



## Набор “ВЫДЕЛЕНИЕ ПОЛНОРАЗМЕРНОЙ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ мРНК на МАГНИТНЫХ ЧАСТИЦАХ”

Набор предназначен для быстрого прямого выделения уникальной мРНК непосредственно из ткани или культуры клеток. Принцип набора основан на связывании мРНК непосредственно из лизата ткани или культуры клеток используя магнитные частицы (МЧ) покрытые стрептавидином. Гибриды (биотин-меченый праймер гибридованный со специфической последовательностью мРНК) собирают, используя МЧ и магнитный штатив. Набор позволяет выделять как маленькие, так и большие количества высокоочищенной полноразмерной мРНК, которую затем можно использовать для ОТ-ПЦР (RT-PCR), синтеза кДНК, Нозерн блотов или для экспериментов по трансляции *in vitro*. Максимальное количество, на которые рассчитан набор - до 3 г ткани или до  $10^8$  клеток. Выход мРНК, которую можно получить из этого количества материала, в значительной степени зависит от вида ткани или клеток, степени подготовки специфического зонда и составляет приблизительно от 1 до 10 мкг специфической мРНК. Использование системы для гибридизации с биотин-меченым праймером в растворе дает более эффективный результат, чем связывание мРНК на твердофазных сорбентах. Наш набор рассчитан на использование любого меченого биотином зонда. Необходимым условием эффективности зонда является длина и характер ножки, которой пришит биотин к меченому основанию. Использование меченого биотином зонда, полученного при помощи набора, производимого нашей фирмой «**3'-концевое биотин мечение специфических зондов**», имеющего несколько молекул биотина в своем составе значительно увеличивает связывание образующихся гибридов с МЧ, покрытыми стрептавидином, тем самым повышая эффективность выделения мРНК.



## Исходный материал

Содержание мРНК может сильно варьировать в зависимости от материала. Например, 100 мг клеток печени крысы содержат прибл. 15 мкг мРНК, а  $10^7$  клеток HeLa - прибл. 3 мкг мРНК. Немаловажную, если не решающую роль, играет качество материала. Чем свежее материал, тем больше шансов получить много чистой мРНК. Для сохранения мРНК в образце можно использовать следующие способы:

- заморозить образец в жидком азоте и хранить при температуре не выше  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;
- как можно быстрее обработать образец лизирующим буфером.

✓ (Фирма **Clonogene** (Санкт-Петербург) выпускает реагент под названием **EverFresh**, который инактивирует РНазы и позволяет сохранять материал даже при комнатной температуре в течении недели и, возможно, дольше).

## Работа с набором

### Состав набора

(компонентов набора достаточно для выделения до 10 мкг мРНК)

№	Компоненты набора	Количества	Условия хранения
1	Магнитные частицы, покрытые стрептавидином, 1 мг/мл	600 мкл	$+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $+10\text{ }^{\circ}\text{C}$ (ни в коем случае не замораживать и не центрифугировать)
2	Лизирующий буфер	25 мл	$+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $+10\text{ }^{\circ}\text{C}$ (гарантированный срок хранения - 3 месяца)
3	Буфер для разведения	50 мл	$-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
4	$\beta$ -Меркаптоэтанол	2 мл	$+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $+10\text{ }^{\circ}\text{C}$
5	Буфер для промывок, x10	25 мл	$+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $+10\text{ }^{\circ}\text{C}$
6	Вода, свободная от РНаз	50 мл	$-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

