

Выделение ДНК/РНК из плазмы
и сыворотки крови на
магнитных частицах
SileksMagNA

Кат. номер: KIRPS0100

Выделение циркулирующей
нуклеиновой кислоты
(ДНК и РНК) из плазмы и
сыворотки на магнитных
частицах SileksMagNA

Кат. номер: KIRCNA1000

Назначение набора: выделение тотальной циркулирующей нуклеиновой кислоты (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. Одно выделение предполагает использование 100 мкл (KIRPS0100) или 1 мл (KIRCNA1000) плазмы или сыворотки.

Компонент набора	KIRPS0100	KIRCNA1000
• Буфер START	12 мл	120 мл
• Буфер Lysis&Binding	24 мл	240 мл
• Магнитные частицы SileksMagNA	1 мл	1 мл
• Буфер Wash 1	30 мл	30 мл
• Буфер Wash 2	30 мл	30 мл
• Буфер Wash 3	30 мл	30 мл
• Буфер Final Wash	30 мл	30 мл
• Буфер Elution	10 мл	10 мл
• RNA Protector	0.5 мл	0.5 мл

Содержание:

1. Меры предосторожности	2
2. Описание	2
3. Подготовка плазмы	4
4. Протокол выделения	
Выделение из 100 мкл плазмы или сыворотки (KIRPS0100)	5
Выделение из 1 мл плазмы или сыворотки (KIRCNA1000)	7
Приложение 1	
Долгосрочное хранение нуклеиновых кислот в буфере <i>FinalWash</i>	9
Приложение 2	
<i>RNA Protector</i>	9
5. Рекомендации по модификации протокола	10
6. Комментарии	11
7. Связанные продукты	12
8. Контактные данные	12

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 (~30 мин) выделения свободно циркулирующей нуклеиновой кислоты (мРНК, экзосомальная РНК, вирусная РНК, ДНК, вирусная ДНК) из сыворотки или плазмы крови. Выделенные нуклеиновые кислоты могут использоваться как в ПЦР, так и для любых других молекулярно-биологических применений (синтез кДНК путём обратной транскрипции, мечение, клонирование, секвенирование и т.д.). Принцип используемого в наборе метода основан на обратимом связывании нуклеиновых кислот на поверхности магнитных частиц. Протокол выделения можно модифицировать для масштабирования, в случае, когда требуется получение большего количества ДНК/РНК.

ДНК и РНК являются составными частями клеток. Небольшое количество нуклеиновых кислот обнаруживается свободно циркулирующим в крови. Эти молекулы ДНК и РНК образуются как в

ходе разрушения клеток, так и в ходе нормальной секреторной активности клеток, в ходе которой происходит образование внеклеточных везикул (экзосомы и другие), содержимое которых выбрасывается в кровотоки. Также источником циркулирующих нуклеиновых кислот могут служить находящиеся в кровотоке вирусы и бактерии. Используя анализ циркулирующей нуклеиновой кислоты, можно обнаруживать рак на ранних стадиях, вирусные инфекции, проводить неинвазивную перинатальную диагностику в период беременности, выявлять различные формы диабета и многое другое.

В зависимости от задач могут использоваться разные количества исходного материала - от 100 мкл до 10 мл плазмы или сыворотки.

Терминология:

Плазма крови – это жидкий компонент цельной крови. В ней нет клеток, но содержатся все белки (глобулины, альбумины, фибриногены и др.), электролиты, факторы свёртывания и прочие неклеточные компоненты крови. Простейший способ отделить плазму от крови – это центрифугирование цельной крови при 2000–3000×G в течение 5 минут.

В упрощённом виде это можно представить как: **Плазма = [Кровь] - [Клетки]**

Сыворотка крови – это плазма крови, лишённая факторов свёртывания и прочих белков, вовлечённых в этот процесс. Обычно это жидкость, которая остаётся после свёртывания крови (коагуляции).

В упрощённом виде это можно представить как: **Сыворотка = [Плазма] - [ФакторыСвёртывания]**

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

На Рисунке 1 схематически представлена процедура выделения. После лизирования образца, содержащиеся в нём нуклеиновые кислоты связываются с магнитными частицами. Затем они должны быть отмыты буферами из набора. После нескольких циклов отмытки осадок магнитных частиц должен быть высушен, после чего можно элюировать нуклеиновые кислоты.

