

Выделение ДНК из клеточных культур на магнитных частицах SileksMagNA-G

Кат. номер: KIDCC0100

Выделение ДНК/РНК из клеточных культур на магнитных частицах SileksMagNA

Кат. номер: KIRCC0100

Назначение набора: выделение нуклеиновых кислот (ДНК и РНК)

Условия хранения: +4°C

Условия транспортировки: особых условий не требуется

Состав набора

Набор содержит количество реагентов, достаточное для проведения 100 процедур выделения.

Компонент набора

• Буфер START	12 мл
• Буфер Lysis&Binding	24 мл
• Магнитные частицы SileksMagNA-G (для кат. номера: KIDCC0100)	1 мл
• Магнитные частицы SileksMagNA (для кат. номера: KIRCC0100)	1 мл
• Буфер Wash 1	30 мл
• Буфер Wash 2	30 мл
• Буфер Wash 3	30 мл
• Буфер Final Wash	30 мл
• Буфер Elution	10 мл
• RNA Protector (для кат. номера: KIRCC0100)	0.5 мл

Мы постоянно работаем над улучшением качества наших наборов и регулярно вносим изменения, улучшающие качество нашей продукции. Пожалуйста, следите за актуальной версией описания к набору. Спрашивайте нас о новых изменениях, чтобы всегда получать наилучшие результаты.

Содержание:

1. Меры предосторожности	2
2. Описание	2
3. Протокол выделения	4
4. Возможные проблемы и их решение	6
Приложение 1	
Долгосрочное хранение нуклеиновых кислот в буфере <i>Final Wash</i>	7
Приложение 2	
RNA Protector	7
5. Рекомендации по модификации протокола	8
6. Комментарии	9
7. Связанные продукты	10
8. Контактные данные	10

1. Меры предосторожности



Некоторые компоненты набора могут нанести вред здоровью в случае проглатывания, ингаляции, попадания на кожу и в глаза.

Не смешивайте компоненты набора с кислотами, сильными щелочами, хлорными дезинфектантами и отбеливателями. Это может привести к реакции с выделением токсичных газов. Если для удаления промывочных буферов Вы используете aspirator, проследите, чтобы колба-ловушка была пуста или не содержала указанных выше компонентов. В наборе используются органические соединения, ингаляционное воздействие которых может вызывать головокружения и головные боли.

Избегайте попадания компонентов набора на одежду, кожу и в глаза.

При попадании в глаза немедленно промойте большим количеством воды, продолжая эту процедуру не менее 15 минут. Эффективность промывания возрастает, если принудительно оттянуть веки пальцами. При сохранении неприятных симптомов (покраснения, раздражённости, жжения) обязательно обратиться за медицинской помощью. В случае попадания на кожу немедленно промойте место контакта с мылом и большим количеством воды.

2. Описание

Набор предназначен для эффективного и быстрого (~40 мин) выделения ДНК и РНК из клеточных культур.

Выделенная ДНК и РНК может использоваться как в ПЦР, так и для любых других молекулярно-биологических применений (мечение, клонирование, секвенирование и т.д.).

В набор входят все необходимые реактивы и буфера. Протокол выделения можно модифицировать для масштабирования, в случае, когда требуется получение большего количества материала. Для масштабирования необходимо пропорционально изменить количества используемых реактивов.

Принцип используемого в наборе метода основан на обратимом связывании нуклеиновых кислот на поверхности магнитных частиц.

На Рисунке 1 схематически представлена процедура выделения нуклеиновых кислот из крови. Общая схема обработки сводится к лизису клеток образца и высвобождению содержащейся в них нуклеиновых кислот, которые затем связываются на магнитных частицах. Связанные нуклеиновые кислоты проходят ряд отмывок с использованием буферов из набора. По окончании отмывок осадок магнитных частиц должен быть высушен. После этого нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК) можно элюировать.