## Предупреждение возможности загрязнения рибонуклеазами (РНазами)

Помните, что успешное выделение мРНК зависит от чистоты используемых материалов. Если все в работе готово заранее, то это не будет вызывать задержек в работе и уменьшит возможность загрязнения РНазами. Основными источниками РНаз являются **руки, бактерии и грибы**, которые могут распространяться с пылью. Чтобы избежать загрязнений, достаточно стандартной микробиологической техники работы. Работайте в перчатках и открывайте используемые реактивы на минимальное время. Для работы с мРНК лучше применять одноразовый пластик. Он, как правило, не содержит РНаз и не требует предварительной анти-РНазной обработки, но для надежности его можно дополнительно проавтоклавировать. Если приходится работать с многократно используемым стеклом и пластиком, то эти материалы необходимо перед работой обрабатывать. Стекло рекомендуется "прожаривать" при  $+200\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течении ночи, а пластик промыть раствором 0.1 M NaOH & 1 mM ЭДТА, затем водой, свободной от РНаз и также проавтоклавировать при температуре, которую выдерживает данный пластик. Применяемые растворы желательно обработать 0.05% диэтил пирокarbonатом в течении ночи при комнатной температуре и затем проавтоклавировать 30 мин для удаления следов диэтил пирокarbonата (следовые количества этого реактива могут сильно ингибировать работу многих ферментов, поэтому, если есть возможность, не используйте диэтил пирокarbonат). Многие системы очистки воды, такие как **MilliQ**, производят воду, свободную от РНаз, но в любом случае, старайтесь предварительно убедиться, что РНазы в воде отсутствуют.



## Работа с материалом, источником мРНК

Чтобы обеспечить успешное выделение мРНК, необходимо правильно собрать и подготовить материал для выделения.

Свежий образец ткани нужно как можно быстрее обрабатывать **лизирующим буфером**, чтобы избежать деградацию РНК. Если образцов много и они не могут быть обработаны сразу, образцы нужно измельчить, заморозить в жидком азоте и хранить при -70 °С. Измельчение проводите стерильным лезвием.

Альтернативным способом, доказавшим свою высокую эффективность, служит обработка образца раствором **EverFresh** (Фирма **Clonogene**, Санкт-Петербург).

Непосредственная процедура выделения мРНК одинакова для образцов ткани и культур клеток. Но для образцов из разных источников требуется различное количество лизирующего буфера, биотин-меченого праймера и МЧ.

Перед началом работы рассчитайте, пользуясь таблицей, требуемые количества буфера, праймера и МЧ.

Источник РНК	Материал, источник РНК	Лизирующий буфер, мкл	$\beta$ -Меркапто этанол (кон. конц.-2%), мкл	Биотин-меченый праймер, мкл	Магнитные частицы (1мг/мл), мкл
Ткань	100 мг	800	16	3	60
Культура клеток	10 <sup>6</sup> клеток	1000	20	4	80

**!** Магнитные частицы перед использованием должны быть отмыты и суспендированы в промывочном буфере. Отмывка занимает прилб. 5 мин и может быть осуществлена, пока гомогенизат центрифугируется. При низкой температуре в лизирующем и промывочном буферах могут образовываться осадки. Для приведения буферов в рабочее состояние дайте постоять буферам при комнатной температуре.

## Протокол выделения мРНК непосредственно из ткани или культуры клеток

(В приводимой ниже процедуре в качестве исходного материала возьмем 50 мг ткани)

