенести смесь в новую колонку и центрифугировать 30 секунд. Удалить слив.

5. Добавить 400 мкл буфера для пробоподготовки **RNA Prep Buffer** в колонку и центрифугировать 30 секунд. Удалить слив.
6. Добавить 700 мкл буфера для промывания **RNA Wash Buffer** и центрифугировать колонку в течение 30 секунд. Удалить слив.
7. Добавить 400 мкл буфера для промывания **RNA Wash Buffer** и центрифугировать 2 минуты, чтобы полностью удалить остатки промывающего буфера. Перенести колонку в чистую пробирку без нуклеаз (не входит в набор).
8. Добавить 100 мкл ультрачистой воды **DNase/RNase-Free Water** непосредственно на матрикс колонки и центрифугировать 30 секунд.

Для получения более концентрированной РНК можно использовать ≥50 мкл для элюции.

Полученную РНК необходимо сразу заморозить при -70°C

Обработка Протеиназой К (не входит в набор)

Пример:	до 5 мг плотной ткани или 10^6 животных клеток в растворе DNA/RNA Shield	95 мкл
	2X Буфер для расщепления (Кат.# D3050-1-5, D3050-1-20)	95 мкл
	Протеиназа К (Кат.# D3001-2-5, D3001-2-20)	≥6 Ед

Приготовить реакционную смесь Протеиназы К по описанному примеру выше. Инкубировать 55°C 30 минут (например, осадок лейкоцитов) или 1-3 часа (плотные ткани). Затем добавить 1 объем лизирующего буфера **RNA Lysis Buffer** и продолжить этап Просветление образца и удаление геномной ДНК (стр.3).