



Инструкция по использованию реагента EverFresh DNA

Введение

Данная инструкция не является пошаговым протоком с жестко прописанными манипуляциям и окончательными объемами в миллилитрах. Данная инструкция является обобщенным изложением общих рекомендаций по использованию реагента EverFresh (EverFresh DNA или EverFresh RNA).

Реагент EverFresh представляет собой реагент для хранения самых разных биологических объектов – микроорганизмы, комары, клещи, фрагменты тканей животных и операционный человеческий материал.

Существует три основных этапа в работе с реагентом EverFresh:

1. начальный и самый важный – замачивание объекта в реагенте EverFresh,
2. хранение образца в реагенте EverFresh в течение необходимого времени,
3. извлечение образца из реагента EverFresh для выделения РНК.

Процедура замачивания критически зависит от количества и объема материала, а также от его консистенции (клеточная суспензия/осадок, обычная ткань, плотная ткань или целое насекомое).

Минимально достаточная продолжительность начального замачивания необходимо для того, чтобы реагент EverFresh как можно скорее полностью пропитал образец и подавил активность ДНКаз.

Время замачивания зависит от природы образца, оно может составлять 10-15 минут для образца, содержащего небольшого количества клеток и полученного способом смыва или соскоба. В случае тканей и целых мелких насекомых мы настоятельно рекомендуем замачивать образец в течение ночи. Объем реагента EverFresh должен превышать объем образца не менее чем в 10 раз для создания необходимой концентрации реагента для ингибирования активности ДНКаз. Крупные образцы желательно разрезать на более мелкие, что существенно ускорит пропитывание образца реагентом EverFresh и таким образом сократит время активности ДНКаз. Рекомендуется периодическое интенсивное встряхивание образца в реагенте EverFresh в течение первых 10-15 минут. После добавления реагента EverFresh к образцу и перемешивания необходимо поместить образец находящийся в реагенте EverFresh на +4 °C на 12-18 часов для полной пропитки образца реагентом.

Перед помещением пропитанного реагентом EverFresh образца на длительное хранение при температурах -20 °C - -80 °C рекомендуем слить избыток раствора EverFresh. На стадии хранения избыток реагента не нужен, так как образец полностью пропитан реагентом и активность ДНКаз подавлена. При хранении при низких температурах реагент замерзает и его последующее размораживание занимает время. Кроме того, при хранении при низких температурах возможно выпадение осадка ингредиентов реагента EverFresh, что может влиять на процедуру последующего выделения РНК.

В случае работы с небольшим количеством материала, особенно взвесей и осадков клеток, для предотвращения потери материала перед замораживанием -20°C - -80°C мы рекомендуем центрифугировать суспензию клеток в реагенте EverFresh при 5,000-10,000 g и аккуратно удалить избыток реагента EverFresh, стараясь не захватить осадок клеток.

Особо подчеркиваем, что минимально достаточное время пропитки для конкретного объекта каждый пользователь подбирает самостоятельно в ходе предварительного эксперимента. На основании этого эксперимента пользователем определяется окончательный протокол хранения собираемых образцов.

В качестве общей рекомендации мы рекомендуем выдерживать образец в реагенте EverFresh в течение ночи при +4°C, что гарантирует максимально полную пропитку образца реагентом и, как следствие, максимальную сохранность ДНК или РНК в образце в течение указанного в инструкции интервала времени (при условии, что образец был исходно свежий). Выбор времени первой обработки образца в реагенте EverFresh является экспериментальным решением конечного пользователя.

В зависимости от задач, особенностей образца, других сопутствующих факторов, у экспериментатора могут возникать вопросы. Так как задачи у всех пользователей имеют свои особенности, а разнообразие требующих сохранения объектов велико, Вы всегда можете обратиться к нам за советом и мы, со своей стороны, сделаем все, что в нашей компетенции, чтобы помочь Вам.