1. Поместите источник РНК в 1.5 мл пробирку.
2. Быстро добавьте 400 мкл **лизирующего буфера** и 8 мкл  **$\beta$ -меркаптоэтанола** (до конечной концентрации 2%, прилб. по 2 мкл на 100 мкл лизирующего буфера).
3. Гомогенизируйте материал до исчезновения видимых фрагментов, пока гомогенизат не станет однородным по цвету и консистенции (обычно это требует 1-3 мин).
4. Удалите нерастворимый материал центрифугированием при 9000хg в течении 15 мин.
5. Перенесите супернатант в новую пробирку, добавьте 800 мкл **буфера для разведения** и тщательно перемешайте.
6. Внесите 50 пмолей специфического **биотин-меченого праймера**, встряхните на вортексе, оставьте на 5 мин при комнатной температуре.
7. Центрифугируйте смесь при 14000хg, 15 мин.
8. **Подготовка магнитных частичек:** во время центрифугирования (этап 7) отберите 30 мкл **МЧ** (1 мг/мл) в стерильную 1.5 мл пробирку (аккуратно ресуспендируйте МЧ пипетированием). МЧ поставляются в концентрации 1 мг/мл. Добавьте 200 мкл **0.5x промывочного буфера**. Суспендируйте МЧ пипетированием. Используя магнитный штатив, соберите МЧ (частички собираются прилб. в течении 30 сек) и тщательно удалите супернатант. Ни в коем случае не центрифугируйте МЧ. Промойте МЧ 3 раза **0.5x промывочным буфером**, каждый раз собирая МЧ в магнитном штативе и тщательно удаляя супернатант. После последней промывки ресуспендируйте МЧ в 50 мкл **0.5x промывочного буфера**.
9. После центрифугирования перенесите смесь в пробирку с МЧ. Ресуспендируйте МЧ пипетированием или кратковременным встряхиванием на вортексе.
10. Оставьте смесь на 10 мин при комнатной температуре.
11. Соберите МЧ с помощью магнитного штатива, тщательно отберите супернатант

**!** (сохраните этот супернатант, пока не убедитесь, что мРНК была удовлетворительно связана и элюирована).



12. Промойте МЧ, используя магнитный штатив, четыре раза по 400 мкл **0.1x промывочным буфером**, каждый раз тщательно суспендируя МЧ и тщательно отбирая супернатант. После последней промывки уберите как можно больше супернатанта из пробирки  
(остатки раствора перед элюцией - даже незначительное количество соли - может полностью блокировать элюцию с поли(dT) хвоста) .
13. Суспендируйте МЧ в 50 мкл **воды, свободной от РНаз**, инкубируйте при +70 °С в течении 5 мин.  
! (при уменьшении температуры или/и времени элюции выход мРНК может уменьшаться более чем на 50%).
14. Соберите МЧ, используя магнитный штатив, и перенесите супернатант, содержащий мРНК, в стерильную 1.5 мл пробирку.
15. Чтобы быть уверенным, что вся мРНК съэлюирована полностью, повторите этапы **13** и **14**. Объедините супернатанты, содержащую чистую мРНК.  
! (Не выбрасывайте использованные магнитные частицы. МЧ, несущие биотин-меченый праймер, можно повторно использовать для дополнительного выделения мРНК из образца того же самого материала. Для этого магнитные частицы нужно суспендировать в 50 мкл **0.5x промывочного буфера**).

### Протокол выделения мРНК из тотальной РНК

(В приводимой ниже процедуре в качестве исходного материала возьмем 0.1-1 мг тотальной РНК)