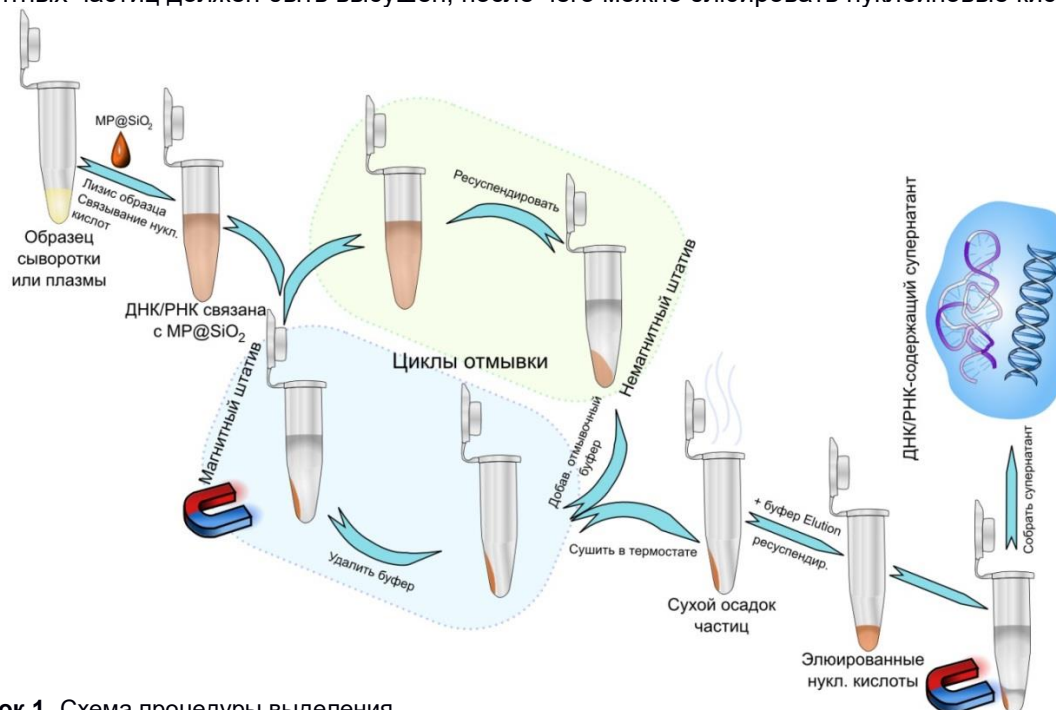


Рисунок 1. Схема процедуры выделения.

3. Подготовка плазмы

Правильная подготовка плазмы - очень важная процедура.

В процессе транспортировки и хранения образца крови, клетки могут разрушаться. В результате в образце образуется дополнительный пул нуклеиновых кислот, не относящихся к цНК. Наличие нуклеиновых кислот от разрушенных в процессе транспортировки клеток крови снижает достоверность и чувствительность выявления истинных цНК.

Для предотвращения разрушения клеток крови в процессе хранения и транспортировки мы рекомендуем использовать для забора крови пробирки со специальными стабилизаторами. Такими стабилизаторами могут являться КзЭДТА, формальдегид и другие реагенты, повышающие стабильность клеток.

Самый надежный способ подготовки качественной плазмы - отделение плазмы сразу после получения образца крови с последующим хранением при температуре не выше +4°C. Для длительного хранения плазму можно замораживать при -20°C или -70°C.

Мы рекомендуем для отделения плазмы использовать следующую процедуру:

1. Центрифугируйте образец крови при комнатной температуре при 400 x *g* , 20 минут.
Мягкое центрифугирование необходимо для предотвращения повреждения клеток крови.
2. Осторожно отберите плазму в другую пробирку. При отборе плазмы избегайте захватывания клеток, собравшихся на разделе фаз.
3. Центрифугируйте собранную плазму при комнатной температуре при 5000 x *g* , 10 минут.
Повторное центрифугирование позволяет удалить оставшиеся в плазме клетки.
4. Отберите плазму в новую пробирку.
Храните плазму при температуре не выше +4°C.

Рекомендуемое время хранения плазмы:

- +4 °C - до 2-х недель
- 20 °C - до 1 года
- 70 °C - несколько лет

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

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 из 100 мкл плазмы или сыворотки (KIRPS0100)

- Л и з и с**
1. Внесите **100 мкл** плазмы или сыворотки крови в 1.5 мл пробирку.
 2. Добавьте **120 мкл** хорошо перемешанного буфера **START** и тщательно перемешайте раствор.
 3. Инкубируйте при комнатной температуре в течение **5 минут**.
Более длительная инкубация (до 15 минут) позволяет повысить выход ДНК/РНК.
 4. В отдельной чистой пробирке смешайте следующие компоненты: **240 мкл** хорошо перемешанного буфера **Lysis&Binding** и **5 мкл** хорошо перемешанных магнитных частиц **SileksMagNA**. Тщательно перемешайте эту смесь.
 5. 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.

Использование шейкера для пробирок улучшает результат и сокращает время процедуры.
При использовании шейкера инкубируйте тщательно гомогенизированные частицы в течение **5 минут** при 1250-1500 обор/мин в зависимости от модели шейкера.
 6. Поместите пробирку в **магнитный штатив** для сбора частиц (может потребоваться до **1 минуты**). Удалите супернатант. Будьте осторожны, чтобы не захватить магнитные частицы.
 7. 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.