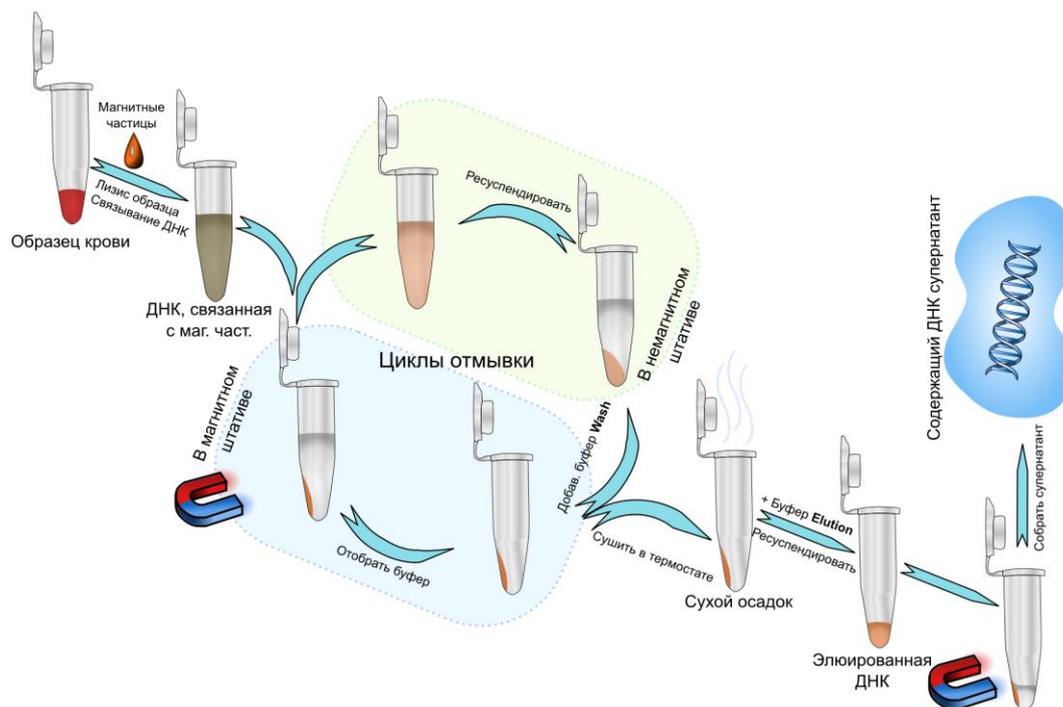


Рисунок 1. Схема процедуры выделения.

Набор оптимизирован для выделения нуклеиновых кислот из примерно 10^5 клеток. Но в каждом конкретном случае может потребоваться оптимизация в зависимости от используемого типа клеток. Основная рекомендация состоит в том, чтобы подобрать то минимальное число клеток, которое необходимо для получения устойчивого и повторяемого результата. Обычно оно лежит в диапазоне от $0,5 \cdot 10^5$ до $5 \cdot 10^5$ клеток в образце.

В зависимости от типа используемых магнитных частиц возможно выделять преимущественно ДНК или ДНК и РНК. Но в любом случае, в полученном препарате всегда будут присутствовать оба типа нуклеиновых кислот. Это очень удобно, например, при изучении экспрессии. Присутствие геномной ДНК позволяет нормализовывать полученные уровни экспрессии по числу клеток, попавших в пробу. Потому что количество ДНК в препарате прямо пропорционально числу клеток, взятых для выделения. А РНК после реакции обратной транскрипции и синтеза первой цепи кДНК позволяет определить собственно сами уровни экспрессии. Затем по определённым формулам с использованием данных о содержании ДНК можно с высокой точностью рассчитать относительные уровни экспрессии в разных образцах, даже если в них попало сильно различающееся число клеток.

3. Протокол выделения

Важно! Перед работой внимательно прочитайте раздел Комментарии.

Перед началом работы:

Проверьте все буфера на предмет наличия осадка. Выпадение осадка не означает порчу буфера. При образовании осадка прогрейте буфер до 50 °С до растворения осадка.

Буфера **Lysis&Binding, Wash 1, Wash 2** должны тщательно встряхиваться перед внесением для образования суспензии.

Фраза "*хорошо перемешанный буфер*" далее по тексту означает, что буфер надо встряхнуть 5-10 раз.

Фраза "*тщательно перемешать*" далее по тексту означает, что раствор надо перемешать одним из следующих способов:

- ручным пипетированием (требуется минимум 15 пипетирований каждого образца для качественного ресуспендирования);
- используя компактный миксер LabMix Mini 201 (5 секунд на низкой или средней скорости).

Выделение ДНК или ДНК/РНК из 0.5 – 5x10⁵ клеток

1. Суспендируйте культуру клеток (если культура прикрепляющаяся, воспользуйтесь одним из стандартных способов для снятия клеток).

Отберите суспензию клеток и произведите подсчёт их числа. Определите тот объём суспензии, который нужно использовать для получения необходимого для выделения числа.

Настоятельно рекомендуем экспериментально подобрать оптимальное число клеток, которое позволяет получать уверенный результат. Нужно иметь в виду, что избыток материала может приводить к ухудшению результата, особенно при выделении РНК.