1. Внесите 0.1-1 мг тотальной РНК в объеме 500 мкл в стерильную 1.5 мл пробирку.  
! (если будет взято меньшее количество материала, то конечный выход мРНК может оказаться таким низким, что мРНК не будет выявляться даже спектофотометрически ).
2. Инкубируйте пробирку при +70 °С в течении 10 мин.
3. Добавьте к пробе 50 пмолей **биотин-меченого праймера** и 26 мкл **10x промывочного буфера**. Тщательно перемешайте и оставьте стоять при комнатной температуре до полного охлаждения смеси. Обычно на это требуется 5-10 мин. Пока смесь охлаждается, подготовьте МЧ.
4. **Подготовка магнитных частичек:** во время охлаждения смеси (этап 3) отберите 60 мкл **МЧ** в стерильную 1.5 мл пробирку (аккуратно ресуспендируйте МЧ пипетированием). МЧ поставляются в концентрации 1 мг/мл. Добавьте 200 мкл **0.5x промывочного буфера**. Суспендируйте МЧ пипетированием. Используя магнитный штатив, соберите МЧ (частички собираются прибл. в течении 30 сек) и тщательно удалите супернатант. Ни в коем случае не центрифугируйте МЧ. Промойте МЧ 3 раза **0.5x промывочным буфером**, каждый раз собирая МЧ в магнитном штативе и тщательно удаляя супернатант. После последней промывки ресуспендируйте МЧ в 50 мкл **0.5x промывочного буфера**.
5. Перенесите смесь (этап 3) в пробирку с отмытыми МЧ. Ресуспендируйте МЧ пипетированием или кратковременным встряхиванием на вортексе.
6. Оставьте смесь на 10 мин при комнатной температуре.
7. Соберите МЧ с помощью магнитного штатива, тщательно отберите супернатант  
! (сохраните этот супернатант, пока не убедитесь, что мРНК была удовлетворительно связана и элюирована).
8. Промойте МЧ, используя магнитный штатив, четыре раза по 400 мкл **0.1x промывочным буфером**, каждый раз тщательно суспендируя МЧ и тщательно отбирая супернатант. После последней промывки уберите как можно больше супернатанта из пробирки. (остатки даже незначительного количество соли может полностью блокировать элюцию)
9. Суспендируйте МЧ в 50 мкл **воды, свободной от РНаз**, инкубируйте при +70 °С в течении 5 мин.  
! (при уменьшении температуры или/и времени элюции выход мРНК может уменьшаться более чем на 50%).
10. Соберите МЧ, используя магнитный штатив, и перенесите супернатант, содержащий мРНК, в стерильную 1.5 мл пробирку. Не выбрасывайте МЧ.
11. Повторите процедуру элюции (этап 9-10), суспендировав осадок МЧ в 50 мкл **воды, свободной от РНаз**.  
! (Не выбрасывайте использованные магнитные частицы. МЧ, несущие биотин-меченый праймер, можно повторно использовать для дополнительного выделения мРНК из образца того же самого материала. Для этого магнитные частицы нужно суспендировать в 50 мкл **0.5x промывочного буфера**).



## Комментарии к разделам

“Протокол выделения мРНК непосредственно из ткани или культуры клеток”

и

“Протокол выделения мРНК из тотальной РНК”

### Повторная процедура выделения мРНК

Ваш материал может содержать большее количество мРНК, чем было захвачено и съэлюировано в ходе выделения. Чтобы выделить дополнительные количества мРНК можно повторить выделение из раствора этого же материала еще один или несколько раз, используя отмытые после первого выделения МЧ (в этом случае не требуется добавление биотин-меченого праймера), или добавлять свежие МЧ и свежий биотин-меченый праймер.

### Процедура дополнительной очистки мРНК

Когда требуется получить высокоочищенную мРНК (например, для целей дальнейшего клонирования), желательно повторить процедуру очистки уже выделенной мРНК еще раз. Для этого воспользуйтесь протоколом “Протокол выделения мРНК из тотальной РНК”.

**!** *(Для дополнительной очистки используйте только свежие МЧ и биотин-меченый праймер)*

### Повторное использование МЧ

МЧ, несущие биотин-меченый праймер, могут быть использованы повторно несколько раз, правда, с некоторой потерей их связывающей способности. Мы не рекомендуем использовать однажды использованные МЧ для выделения из новых и особенно из отличных друг от друга образцов. МЧ могут содержать остатки мРНК предыдущих выделений и поэтому их повторное использование в диагностических экспериментах может приводить к артефактам. МЧ можно отмыть 2-4 раза водой при 60 °С в течении 10-15 мин. Хранить отмытые МЧ мы рекомендуем в PBS буфере, содержащим 0.02% азид натрия, который предотвращает микробный зарост. Присутствие в растворе соли (например, 150 mM NaCl) препятствует агрегации МЧ при хранении. Не забывайте всегда отмывать МЧ перед использованием, как было описано выше.

### Работа с магнитным штативом

Магнитный штатив содержит специальный магнит с редкоземельными элементами, придающими магниту высокую степень намагничивания. Магнит создает сильное магнитное поле, поэтому его необходимо держать подальше от компьютерных дискеток и электронного оборудования, воздействие на которое может приводить к их повреждению. Воздействие высоких и низких температур и сильные удары могут привести к повреждению магнита и/или потери им магнитных свойств.

