

Выделение ДНК/РНК из парафинизированных образцов, фиксированных в формалине (FFPE) на магнитных частицах SileksMagNA

Кат. номер: KIRFFPE0100

Назначение набора: выделение ДНК/РНК из парафинизированных образцов

Условия хранения: +4°C

Условия транспортировки: особых условий не требуется

Состав набора

Набор содержит количество реагентов, достаточное для проведения

100 процедур выделения либо ДНК, либо РНК

50 процедур совместного выделения ДНК и РНК

Компонент набора

• Протеиназа	1 мл
• Буфер для протеиназы, 1-кратный	10 мл
• Буфер START	12 мл
• Буфер Lysis&Binding	24 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	2
2.1. Введение	2
2.1. Обзор метода	3
3. Приготовление образцов тканей	4
4. Депарафинизация	5
4.1. Стандартный протокол с использованием ксилола (xylene)	5
4.2. Депарафинизация с использованием гептана и метанола	5
5. Протоколы выделения	6
5.1. Выделение РНК	6
5.2. Выделение ДНК	8
5.3. Совмещенное выделение РНК и ДНК из одного образца	9
6. Приложения	10
Приложение 1 Долгосрочное хранение нуклеиновых кислот в буфере <i>Final Wash</i>	10
Приложение 2 <i>RNA Protector</i>	10
7. Рекомендации по модификации протокола	11
8. Комментарии к протоколу	12
9. Связанные продукты	13
10. Контактные данные	13

1. Меры предосторожности



Некоторые компоненты набора могут нанести вред здоровью в случае проглатывания, вдыхания, 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 аспиратор, проследите, чтобы колба-ловушка была пуста или не содержала указанных выше веществ. 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

2.1. Введение

Набор предназначен для эффективного и быстрого (~30 мин) выделения ДНК и/или РНК из парафинизированных образцов фиксированных в формалине (FFPE — formalin fixed paraffin embedded).

Количество реактивов в наборе рассчитано на 100 процедур выделения либо ДНК, либо РНК. Можно также одновременно выделять из одного образца ДНК и РНК одновременно. Это будут две процедуры выделения. В этом случае общее количество выделений набором сокращается до 50 процедур.

Особенность выделения из парафинизированных образцов фиксированных в формалине и последующей работы с выделенным материалом заключается в том, что в процессе фиксации и парафинизации нуклеиновая кислота (ДНК и РНК) в образцах подвергается сильной фрагментации и химической модификации формальдегидом. В результате нуклеиновая кислота (НК) выделяемая из парафинизированных образцов чаще всего представляет собой сильно фрагментированную НК, принципиальным образом отличающуюся от НК, выделяемой из свежих или замороженных образцов. Влияние обработки формальдегидом сказывается не только на сложности выделения НК, но и на последующих процедурах с участием различных ферментов. Формальдегидные модификации и следы самого формальдегида оказывают сильное ингибирующее действие на многие регулярно используемые ферменты включая термостабильные полимеразы, применяемые в полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Определить в геле качество РНК, выделенной из парафинизированных образцов, по наличию полос 18S и 28S рибосомальной РНК часто бывает невозможным. Полосы 18S и 28S рРНК в лучшем случае слабые или сильно размазанные, а в худшем случае могут полностью отсутствовать.

В зависимости от качества образцов размер НК может сильно варьировать. Средний размер РНК, выделяемой из парафинизированных образцов, составляет около 100 нуклеотидов. Размер фрагментов ДНК может быть в несколько раз больше, иногда до 500 нуклеотидов

Качество образцов и целостность НК определяется разными факторами:

- тип ткани,
- время хранения образца,
- условия фиксации и условия заливки (рН используемого буфера, температура, качество реагентов),
- условия хранения образца.

Процедура выделения НК, предлагаемая в данном наборе, в значительной степени уменьшает количество перекрестных сшивок, образуемых в процессе фиксации формальдегидом.

Однако следует понимать, что деградированная в процессе фиксации НК не может быть использована для таких же точно типов исследований, как нуклеиновая кислота стандартного качества.

Чтобы использовать полученную из парафинизированных образцов НК может потребоваться подбор и оптимизация условий ПЦР и обратной транскрипции (ОТ).

ОЧЕНЬ ВАЖНО !!!

