



Инструкция по использованию раствора **EverFresh RNA**

Примечание

- Раствор **EverFresh RNA** предназначен:
 - для хранения кусочков тканей или осадков клеток без использования шкафов глубокого холода, жидкого азота или сухого льда с целью последующей экстракции из них РНК.
 - 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 РНК. Раствор не предназначен для консервации клеток из жидкостей с высоким содержанием белка (кровь, сыворотка, плазма крови).
- При желании, ткани можно также хранить в растворе **EverFresh RNA** и при более низких температурах – $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение многих месяцев.
- **Два золотых правила:**
 - А** - чем быстрее образец ткани поместят в раствор **EverFresh RNA**, тем меньше времени у внутриклеточных РНаз на то, чтобы деградировать РНК;
 - Б** - чем меньше кусочек ткани, тем быстрее раствор **EverFresh RNA** проникнет в клетки и стабилизирует РНК.
- Максимальный размер помещаемого в раствор кусочка ткани **не должен** превышать **5 мм** ни по одному из трех измерений. Крупные куски ткани предварительно быстро разрежьте на более мелкие кусочки. В одну пробирку можно помещать несколько кусочков одного и того же образца ткани.
- Ткани и клетки можно хранить в растворе **EverFresh RNA** в диапазоне температур от $T_{\text{комн}}$ до $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Хранение при более низкой температуре продляет сохранность РНК в образце до многих месяцев.

Стабильность РНК в процессе хранения материала в растворе EverFresh RNA в различных температурных режимах.

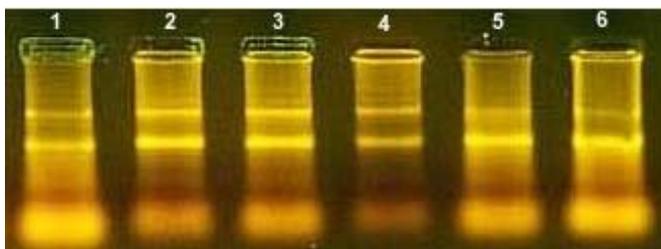
- ! Помещайте в раствор **EverFresh RNA** только свежую ткань или клетки. Замороженную ткань или клетки нельзя обрабатывать раствором **EverFresh RNA**.
- В диапазоне температур $+30 - +37\text{ }^{\circ}\text{C}$ РНК в материале стабильна в течение **1 суток**.
- В диапазоне температур $+25 - +30\text{ }^{\circ}\text{C}$ РНК в материале стабильна в течение **3 суток**.
- В диапазоне температур $+15 - +25\text{ }^{\circ}\text{C}$ РНК в материале стабильна в течение **7 суток**.
- В диапазоне температур $+5 - +15\text{ }^{\circ}\text{C}$ РНК в материале стабильна в течение **15 суток**.
- В диапазоне температур $+0 - +5\text{ }^{\circ}\text{C}$ РНК в материале стабильна в течение **30 суток**.

При более длительном хранении ткани в растворе **EverFresh RNA** в указанных диапазонах температур, может происходить частичная деградация РНК, что делает ее менее приемлемой для целей Northern-Blot гибридизации, но не сказывается на качестве ОТ-ПЦР.

В ряде случаев (сбор материала в полевых условиях с последующей транспортировкой в лабораторию или при пересылке материала почтой) после первоначального хранения ткани в растворе **EverFresh RNA** при температуре выше +15°C, пробирку с образцом можно поместить на 0 °C - +5°C и хранить в течение последующих 2 недель.

Стабильность клеточной РНК определяется по соотношению интенсивности 28S/18S рРНК на электрофорезе.

Сохранность РНК в образце ткани при хранении в растворе **EverFresh RNA**



В каждом случае 0,1 г ткани из печени крысы помещали в 1 мл раствора **EverFresh RNA**, выдерживали при +4 °C и +20 °C в течении: 1 часа, 1 суток 1 недели, после чего раствор удаляли и экстрагированная РНК набором **YellowSolve**.