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.
 8. Поместите пробирку в **магнитный штатив** для сбора частиц. Удалите супернатант.
 9. 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.
 10. Поместите пробирку в **магнитный штатив** для сбора частиц. Удалите супернатант.
 11. 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.
- Wash 1**
- Wash 2**
- Wash 3**

12. Поместите пробирку в **магнитный штатив** для сбора частиц. Удалите супернатант.
13. 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°C) до -70°C. Для завершения выделения переходите к пункту 14 данного протокола.

FinalWash

14. Поместите пробирку в **магнитный штатив** для сбора частиц. Удалите супернатант.
15. Инкубируйте пробирку в **термостате при 60°C** в течение **5 минут**, чтобы высушить осадок частиц.
16. 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

17. Инкубируйте в **термостате при 60 °C** в течение **5 минут**.
18. Поместите пробирку в **магнитный штатив** для сбора частиц. Перенесите ДНК/РНК-содержащий супернатант в чистую пробирку.
19. Если в дальнейшем планируется работа с РНК, внесите в собранный ДНК/РНК-содержащий супернатант **5 мкл** реагента **RNA Protector** ($1/10$ от объема добавленного буфера **Elution**).

Храните полученный раствор с выделенной нуклеиновой кислотой при -20°C или -70°C.

Мы рекомендуем как можно скорее после выделения провести постановку реакции обратной транскрипции, так как растворенная РНК может деградировать в процессе хранения, даже при замораживании при низкой температуре.

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 °C до растворения осадка.

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

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 из 1 мл плазмы или сыворотки (KIRCNA1000)

- | | |
|-----------------------|---|
| Л
и
з
и
с | <ol style="list-style-type: none"> 1. Внесите 1 мл плазмы или сыворотки крови в пробирку на 15 мл. 2. Добавьте 1.2 мл хорошо перемешанного буфера START и тщательно перемешайте раствор. 3. Инкубируйте при комнатной температуре в течение 5 минут.
<i>Более длительная инкубация (до 15 минут) позволяет повысить выход ДНК/РНК.</i> 4. В отдельной чистой пробирке смешайте следующие компоненты: 2.4 мл хорошо перемешанного буфера Lysis&Binding и 10 мкл хорошо перемешанных магнитных частиц SileksMagNA. Тщательно перемешайте эту смесь. 5. Добавьте приготовленную суспензию магнитных частиц в пробирку с образцом. Тщательно перемешайте. Инкубируйте в течение 15 минут при комнатной температуре. Мы рекомендуем использовать перемешивание на ротаторе во время инкубации.

Использование шейкера для пробирок улучшает результат и сокращает время процедуры. При использовании шейкера инкубируйте тщательно гомогенизированные частицы в течение 10 минут при 1250-1500 обор/мин в зависимости от модели шейкера. 6. Поместите пробирку в магнитный штатив для сбора частиц (может потребоваться до 1 минуты). Удалите супернатант. Будьте осторожны, чтобы не захватить магнитные частицы. 7. 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.

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. |
| W
a
s
h
1 | <ol style="list-style-type: none"> 8. Поместите пробирку в магнитный штатив для сбора частиц. Удалите супернатант. 9. 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. |
| W
a
s
h
2 | <ol style="list-style-type: none"> 10. Поместите пробирку в магнитный штатив для сбора частиц. Удалите супернатант. 11. 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. |
| W
a
s
h
3 | <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** 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°C) до -70°C. Для завершения выделения переходите к пункту 14 данного протокола.

FinalWash

14. Поместите пробирку в **магнитный штатив** для сбора частиц. Удалите супернатант.

15. Инкубируйте пробирку в **термостате при 60°C** в течение **5 минут**, чтобы высушить осадок частиц.

16. Добавьте **30 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

17. Инкубируйте в **термостате при 60 °C** в течение **5 минут**.

18. Поместите пробирку в **магнитный штатив** для сбора частиц. Перенесите ДНК/РНК-содержащий супернатант в чистую пробирку.

19. Если в дальнейшем планируется работа с РНК, внесите в собранный ДНК/РНК-содержащий супернатант **3 мкл** реагента **RNA Protector** ($1/10$ от объема добавленного буфера **Elution**).