Мы рекомендуем модифицировать систему для амплификации с таким расчетом, чтобы результирующий продукт (ампликон) имел длину не больше 100 пар оснований. Для проведения ОТ мы рекомендуем использовать ген-специфические праймеры или рендомизированные праймеры, а от использования олиго(дТ) праймера следует отказаться.

2.2. Обзор метода

В основе набора лежит хорошо отработанный метод нашей компании по очистке НК с использованием обратимой сорбции на магнитных частицах. Методика выделения из парафинизированных образцов включает дополнительную процедуру с протеиназой. Но в отличие от стандартных процедур с обработкой протеиназой, которые требуют продолжительной инкубации - ночь или дольше - мы используем специально разработанные буфера, которые позволяют сократить время инкубации с протеиназой, ускорить процедуру выделения и повысить выход нуклеиновых кислот.

Парафинизированный образец вначале депарафинизируют. Для депарафинизации можно использовать различные методы, которые приводятся в разделе **Депарафинизация**. Затем

образец обрабатывают протеиназой по одному из протоколов (*Выделение РНК, Выделение ДНК, Выделение РНК и ДНК*). После завершения процедуры обработки смесь центрифугируют для удаления нерастворимых компонентов. Супернатант, содержащий НК, переносят в отдельную пробирку. К супернатанту добавляют буфер, улучшающий процедуру очистки, и после непродолжительной инкубации вносят магнитные частицы. Нуклеиновая кислота сорбируется на магнитных частицах. Супернатант удаляют и далее следует процедура отмывки для удаления нежелательных примесей. Чистую РНК или ДНК элюируют в объеме от 30 до 100 мкл в зависимости от последующих задач.

Выделенную РНК или ДНК мы рекомендуем сразу же использовать для дальнейшей работы.

Если есть необходимость длительного хранения выделяемого материала, следуйте рекомендациям, которые мы даем в протоколе.

3. Приготовление образцов тканей

В процессе обработки образца формалином и последующей заливки в парафиновый блок всегда происходит фрагментация и перекрестная сшивка РНК и ДНК в образце. Чтобы уменьшить повреждения РНК и ДНК, мы рекомендуем поступать следующим образом:

- максимально быстро проводить обработку образца формалином после его хирургического получения
- проводить фиксацию при температуре +4...+10 °С и не более 24 часов, так как более продолжительное время обработки критически ухудшает качество НК в образце
- использовать парафин с низкой температурой плавления, так как использование парафина с высокой температурой плавления усиливает фрагментацию НК в образце
- хранить парафинизированные образцы при температуре от 0 до +10 °С, так как хранение при комнатной температуре усиливает деградацию образцов

Образцы для выделения нужно нарезать непосредственно перед выделением на срезы толщиной 10 мкм. Выделение из более толстых срезов ухудшает качество обработки и в результате выход НК уменьшается. Поверхность среза должна составлять 0,5-1,5 см². Обычно для выделения достаточно одного среза. Мы настоятельно рекомендуем начинать работать именно с одним срезом. В исключительных случаях, когда в сделанном срезе содержится мало материала или материал хранился дольше 10-20 лет, можно попробовать использовать от двух до трех срезов.

Поместите срез в 1,5 мл пробирку. До начала работы со срезом плотно закройте крышку пробирки и храните ее при температуре от 0 до +10 °С.

4. Депарафинизация

4.1. Стандартный протокол с использованием ксилола (xylene)

*Реактивы для депарафинизации не входят в состав набора и приобретаются отдельно.
Растворы, содержащие этанол, не входят в состав набора и готовятся самостоятельно.*

Депарафинизация с использованием ксилола является стандартной и самой распространенной процедурой.

1. Внесите **1 мл ксилола** в пробирку со срезом.
Встряхните пробирку на вортексе в течение 10 секунд. Инкубируйте пробирку при комнатной температуре 10 минут. В процессе инкубации встряхните пробирку на вортексе как минимум еще 2 раза.
Центрифугируйте пробирку при **12,000-18,000×g** в течение **2 минут**.
Осторожно удалите супернатант.
Обратите внимание! Ткань на дне пробирки прозрачная и трудноразличимая. Не удалите ее случайно при отборе супернатанта.
2. Внесите еще раз **1 мкл ксилола** и повторите процедуру инкубации и центрифугирования. Как можно тщательнее удалите супернатант.
Обратите внимание! Ткань на дне пробирки прозрачная и трудноразличимая. Не удалите ее случайно при отборе супернатанта.
3. Внесите **1 мл 96%-ого этанола**.
Встряхните пробирку на вортексе в течение 10 секунд.
Центрифугируйте пробирку при **12,000-18,000×g** в течение **2 минут**.
Как можно тщательнее удалите супернатант.
4. Внесите **1 мл 90%-ого этанола**.
Встряхните пробирку на вортексе в течение 10 секунд.
Центрифугируйте пробирку при **12,000-18,000×g** в течение **2 минут**.
Как можно тщательнее удалите супернатант.
5. Внесите **1 мл 70%-ого этанола**.
Встряхните пробирку на вортексе в течение 10 секунд.
Центрифугируйте пробирку при **12,000-18,000×g** в течение **2 минут**.
Как можно тщательнее удалите супернатант.
6. Оставьте пробирку с открытой крышкой для высыхания на 10 минут.