- 1** - 1 час при +20 °C;
- 2** - 1 час при +4 °C;
- 3** - 1 сутки при +20 °C;
- 4** - 1 сутки при +4 °C;
- 5** - 1 неделя при +20 °C;
- 6** - 1 неделя при +4 °C.

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

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

Протокол консервации тканей или осадков клеток

I. Консервация тканей

1. Поместите образцы ткани в пробирку содержащую **5-10** объемов раствора **EverFresh RNA** и немедленно встряхните содержимое.
2. Для ускорения стабилизации РНК целесообразно поставить пробирку на встряхиватель на 15-30 мин или по крайней мере несколько раз перемешать содержимое в течение первых 15-30 мин, после чего поместить пробирку в нужный температурный режим.

Подготовка консервированной ткани к выделению РНК

Способ 1:

Извлеките пинцетом или иглой кусочек ткани из пробирки с раствором **EverFresh RNA** и поместите ткань в буфер для экстракции РНК (**YellowSolve** или другой).

Способ 2:

Центрифугируйте пробирку с хранящимся в растворе **EverFresh RNA** образцом при 5,000 g для осаждения кусочков ткани, после чего удалите раствор **EverFresh RNA** и добавьте к осадку ткани лизирующий буфер для экстракции РНК (**YellowSolve** или другой).

II. 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 RNA**. В то же время, помните, что избыток белка из крови, плазмы или сыворотки может затруднить последующее выделение РНК. Чем быстрее клетки поместят в раствор **EverFresh RNA**, тем меньше времени у внутриклеточных РНКаз на то, чтобы деградировать РНК.
2. Добавьте в пробирку с осадком клеток 5-10 объемов раствора **EverFresh RNA** (относительно общего объема осадка клеток плюс остатки супернатанта) и немедленно встряхните содержимое.
3. Для ускорения стабилизации РНК целесообразно несколько раз перемешать содержимое в течение первых 15 мин, после чего поместить пробирку в нужный температурный режим.

Подготовка консервированных клеток к выделению РНК

1. Центрифугируйте пробирку с хранящимся в растворе **EverFresh RNA** образцом клеток при максимальных оборотах 10-15,000 g. В отличие от живых клеток, клетки, хранящиеся в растворе **EverFresh RNA** не разрушаются при высокоскоростном центрифугировании.
2. Удалите раствор **EverFresh RNA** и добавьте к осадку клеток лизирующий буфер для

экстракции РНК (**YellowSolve** или другой).

3. Если нет возможности сконцентрировать клетки центрифугированием, добавьте к 1 объему содержащей клетки жидкости (но не к крови, плазме или сыворотке!) 3-4 объема раствора **EverFresh RNA** (см. методику по консервации суспензии клеток).

Протокол консервации суспензии клеток _____

Консервация клеток

1. Добавьте в пробирку с суспензией клеток **3-5** объемов раствора **EverFresh RNA** и немедленно перемешайте содержимое. Минимальное количество добавляемого раствора **EverFresh RNA** составляет 3 объема относительно объема клеточной суспензии. Чем больше добавляемый объем **EverFresh RNA**, тем эффективнее его консервирующее действие.
Чем быстрее клетки поместят в раствор **EverFresh RNA**, 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 РНК

1. Центрифугируйте пробирку с хранящимися в растворе **EverFresh RNA** клетками при максимальных оборотах 10-15,000 g. В отличие от живых клеток, клетки, хранящиеся в растворе **EverFresh RNA**, не разрушаются при высокоскоростном центрифугировании.
2. Удалите раствор **EverFresh RNA** и добавьте к осадку клеток буфер для экстракции РНК (**YellowSolve** или другой). Если осадок клеток маленький, во избежание захвата ценного клеточного материала не старайтесь полностью удалять раствор **EverFresh RNA**, небольшое его количество существенно не повлияет на эффективность последующей экстракции РНК.