Необходимое количество суспензии клеток в среде перенесите в чистую пробирку на 1,5 мл.

2. Центрифугируйте пробирку при **5'000 об./мин.** в течение **3 минут**. Осторожно, чтобы не задеть осадок клеток, удалите супернатант.

Добавьте **300 мкл** x1-кратного **PBS**, ресуспендируйте клетки для их отмывки от остатков средовой жидкости.

Повторите центрифугирование при **5'000 об./мин.** в течение **3 минут**. Осторожно, чтобы не задеть осадок клеток, удалите супернатант.

3. Ресуспендируйте клетки в **100 мкл** x1-кратного **PBS**.
4. Добавьте **120 мкл** буфера **START** и тщательно перемешайте раствор.
5. Инкубируйте при комнатной температуре в течение **5 минут**.
Более длительная инкубация (до 15 минут) позволяет повысить выход ДНК/РНК.
6. В отдельной чистой пробирке смешайте следующие компоненты:

240 мкл хорошо перемешанного буфера **Lysis&Binding** и **7 мкл** хорошо перемешанных магнитных частиц (**SileksMagNA-G** для выделения ДНК или **SileksMagNA** для выделения ДНК/РНК). Тщательно перемешайте эту смесь.

7. Добавьте приготовленную суспензию магнитных частиц в пробирку с образцом. Тщательно перемешайте. Инкубируйте в течение **5 минут** при комнатной температуре. Во время инкубации несколько раз перемешайте содержимое пробирки.
8. Поместите пробирку в **магнитный штатив** для сбора частиц (может потребоваться до **1 минуты**). Удалите супернатант. Будьте осторожны, чтобы не захватить магнитные частицы.
9. Поместите пробирку в **немагнитный штатив**. Ресуспендируйте магнитные частицы в **300 мкл** хорошо перемешанного буфера **Wash 1** и тщательно перемешайте до получения гомогенной суспензии.

Перенесите полученную суспензию в чистую 1.5 мл пробирку для дальнейшего выделения.

Инкубируйте в течение **3 минут** при комнатной температуре. Во время инкубации несколько раз перемешайте содержимое пробирки.

Использование шейкера для пробирок улучшает результат и сокращает время процедуры. При использовании шейкера инкубируйте тщательно гомогенизированные частицы в течение **2 минут** при 1250-1500 обор/мин в зависимости от модели шейкера.

Лизис

Wash 1

- Wash 2**
10. Поместите пробирку в **магнитный штатив** для сбора частиц. Удалите супернатант.
11. Поместите пробирку в **немагнитный штатив**. Добавьте **300 мкл** хорошо перемешанного буфера **Wash 2** и тщательно перемешайте до получения гомогенной суспензии.
- Инкубируйте в течение **3 минут** при комнатной температуре. Во время инкубации несколько раз перемешайте содержимое пробирки.
- Использование шейкера для пробирок улучшает результат и сокращает время процедуры.
При использовании шейкера инкубируйте тщательно гомогенизированные частицы в течение **2 минут** при 1250-1500 обор/мин в зависимости от модели шейкера.
- Wash 3**
12. Поместите пробирку в **магнитный штатив** для сбора частиц. Удалите супернатант.
13. Поместите пробирку в **немагнитный штатив**. Добавьте **300 мкл** буфера **Wash 3** и тщательно перемешайте до получения гомогенной суспензии.
- Инкубируйте в течение **3 минут** при комнатной температуре. Во время инкубации несколько раз перемешайте содержимое пробирки.
- Использование шейкера для пробирок улучшает результат и сокращает время процедуры.
При использовании шейкера инкубируйте тщательно гомогенизированные частицы в течение **2 минут** при 1250-1500 обор/мин в зависимости от модели шейкера.
- FinalWash**
14. Поместите пробирку в **магнитный штатив** для сбора частиц. Удалите супернатант.
15. Поместите пробирку в **немагнитный штатив**. Добавьте **300 мкл** буфера **FinalWash** и тщательно перемешайте до получения гомогенной суспензии.
- Инкубируйте в течение **3 минут** при комнатной температуре. Во время инкубации несколько раз перемешайте содержимое пробирки.
- Использование шейкера для пробирок улучшает результат и сокращает время процедуры.
При использовании шейкера инкубируйте тщательно гомогенизированные частицы в течение **2 минут** при 1250-1500 обор/мин в зависимости от модели шейкера.
- Важно!** На этой стадии (когда частицы находятся в буфере **Final Wash**) ДНК/РНК, связанная с частицами, может храниться длительное время без разрушения.
Температура хранения может варьировать от комнатной (+22 °С) до -70 °С. Для завершения выделения переходите к пункту 14 данного протокола.
- Элюция**
16. Поместите пробирку в **магнитный штатив** для сбора частиц. Удалите супернатант.
17. Инкубируйте пробирку в **термостате при 60 °С** в течение **5 минут**, чтобы высушить осадок частиц.
18. Добавьте **50 мкл** буфера **Elution**. Тщательно ресуспендируйте частицы до получения гомогенной суспензии.
*Если хотите получить большую концентрацию ДНК/РНК, используйте 25 мкл буфера **Elution** вместо 50 мкл.*
19. Инкубируйте в **термостате при 60 °С** в течение **5 минут** или **10 минут** при **комнатной температуре**.
- Инкубирование при комнатной температуре позволяет получить ДНК/РНК с меньшим количеством примесей.
20. Поместите пробирку в **магнитный штатив** для сбора частиц. Перенесите ДНК/РНК-содержащий супернатант в чистую пробирку.
21. Если целью выделения была РНК, сразу после отбора супернатанта, содержащего ДНК и РНК, вносите в образец реагент **RNA Protector**. Этот препарат стабилизирует РНК при хранении и последующем проведении ферментативных реакций.
- Храните полученный раствор с выделенной нуклеиновой кислотой при -20 °С.