Далее переходите к соответствующему протоколу выделения 5.1, 5.2 или 5.3.

4.2. Депарафинизация с использованием гептана и метанола

*Реактивы для депарафинизации не входят в состав набора и приобретаются отдельно.
Растворы, содержащие этанол, не входят в состав набора и готовятся самостоятельно.*

Депарафинизация с использованием гептана и метанола одна из самых эффективных. В ходе этой процедуры осадок получается более компактный и выделение нуклеиновых кислот дает достаточно хорошие результаты.

1. Внесите **500 мкл гептана** в пробирку со срезом.
Встряхните пробирку на вортексе в течение 10 секунд. Инкубируйте пробирку при комнатной температуре 10 минут. В процессе инкубации встряхните пробирку на вортексе как минимум еще 2 раза.
2. Добавьте **25 мкл метанола**.
Встряхните пробирку на вортексе в течение 10 секунд.
Центрифугируйте пробирку при **12'000-18'000×g** в течение **2 минут**.
Как можно тщательнее удалите супернатант.
3. Внесите **1 мл 96%-ого этанола**.
Встряхните пробирку на вортексе в течение 10 секунд.
Центрифугируйте пробирку при **12'000-18'000×g** в течение **2 минут**.
Как можно тщательнее удалите супернатант.
4. Оставьте пробирку с открытой крышкой для высыхания на 10 минут.

Далее переходите к соответствующему протоколу выделения 5.1, 5.2 или 5.3.

5. Протоколы выделения

Обязательно прочитайте перед началом работ!

Проверьте все буфера на предмет наличия осадка. Выпадение осадка не означает порчу буфера.

Если осадок образовался, подогрейте 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:

- пипетированием (требуется не менее 15 пипетирований каждого образца для качественного суспендирования);
- используя компактный миксер LabMix (5 секунд на низкой или средней скорости).

5.1. Выделение РНК

- | | |
|------------|---|
| Экстракция | <ol style="list-style-type: none"> Внесите в пробирку с депарафинизированным образцом 100 мкл Буфера для протеиназы и 10 мкл протеиназы.
Встряхните пробирку на вортексе. Поместите пробирку в термостат на +60 °С.
Инкубируйте пробирку в течение минимум 1 часа. В зависимости от материала образец может не раствориться полностью. Это не влияет на конечный результат. Перенесите пробирку в термостат на +80 °С.
Инкубируйте пробирку в течение 30 минут. Максимальное время инкубации может составлять 60 минут. Более продолжительное время инкубации усиливает деградацию РНК. Охладите пробирку на льду в течение 2 минут. Центрифугируйте пробирку при 12.000-18.000×g в течение 10 минут. |
| Лизис | <ol style="list-style-type: none"> Не затрагивая осадка, отберите супернатант, содержащий РНК, в новую пробирку. Добавьте 120 мкл буфера START и тщательно перемешайте раствор. Инкубируйте при комнатной температуре 5 минут.
<i>Более длительная инкубация (до 15 минут) позволяет повысить выход РНК.</i> |
| Связывание | <ol style="list-style-type: none"> 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. Добавьте приготовленную суспензию магнитных частиц в пробирку с лизированным образцом. Тщательно перемешайте. Инкубируйте 5 минут при комн. темп. Дважды-трижды перемешайте во время инкубации.

