

Выделение ДНК/РНК из почвы на магнитных частицах SileksMagNA

Кат. номер: KIRSL0100

Назначение набора: выделение нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) из почвы

Условия хранения: +4°C

Условия транспортировки: особых условий не требуется

Состав набора

Набор содержит количество реагентов, достаточное для проведения 100 процедур выделения. Одно выделение предполагает использование 100-150 мг исходного образца почвы.

Компонент набора

• Буфер Lysis	50 мл
• Буфер Cleaning	30 мл
• Буфер Binding	30 мл
• Стекланные шарики для гомогенизации	10 мл
• Магнитные частицы SileksMagNA	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	0.5 мл

Содержание:

1. Меры предосторожности	2
2. Описание	3
3. Протокол выделения	4
4. Приложения	
Приложение 1	
Долгосрочное хранение нуклеиновых кислот в буфере <i>Final Wash</i>	6
Приложение 2	
<i>RNA Protector</i>	6
5. Комментарии	7
6. Связанные продукты	7
7. Контактные данные	7

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 выделения ДНК и РНК из образцов почвы. Набор позволяет получить чистую ДНК и РНК, пригодную для дальнейших процедур (синтез первой цепи, полимеразная реакция, гибридизация). Использование различных образцов почв может потребовать оптимизации протокола выделения.

Особенности при работе с почвой

Почва является одним из наиболее трудных образцов для работы. Образцы почв имеют отличия по целому ряду параметров: присутствие микроорганизмов разных типов в разном количестве, разный химический состав, структура и кислотность. Все эти особенности необходимо учитывать при выделении ДНК и РНК из образца почвы.

Основным фактором, влияющим на качество выделяемой ДНК и РНК является количество гуминовых субстанций (гуминовые кислоты, фульвовые кислоты, гумины) в конкретном образце почвы. Эти субстанции представляют собой большие стабильные макромолекулы, отличающиеся по размеру и имеющие в своем составе как фенольные, так и карбоксильные группы.

Поскольку гуминовые и фульвовые кислоты водорастворимыми анионными полимерами, такими же как ДНК и РНК, они часто выделяются в качестве примесей вместе с нуклеиновыми кислотами.

Больше не всегда лучше

В средне гумированном образце почвы (например, почва из сада) содержится в среднем 8-20 мкг ДНК на грамм почвы. РНК выделяется обычно в количестве 10-20% от количества ДНК.

При работе с образцами почв необходимо иметь в виду, что чистота и пригодность выделенной ДНК и РНК для последующих ферментативных реакций является более важной характеристикой, чем абсолютное количество.

Предлагаемый нами протокол рассчитан на получение ДНК и РНК максимальной чистоты. В нашем протоколе мы ориентировались на почву с повышенным содержанием гуминовых субстанций. Для песчаных и глинистых почв может потребоваться оптимизация количества исходного образца, количества буферов Lysis, Cleaning, Binding должны быть изменены пропорционально количеству взятой пробы с протоколов. Буфера для промывки и элюции всегда должны применяться в количествах, рекомендованных в протоколе.

Шарики для гомогенизации

При подготовке образца мы предлагаем специально подобранную смесь стеклянных шариков разного размера, которые максимально эффективно разрушают различные типы микроорганизмов от бактерий до грибов и спор.

Существует много различных шариков для гомогенизации отличающихся по размеру (от 0.1 до 3 мм), плотности (от 2 до 20 г/см³), материалу (стекло, цирконий, разные типы карбидов, керамика, сталь), типу поверхности (круглые, нерегулярные с острыми гранями). Предлагаемые в данном наборе шарики можно заменять на шарики, более подходящие для ваших целей. При подготовке образца мы рекомендуем использовать шарики размером от 0.1 до 0.5 мм.

Для гомогенизации с шариками рекомендуется использовать специальные гомогенизаторы. При отсутствии гомогенизатора можно воспользоваться обычным лабораторным миксером.

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.

3. Протокол выделения

Обязательно прочитайте перед началом работ!

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 **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 и РНК из 100-150 мг почвы