4. Возможные проблемы и их решение

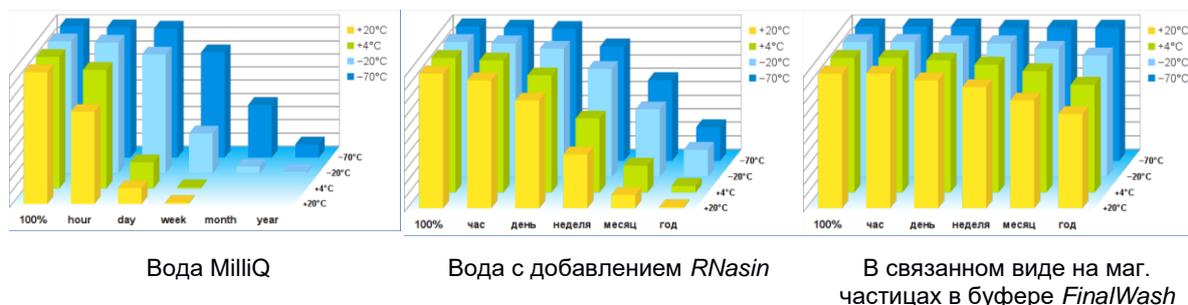
Чистота выделенной нуклеиновой кислоты определяется спектрофотометрически соотношением оптических плотностей при длине волны 260 и 280 нм. Соотношение OD_{260}/OD_{280} должно быть в диапазоне 1,7 – 2,0.

Проблема	Возможные причины	Решение
Низкий выход ДНК	A. Состояние образца 1. В образце находится недостаточное количество ДНК-содержащих клеток. 2. Образец долго хранился или несколько раз подвергался замораживанию-оттаиванию.	1. Возьмите больше исходного материала или проводите элюцию в меньшее количество буфера 2. Проведите сбор материала повторно.
	B. Неполное высушивание частиц перед добавлением элюирующего буфера	Увеличьте время сушки после удаления буфера <i>FinalWash</i> .
	C. Неполный лизис	После внесения буфера <i>START</i> как можно тщательнее суспендируйте образец.
	D. Большой объем буфера <i>Elution</i>	Подберите оптимальный объем буфера, чтобы получить желаемую концентрацию ДНК.
Соотношение OD_{260}/OD_{280} слишком низкое	A. Примеси белка	1. В каждой процедуре, где используются частицы, добивайтесь максимально тщательного их суспендирования. 2. Используйте меньшее количество частиц или большее количество буфера <i>Elution</i> .
	B. Неполное удаление компонентов промывочных буферов, в первую очередь <i>FinalWash</i>	1. Убедитесь, что температура в термостате обеспечивает полное высушивание осадка, отрегулируйте время и температуру таким образом, чтобы обеспечить высушивание осадка 2. Некоторые магнитные штативы собирают магнитные частицы в компактную точку, что ухудшает процесс просушки осадка. Подберите штатив, где осадок распределяется более равномерно по стенке пробирки.
Нуклеиновая кислота на электрофореze выглядит деградировавшей	Старый образец, либо образец подвергался замораживанию-оттаиванию	Проведите сбор материала повторно. Избегайте замораживания/размораживания образца в процесс транспортировки и хранения.