Использование шейкера для пробирок улучшает результат.
При использовании шейкера инкубируйте тщательно гомогенизированные частицы в течение 5 минут при 1250-1500 обор/мин в зависимости от модели шейкера. |
| Wash 1 | <ol style="list-style-type: none"> Поместите пробирку в магнитный штатив для сбора частиц (может потребоваться до 1 минуты). Удалите супернатант. Будьте осторожны, чтобы не захватить магнитные частицы. Поместите пробирку в немагнитный штатив. Добавьте 300 мкл хорошо перемешанного буфера Wash 1 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 2 | <ol style="list-style-type: none"> Поместите пробирку в магнитный штатив для сбора частиц. Удалите супернатант. 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. |

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.
- 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.
- 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. Температура хранения может широко варьировать: от комнатной (+20 °С) до +4 °С, -20 °С и -70 °С. Чем ниже температура, тем выше сохранность. По окончании хранения протокол должен быть продолжен непосредственно со следующего шага.
18. Поместите пробирку в **магнитный штатив** для сбора частиц. Удалите супернатант.
19. Инкубируйте пробирку в **термостате при 60 °С 5 минут**, чтобы высушить осадок частиц.
20. Добавьте **30 мкл** буфера **Elution**. Тщательно ресуспендируйте частицы до получения гомогенной суспензии. *При необходимости можно увеличить объем буфера Elution до 100 мкл.*
21. Инкубируйте в **термостате при 60 °С 5 минут**.
22. Поместите пробирку в **магнитный штатив** для сбора частиц. Перенесите РНК-содержащий супернатант в чистую пробирку. Добавьте **3 мкл RNAProtector**.

РНК очень уязвима и плохо хранится. Постановка обратной транскрипции должна быть проведена как можно скорее. РНК может деградировать довольно быстро, снижая таким образом общую чувствительность метода. Реагент *RNAProtector* защищает РНК, но не предохраняет её полностью от деградации. Его объем должен быть равен одной десятой от объема буфера *Elution*. Если элюция проводится в большем объеме, чем рекомендовано, может понадобиться приобрести дополнительное количество *RNAProtector*.

Выделенная РНК может содержать примеси ДНК. Но при правильном подборе амплификационной системы это не является помехой. Тем не менее, если требуется получить РНК без примесей ДНК, мы рекомендуем провести обработку ДНазой. По окончании этой процедуры ДНазу можно инактивировать или удалить одним из следующих способов:

- Переосадить РНК в присутствии соосадителя (например, гликогена). Учитывая сильную фрагментированность РНК, её потери могут превосходить 50%.
- Очистить на магнитных частицах (набор "Очистка продуктов ферментативных реакций"),
- Удалить ДНазу, используя сорбент **Bluesorb**.
- Инактивировать ДНазу прогревом при 70 °С.

5.2. Выделение ДНК

- | | |
|------------|--|
| Экстракция | <p>1. Внесите в пробирку с депарафинизированным образцом 100 мкл Буфера для протеиназы и 10 мкл протеиназы.
Встряхните пробирку на вортексе. Поместите пробирку в термостат на +60 °С.
Инкубируйте пробирку в течение минимум 1 часа. В зависимости от материала образец может не раствориться полностью. Это не влияет на конечный результат.</p> <p>2. Перенесите пробирку в термостат на +90 °С. Инкубируйте пробирку в течение 2 часов.</p> <p>3. Охладите пробирку на льду в течение 2 минут.</p> <p>4. Центрифугируйте пробирку при 12,000-18,000×g в течение 10 минут.</p> |
| Лизис | <p>5. Не затрагивая осадка, отберите супернатант, содержащий ДНК, в новую пробирку.</p> <p>6. Добавьте 120 мкл буфера START и тщательно перемешайте раствор.</p> <p>7. Инкубируйте при комнатной температуре 5 минут.
<i>Более длительная инкубация (до 15 минут) позволяет повысить выход ДНК.</i></p> |
| Связывание | <p>8. 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.</p> <p>9. Добавьте приготовленную суспензию магнитных частиц в пробирку с лизированным образцом. Тщательно перемешайте. Инкубируйте 5 минут при комн. темп. Дважды-трижды перемешайте во время инкубации.

Использование шейкера для пробирок улучшает результат.
При использовании шейкера инкубируйте тщательно гомогенизированные частицы в течение 5 минут при 1250-1500 обор/мин в зависимости от модели шейкера.</p> |
| Wash 1 | <p>10. Поместите пробирку в магнитный штатив для сбора частиц (может потребоваться до 1 минуты). Удалите супернатант. Будьте осторожны, чтобы не захватить магнитные частицы.</p> <p>11. Поместите пробирку в немагнитный штатив. Добавьте 300 мкл хорошо перемешанного буфера Wash 1 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.</p> |
| Wash 2 | <p>12. Поместите пробирку в магнитный штатив для сбора частиц. Удалите супернатант.</p> <p>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.