- | | |
|-----------------------|--|
| Л
и
з
и
с | <ol style="list-style-type: none"> 1. Внесите навеску почвы в количестве 100-150 мг в 2 мл пробирку. 2. Добавьте 100 мкл (по объему) шариков для гомогенизации. 3. Внесите 400 мкл буфера Lysis.
Поместите пробирку в гомогенизатор или встряхивайте пробирку на вортексе в течение 5 минут.
<i>Более длительная гомогенизация (до 15 минут) позволяет повысить выход ДНП и РНК, но также увеличивает степень деградации ДНК и РНК.</i> 4. Центрифугируйте пробирку с гомогенатом при 12,000-14,000 об./мин в течение 5 минут. 5. Перенесите 200 мкл супернатанта в новую пробирку и добавьте 200 мкл буфера Cleaning. Перемешайте содержимое пробирки на вортексе, 6. Инкубируйте пробирку при -20 °С в течение 30 минут. 7. Центрифугируйте пробирку с гомогенатом при 12,000-14,000 об./мин в течение 5 минут. 8. Перенесите 350 мкл супернатанта в новую пробирку.
Последовательно добавьте 175 мкл буфера Binding и 5 мкл магнитных частиц SileksMagNA.
тщательно перемешайте до получения гомогенной суспензии содержимое пробирки до получения гомогенной суспензии.
Не используйте вортекс! 9. Инкубируйте пробирку при комнатной температуре в течение 3 минут. Во время инкубации несколько раз перемешайте содержимое пробирки. 10. Поместите пробирку в магнитный штатив для сбора частиц (может потребоваться до 1 минуты). Удалите супернатант. Будьте осторожны, чтобы не захватить магнитные частицы. 11. 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 1.5 мл пробирку для дальнейшего выделения.
Инкубируйте в течение 3 минут при комнатной температуре. Во время инкубации несколько раз перемешайте содержимое пробирки. |
| W
a
s
h
1 | <p>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.</p> <ol style="list-style-type: none"> 12. Поместите пробирку в магнитный штатив для сбора частиц. Удалите супернатант. 13. 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. |
| W
a
s
h
2 | <p>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.</p> |

14. Поместите пробирку в **магнитный штатив** для сбора частиц. Удалите супернатант.
15. 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.
- Wash 3**
- 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.
16. Поместите пробирку в **магнитный штатив** для сбора частиц. Удалите супернатант.
17. 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.
- FinalWash**
- 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 и 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.
18. Поместите пробирку в **магнитный штатив** для сбора частиц. Удалите супернатант.
19. Инкубируйте пробирку в **термостате при 60 °С** в течение **5 минут**, чтобы высушить осадок частиц.
20. 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.
- Элюция**
21. Инкубируйте в **термостате при 60 °С** в течение **5 минут**.
22. Поместите пробирку в **магнитный штатив** для сбора частиц. Перенесите ДНК- и РНК-содержащий супернатант в чистую пробирку.
- Если для дальнейшей работы требуется РНК, внесите в собранный супернатант препарат **RNA Protector** в количестве **5 мкл** (¹/₁₀ от объема)
- Храните полученный раствор с выделенной нуклеиновой кислотой при -20 °С.

Дальнейшая работа с РНК

Для дальнейшей работы с РНК требуется удаление присутствующей в образце ДНК. Для этого полученный препарат должен быть обработан ДНКазой с последующим переосаждением оставшейся РНК. Для переосаждения РНК мы рекомендуем набор [Очистка ДНК/РНК после ферментативных реакций](#), кат. № K0900.

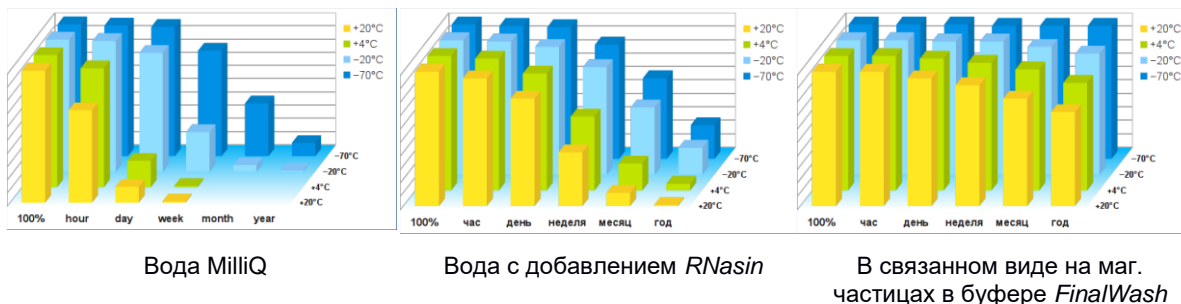
Полученную после очистки РНК мы рекомендуем сразу использовать для получения кДНК, так как очищенная РНК нестабильна и плохо хранится даже при низких температурах.

4. Приложения

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 окислительных 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 ДНКазами для удаления следов ДНК с последующей инактивацией фермента).

5. Комментарии

1. Магнитные частицы **SileksMagNA** перед использованием должны быть обязательно тщательно суспендированы.
2. 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.
3. 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.
4. 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. Для более надежного сохранения РНК можно также дополнительно вносить ингибитор рибонуклеаз.
5. 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 постановки реакции синтеза первой цепи в объеме 25 мкл рекомендуемое количество элюата – не более 3 мкл. Использование большего количества элюата может приводить к ингибированию реакции.

6. Связанные продукты

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

7. Контактные данные

телефон: +7 495 737 4224

эл. почта: info@sileks.com