Приложение 1

Долгосрочное хранение нуклеиновых кислот в буфере *FinalWash*

На диаграммах показана стабильность РНК при хранении в различных условиях:



Наши экспериментальные данные показывают, что хранение нуклеиновых кислот в связанном виде с магнитными частицами в буфере *FinalWash* является наиболее эффективным способом долгосрочной защиты от деградации.

Приложение 2

RNA Protector

RNA Protector является веществом небелковой природы, предназначенным для защиты препаратов РНК.

Этот препарат стабилизирует РНК в ферментативных реакциях и защищает РНК от действия РНаз и от оксидативных повреждений. Поскольку этот препарат небелковой природы, он не теряет активности при замораживании и нагреве, как в случае со стандартными белковыми ингибиторами рибонуклеаз.

Мы рекомендуем использовать ***RNA Protector*** в первую очередь со следующими нашими наборами:

- Выделение ДНК/РНК из плазмы и сыворотки крови на магнитных частицах SileksMagNA (KIRPS0100),
- Выделение циркулирующей нуклеиновой кислоты из плазмы и сыворотки крови на магнитных частицах SileksMagNA (KIRCNA1000) и SileksMagNA-Direct (KIRCNA2000),
- Выделение ДНК/РНК из фиксированных в формалине парафинизированных (FFPE) образцов (KIRFFPE0100),
- Выделение ДНК/РНК из клеточных культур (KIRCC0100),

Также мы рекомендуем использовать ***RNA Protector*** во всех случаях, где предметом дальнейшего исследования будет РНК.

RNA Protector следует сразу же вносить в собранный после элюции образец.

Рекомендуемое количество ***RNA Protector*** составляет $1/10$ от объема, добавляемого для элюции.

Например, если для элюции использовали 50 мкл элюирующего буфера, после элюции и отбора собранного препарата нужно добавить 5 мкл препарата ***RNA Protector***.

Принцип действия ***RNA Protector*** отличается от принципа действия белковых ингибиторов рибонуклеаз. Поэтому ***RNA Protector*** мы рекомендуем использовать только для предварительно очищенных препаратов РНК. Не следует использовать ***RNA Protector*** для задач, где требуется направленное ингибирование рибонуклеаз или других подобных ферментов.

RNA Protector идеально подходит в случаях, когда после получения препарата, содержащего РНК, требуются дополнительные процедуры, включающие длительную инкубацию при повышенной температуре (например, обработка ДНКазой для удаления следов ДНК с последующей инактивацией

фермента).

5. Рекомендации по модификации протокола

1. Процедура выделения, описанная в приведенном выше протоколе, может быть использована с небольшими модификациями для выделения из разного количества клеток.

Для выделения из бóльшего количества клеток необходимо ресуспендировать клетки перед выделением в бóльшем объеме буфера Sample Prep.

Соответственно, для выделения из начального образца, отличающегося по начальному количеству от приведенного в протоколе, следует придерживаться следующего соотношения:

$$N \text{ мкл образца} : 1.2 \times N \text{ мкл буфера } \mathbf{START} : 2.4 \times N \text{ мкл буфера } \mathbf{Lysis\&Binding}$$

где N - количество мкл образца, взятого в качестве исходного объема.

Не пытайтесь использовать меньше буфера **Lysis&Binding**, чем в приведенном соотношении. Это приведет к ухудшению качества образца и, как следствие, снижению чувствительности в ПЦР.

2. Рекомендуемое нами количество - 300 мкл каждого промывочного буфера. Однако, в зависимости от качества вашей пробы, из которой осуществляется выделение, и задач, может потребоваться оптимизировать количество промывочных буферов. Для оптимизации мы рекомендуем увеличивать количество промывочных буферов с шагом 50 мкл, но не более чем 600 мкл.
3. Элюция происходит с максимальной эффективностью, когда количество добавляемого буфера для элюции составляет от 3-х объемов и выше к объему используемых при выделении частиц. Минимально допустимый объем элюирующего буфера должен составлять не менее 2-х объемов к объему частиц.
4. Основным критерием качества выделения является ПЦР. Мы рекомендуем не особенно доверять методам определения количества выделенной нуклеиновой кислоты на спектрофотометре и другим методам оптической детекции. Влияние примесей и вносимые в наборы других фирм соосадители разной природы могут создавать ложное впечатление о результативности выделения.