Примечание

- Реагент **EverFresh DNA** предназначен:

для консервации и хранения клеток прямо в суспензии (когда нет возможности предварительно концентрировать клетки центрифугированием) без использования шкафов глубокого холода, жидкого азота или сухого льда с целью последующей экстракции их ДНК (плазмидной или геномной). Раствор не предназначен для консервации клеток из жидкостей с высоким содержанием белка (кровь, сыворотка, плазма крови).

- При желании, клетки можно также хранить в реагенте **EverFresh DNA** и при более низких температурах – -20 °C - -80 °C в течение многих месяцев.
- Клетки можно хранить в реагенте **EverFresh DNA** в диапазоне температур от комнатной до -80 °C. Хранение при отрицательной низкой температуре продляет сохранность ДНК в образце в течение нескольких лет.



Помещайте в реагент **EverFresh DNA** только свежие клетки.
Замороженные клетки нельзя обрабатывать реагентом **EverFresh DNA**.

Хранение: Храните раствор **EverFresh DNA** при +4 °C, избегайте прямого солнечного света.

Меры предосторожности: Работайте с раствором **EverFresh DNA** в перчатках. При попадании раствора **EverFresh DNA** на кожу, промойте участок проточной водой.

Протокол консервации *осадков* клеток

Консервация клеток

1. Центрифугированием при минимальных оборотах осадите клетки из культуральной среды, крови или иной биологической жидкости и отбросьте супернатант. Не старайтесь получить плотный осадок клеток или максимально удалить супернатант после центрифугирования, чтобы не разрушить клетки и не потерять часть клеток в процессе аспирации супернатанта. Остатки супернатанта не препятствуют эффективности хранения клеток так как инактивируются раствором **EverFresh DNA**. В то же время, помните, что избыток белка из крови, плазмы или сыворотки может затруднить последующее выделение ДНК.
2. Добавьте в пробирку с суспензией клеток 10 объемов раствора **EverFresh DNA** (относительно общего объема осадка клеток плюс остатки супернатанта) и немедленно встряхните содержимое. Минимальное количество добавляемого раствора **EverFresh DNA** составляет 5 объемов относительно объема клеточной суспензии. Чем больше добавляемый объем **EverFresh DNA**, тем эффективнее его консервирующее действие.
3. Для ускорения стабилизации ДНК целесообразно несколько раз перемешать содержимое в течение первых 15 мин, после чего поместить пробирку в нужный температурный режим.

Протокол консервации *суспензии* клеток

Консервация клеток

1. Добавьте в пробирку с суспензией клеток 10 объемов раствора **EverFresh DNA** и немедленно интенсивно перемешайте содержимое. Минимальное количество добавляемого раствора **EverFresh DNA** составляет 5 объемов относительно объема клеточной суспензии. Чем больше добавляемый объем **EverFresh DNA**, тем эффективнее его консервирующее действие.
Чем быстрее клетки поместят в раствор **EverFresh DNA**, тем меньше времени у внутриклеточных РНКаз на то, чтобы деградировать РНК.
2. Для ускорения стабилизации РНК целесообразно несколько раз перемешать содержимое в течение первых 5-10 мин, после чего поместить пробирку в нужный температурный режим.

Подготовка консервированных клеток к выделению ДНК

1. Центрифугируйте пробирку с хранящимся в растворе **EverFresh DNA** образцом клеток при максимальных оборотах 10,000-15,000 g. В отличие от живых клеток, клетки, хранящиеся в растворе **EverFresh DNA** не разрушаются при высокоскоростном центрифугировании.
2. Удалите раствор **EverFresh DNA** и добавьте к осадку клеток буфер, который должен быть использован по выбранной Вами методике для начала выделения ДНК. Если осадок клеток маленький, во избежание захвата ценного клеточного материала не старайтесь полностью удалять раствор **EverFresh DNA**, небольшое его количество существенно не повлияет на эффективность последующего выделения ДНК.