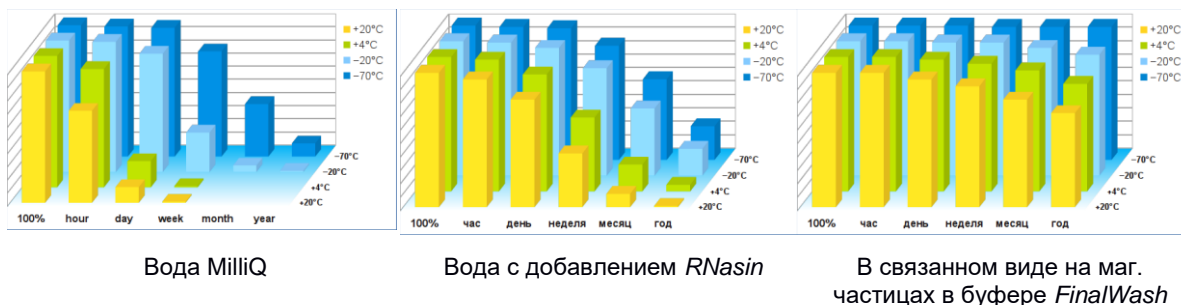
Храните полученный раствор с выделенной нуклеиновой кислотой при -20°C или -70°C.

Мы рекомендуем как можно скорее после выделения провести постановку реакции обратной транскрипции, так как растворенная РНК может деградировать в процессе хранения, даже при замораживании при низкой температуре.

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 ДНКазами 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 плазмы или сыворотки от 100 мкл до 5 мл.

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

П мл плазмы или сыворотки : 1.2 x П мл буфера **START** : 2.4 x П мл буфера **Lysis&Binding**

где П - количество мл плазмы или сыворотки, взятого в качестве исходного образца.

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

2. Мы рекомендуем брать магнитные частицы в следующих количествах:

от 100 мкл до 1 мл исходного образца - 5 мкл,
от 1 мл до 5 мл исходного образца - 10 мкл.

Однако, в зависимости от качества вашей пробы, из которой осуществляется выделение, и задач, может потребоваться оптимизировать количество магнитных частиц.

Для оптимизации мы предлагаем исходить из рекомендованных нами количеств, увеличивая количество частиц с шагом 2.5 мкл, но не более чем в 2 раза к рекомендованным количествам.

3. При выделении из любого количества исходного образца следует использовать не менее 200 мкл промывочных буферов. 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.

4. 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.

5. При оценке качества выделения мы рекомендуем отдавать предпочтение методам на основе ПЦР по сравнению с методами определения количества выделенной нуклеиновой кислоты на спектрофотометре и другим методам оптической детекции. Следует использовать соответствующую нормализацию, особенно при сопоставлении концентраций нуклеиновых кислот, выделенных с помощью данного набора и с помощью наборов других производителей. 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 выходов и чистоты ДНК/РНК необходимо тщательно ресуспендировать частицы на каждом этапе отмывок.

6. Комментарии

Общие замечания

В 1 мл плазмы здорового человека содержится в среднем от 1 до 50 нг циркулирующей нуклеиновой кислоты (цНК). Количество цНК увеличивается в плазме больных людей, в особенности у онкологических больных, и у беременных женщин.

Низкая концентрация получаемой цНК делает бессмысленным использование спектрофотометрических методов оценки выделенного материала, даже с использованием интеркалирующих флуоресцентных красителей. Единственным правильным методом оценки является количественная ПЦР.

При конструировании праймеров и зондов нужно принимать во внимание сильную фрагментацию цНК, поэтому размер ампликона по возможности не должен превышать 100 п.н.. При исследовании РНК мы не рекомендуем использовать олиго(дТ) праймеры для синтеза первой цепи. Использование рандомизированных праймеров обычно позволяет увеличить чувствительность метода. Некоторые исследователи предпочитают использование геноспецифических праймеров для увеличения специфичности детекции, но это может уменьшать чувствительность метода.

Комментарии к пунктам протокола

1. Перед использованием плазмы или сыворотки убедитесь, что она не содержит клеток крови. Если есть подозрения, что в плазме присутствуют клетки крови, повторите процедуру подготовки плазмы (см. раздел Подготовка плазмы).
При использовании замороженной плазмы после оттаивания плазмы тщательно перемешайте ее до равномерного состояния.
4. Магнитные частицы **SileksMagNA** 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 **SileksMagNA** можно заранее смешать с буфером **Lysis&Binding** и хранить в виде суспензии при +4 °С. Перед использованием частицы в буфере необходимо тщательно перемешать.
5. 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.
13. 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.
17. Инкубирование более 5 минут приводит к снижению чистоты выделяемой нуклеиновой кислоты за счет элюции частично сорбированных на частицах загрязняющих компонентов.
19. 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.
20. 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 - 3 мкл. Использование большего количества элюата может приводить к ингибированию реакции.

Хранение цНК, которая и так является в значительной степени фрагментированной, приводит к еще более сильной фрагментации, вплоть до полного разрушения. Поэтому мы настоятельно рекомендуем использовать нуклеиновую кислоту для дальнейшей работы непосредственно после ее выделения

7. Связанные продукты

1. Магнитные частицы SileksMagNA, 1 мл , кат. номер K0171
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
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