ВАЖНОЕ ПРИМЕЧАНИЕ

Качественное суспендирование частиц является ключевым моментом для получения хорошего результата.

Для получения высоких выхода и чистоты ДНК/РНК необходимо тщательно ресуспендировать частицы на каждом этапе отмывок.

6. Комментарии

Общие замечания

Количество выделяемой ДНК или ДНК/РНК зависит от количества ДНК-содержащих клеток. Теоретическая емкость частиц составляет 10 мкг тотальной нуклеиновой кислоты на 10 мкл магнитных частиц.

Чтобы обеспечить максимально полное выделение тотальной нуклеиновой кислоты (ДНК и все виды РНК) необходимо правильно подобрать соотношение:

Исходный образец / Кол-во магнитный частиц.

Для корректного подбора и контроля выделения мы рекомендуем использовать в процесс выделения вносимый внешний контроль, приблизительно соответствующий по своим параметрам (длина, концентрация и т.п.) нуклеиновой кислоте, которую планируете выявлять.

Комментарии к пунктам протокола

п.6. Магнитные частицы (**SileksMagNA** или **SileksMagNA-G**) перед использованием должны быть в обязательном порядке смешаны с буфером **Lysis&Binding**. Внесение частиц отдельно, до или после добавления буфера **Lysis&Binding** ухудшают результаты выделения.

При постоянной работе частицы можно заранее смешать с буфером **Lysis&Binding** и хранить в виде суспензии при +4 °С. Перед использованием частицы в буфере необходимо тщательно перемешать.

п.7. Частицы для максимальной сорбции должны быть равномерно распределены по всему объему. В процессе инкубации следите, чтобы частицы не оседали. Если это происходит, перемешайте содержимое пробирки до гомогенной суспензии.

п.п.9-15. После тщательного ресуспендирования в промывочных буферах частицам необходима инкубации в течение 3-5 минут при ручном выделении и 1-2 минуты с использованием шейкера со скоростью 1250-1500 обор/мин в зависимости от модели конкретного шейкера.

п. 15. Длительное хранение выделяемой нуклеиновой кислоты (ДНК и РНК) на частицах в буфере **Final Wash** позволяет проводить накопление образцов, выделяя их до данной стадии по мере поступления, с последующим одновременным окончательным выделением. Такой подход позволяет исключить возможность повреждения выделенной нуклеиновой кислоты в процессе хранения.

п. 19. Инкубирование более 5 минут при 60 °С может приводит к снижению чистоты выделяемой нуклеиновой кислоты за счет элюции частично сорбированных на частицах загрязняющих компонентов.

При хранении выделенной нуклеиновой кислоты нужно избегать замораживания-оттаивания, так как это приводит к фрагментации, вплоть до полного разрушения. Поэтому мы настоятельно рекомендуем использовать нуклеиновую кислоту для дальнейшей работы непосредственно после ее выделения.

При необходимости получения исключительно ДНК или РНК, мы рекомендуем после выделения провести дополнительную обработку образца соответствующим ферментом – ДНКазой или РНКазой – с последующим обязательным переосаждением оставшейся нуклеиновой кислоты. Для такого переосаждения мы рекомендуем использовать наш набор «Очистка ДНК/РНК после ферментативных реакций», кат. номер K0900.

При дальнейшей работе с РНК соблюдайте следующие правила:

в реакцию синтеза первой цепи вносите полученный элюат в количестве не более 1/8 объема от конечного объема реакционной смеси.

Рекомендуемое количество, вносимое в реакцию - 1/10 объема.

Например, при постановке реакции синтеза первой цепи в объеме 25 мкл рекомендуемое

количество элюата – не более 3 мкл. Использование большего количества элюата может приводить к ингибированию реакции.

7. Связанные продукты

1. **Магнитные частицы SileksMagNA**, 1 мл, кат. номер K0171
Магнитные частицы SileksMagNA-G, 1 мл, кат. номер K0172
2. **Лабораторный миксер LabMix Mini 201**, кат. номер EQMM201
Миксер позволяет ускорить процедуру выделения, заменяя пипетирование.
3. **Магнитные штативы для работы с магнитными частицами**
MagRack6, кат. номер EQMR006-2
MagRack16, кат. номер EQMR016
MagRack40, кат. номер EQMR040
MagRack50ML, кат. номер EQMR50ML

8. Контактные данные

телефон: +7 495 737 4224

эл. почта: info@sileks.com