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> |
| Wash 3 | <p>14. Поместите пробирку в магнитный штатив для сбора частиц. Удалите супернатант.</p> <p>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.

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> <p>15. Поместите пробирку в магнитный штатив для сбора частиц. Удалите супернатант.</p> |

FinalWash

16. 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, связанная с частицами, может храниться длительное время. Температура хранения может широко варьировать: от комнатной (+20 °С) до +4 °С, -20 °С и -70 °С. Чем ниже температура, тем выше сохранность. По окончании хранения протокол должен быть продолжен непосредственно со следующего шага.

Элюция

17. Поместите пробирку в **магнитный штатив** для сбора частиц. Удалите супернатант.
18. Инкубируйте пробирку в **термостате при 60 °С 5 минут**, чтобы высушить осадок частиц.
19. Добавьте **30 мкл** буфера **Elution**. Тщательно ресуспендируйте частицы до получения гомогенной суспензии. *При необходимости можно увеличить объём буфера Elution до 100 мкл.*
20. Инкубируйте в **термостате при 60 °С 5 минут**.
21. Поместите пробирку в **магнитный штатив** для сбора частиц. Перенесите ДНК-содержащий супернатант в чистую пробирку.

Храните выделенную ДНК при -20 °С. Выделенная ДНК может содержать примеси РНК. Обычно это не является помехой. Тем не менее, если требуется получить ДНК без примесей РНК, мы рекомендуем провести обработку РНазой. По окончании этой процедуры РНазу можно инактивировать или удалить одним из следующих способов:

- Переосадить ДНК в присутствии соосадителя (например, гликогена). Но, учитывая сильную фрагментированность ДНК, её потери могут превосходить 50%.
- Очистить на магнитных частицах (набор "Очистка продуктов ферментативных реакций"),
- Удалить РНазу, используя сорбент **Bluesorb**.

5.3. Совмещённое выделение РНК и ДНК из одного образца

Экстракция

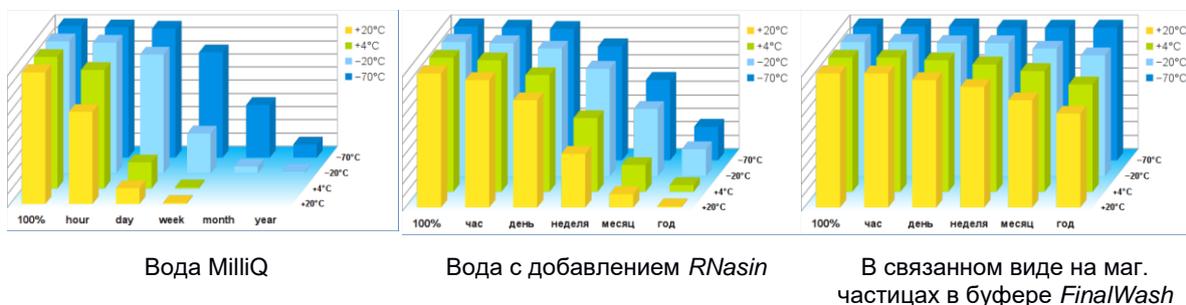
1. Внесите в пробирку с депарафинизированным образцом **100 мкл Буфера для протеиназы и 10 мкл протеиназы**. Встряхните пробирку на вортексе. Инкубируйте пробирку при +60 °С в течение минимум 1 часа. В зависимости от материала образец может не раствориться полностью. Это не влияет на конечный результат.
2. Охладите пробирку **на льду** в течение **2 минут**.
3. **Центрифугируйте** пробирку при **12,000-18,000×g** в течение **10 минут**.
4. Перенесите РНК-содержащий супернатант в чистую пробирку, не задевая ДНК-содержащий осадок.
Внимание!!! ДНК-содержащий осадок может храниться в следующих условиях:
- | | |
|-------------------|--------------------|
| комн. температура | 1-2 часа |
| +2... +10 °С | 1 день |
| -20 °С | 1 неделя — 1 месяц |
5. Инкубируйте пробирку с РНК-содержащим супернатантом при **+80 °С 15 минут**. Более продолжительное время инкубации усиливает деградацию РНК.
6. Перейдите к **шагу 6** протокола **5.1. Выделение тотальной РНК** для выделения РНК.
7. В пробирку с ДНК-содержащим осадком добавьте **100 мкл Буфера для протеиназы и 10 мкл Протеиназы**. Встряхните пробирку на вортексе. Поместите пробирку в термостат на **+60 °С**. Инкубируйте пробирку в течение минимум **1 часа**. В зависимости от материала образец может не раствориться полностью. Это не влияет на конечный результат.
8. Поместите пробирку в термостат на **+90 °С**. Инкубируйте пробирку в течение **2 часов**. **ОЧЕНЬ ВАЖНО!** В процессе инкубации пробирку нельзя встряхивать или перемешивать!
9. Центрифугируйте пробирку при **12,000-18,000×g** в течение **10 минут**.
10. Не затрагивая осадка, отберите супернатант, содержащий ДНК, в новую пробирку.
11. Перейдите к **шагу 6** протокола **5.2. Выделение геномной ДНК** для выделения ДНК.

6. 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 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 (кат.#: KIRPS0100),
- Выделение циркулирующей нуклеиновой кислоты из плазмы и сыворотки крови на магнитных частицах SileksMagNA (кат.#: KIRCNA1000),
- Выделение ДНК/РНК из фиксированных в формалине парафинизированных (FFPE) образцов (кат.#: KIRFFPE0100),
- Выделение ДНК/РНК из клеточных культур (кат.#: 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 $\frac{1}{10}$ 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).

7. Рекомендации по модификации протокола

1. Мы рекомендуем для первого выделения брать один срез толщиной 10 мкм. Если количество выделяемой РНК/ДНК будет слишком низким, количество срезов можно поэтапно увеличивать до пяти. Следует помнить, что увеличение количества стартового материала понижает чистоту выделяемой РНК/ДНК.
2. Мы рекомендуем брать магнитные частицы в количестве 5 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 объемов, 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. Рекомендуемый нами объем - 300 мкл каждого промывочного буфера.
Однако в зависимости от качества вашей пробы, из которой осуществляется выделение, и задач, может потребоваться оптимизировать объем промывочных буферов.
Для оптимизации мы рекомендуем увеличивать количество промывочных буферов с шагом 50 мкл, но не более чем 600 мкл.
4. Для повышения концентрации ДНК/РНК в конечном образце можно уменьшить добавляемое количество буфера Elution. 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. 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.

8. Комментарии

Общие замечания

Низкая концентрация получаемой нуклеиновой кислоты делает бессмысленным использование спектрофотометрических методов оценки выделенного материала даже с использованием интеркалирующих флуоресцентных красителей. Единственным достоверным методом оценки является количественный ПЦР.

При конструировании праймеров и зондов нужно принимать во внимание сильную фрагментацию РНК/ДНК, а размер ампликона по возможности не должен превышать 100 п.н.. При исследовании РНК мы рекомендуем использовать для синтеза первой цепи случайные праймеры вместо специфических.

Комментарии к протоколу

1. Процедура депарафинизации не является критичной для последующего выделения РНК/ДНК. Для удаления парафина можно использовать ксилол, толуол и другие органические растворители, эффективно растворяющие парафины. Более важной процедурой является обработка водным этанолом, так как такая обработка позволяет гидратировать обезвоженную ткань, тем самым улучшая дальнейшую экстракцию РНК/ДНК.
2. Для эффективного выделения РНК не требуется полной деградации ткани протеиназой. В некоторых случаях прогрев депарафинизированного образца в буфере для протеиназы без добавления самой протеиназы позволяет получить такое же количество РНК, но более высокой степени чистоты, по сравнению с обработкой протеиназой. Обработка протеиназой при выделении ДНК необходимая и важная процедура.
3. Охлаждение во льду после обработки протеиназой и последующих термических обработок улучшает формирование осадка.
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.
6. 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.
7. Инкубирование в процесс элюции при 60 °С более 5 минут приводит к снижению чистоты выделяемой нуклеиновой кислоты за счет элюции частично сорбированных на частицах загрязняющих компонентов.
8. 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.
9. 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 - 2.5 мкл. Использование большего количества элюата может приводить к ингибированию реакции.

Хранение РНК/ДНК, 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

9. 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 EQMR006-2

MagRack16, кат. номер EQMR016

MagRack40, кат. номер EQMR040

MagRack50ML, кат. номер EQMR50ML

10. Контактные данные

телефон: +7 495 737 4224

эл. почта: info@sileks.com