### Переосаждение и концентрация мРНК

(необходимость этой процедуры для каждого выделения спорна (особенно если учесть очень незначительные количества получаемой специфической мРНК, но мы приводим наши рекомендации, если потребность в такой процедуре все же возникнет)

Для переосаждения мРНК часто рекомендуют использовать **гликоген** (10 мг/мл) (*пока этот реактив не входит в наш набор*). Его добавляют к раствору мРНК (обычно 2 мкл рабочего раствора на 500 мкл водного раствора мРНК) для улучшения процесса осаждения. Затем добавляют ацетат аммония или натрия, изопропанол и смесь можно сразу же центрифугировать. При использовании гликогена процесс осаждения ускоряется, хотя и при его использовании бывают случаи, когда мРНК осаждается не полностью. Мы предлагаем стандартный способ осаждения мРНК из водного раствора (применяемые для переосаждения реактивы в состав набора не входят).

*(Необходимо помнить, что если количество взятого для выделения материала было мало или мРНК в материале была частично деградирована, то в результате переосаждения можно ничего не получить. В любом случае, пока работа по получению конечного продукта мРНК полностью не закончена, не выбрасывайте промежуточные растворы)*



1. Для переосаждения мРНК добавьте к водному раствору мРНК 1/10 объема 7 М ацетата аммония (можно применять 3 М ацетат натрия) и 1 объем изопропанола. Перемешайте, поместите смесь на -20 °С на ночь, можно, в крайнем случае, на час, но выход мРНК может быть существенно меньшим.
2. Центрифугируйте при 12000-14000xg 10 мин. Осадок мРНК после центрифугирования может быть не виден. Пусть это вас не смущает.
3. Отберите супернатант, промойте осадок 75%-ым этанолом и еще раз повторите процедуру центрифугирования. При промывке этанолом осадок мРНК может отслаиваться от стенки пробирки и плавать в виде чешуйки. Поэтому отбирать супернатант следует очень осторожно, чтобы не захватить осадок.
4. Высушите осадок в вакуумном эксикаторе (*в крайнем случае можно высушить осадок в стерильном ламинарном шкафу; сушить осадок на столе ни в коем случае нельзя, так как препарат в процессе сушки может быть загрязнен РНазами*), растворите в подходящем количестве воды, свободной от РНаз.  
Храните водный раствор мРНК при -70 °С. Для длительного хранения мРНК лучше хранить при -70 °С под 75%-ым этанолом.

Если необходимо сконцентрировать мРНК из раствора, где концентрация мРНК очень низка и при переосаждении может быть потеряна, заморозьте водный раствор мРНК при -20 °С и высушите в вакуумном эксикаторе типа SpeedVac (*эта процедура может занять несколько часов*). Затем растворите в подходящем объеме воды, свободной от РНаз.

### Расчет концентрации и чистоты полученной мРНК

Определить концентрацию и чистоту полученной мРНК можно спектофотометрически и электрофоретически (помните, что количества выделенной специфической мРНК могут быть столь малы, что для их визуализации может потребоваться весь выделенный материал).

### Спектрофотометрическое определение концентрации и чистоты мРНК

Концентрацию мРНК определяют по адсорбции при длине волны 260 нм (A<sub>260</sub>). A<sub>260</sub> равно 1 соответствует 40 мкг мРНК. Для определения концентрации в полученном образце, возьмите часть образца, разведите до необходимого для измерения в кювете объема, измерьте A<sub>260</sub> и рассчитайте концентрацию образца по следующей формуле:

$$A_{260} \times [\text{фактор разведения}] \times 40 \text{ мкг/мл} = [\text{ваш образец}] \text{ мкг/мл мРНК}$$

Чистоту образца определяют исходя из соотношения A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>. Если A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> ≥ 2.0, то препарат достаточно чист. (*Кювета должна быть свободна от РНаз. Для этого перед внесением в кювету образца, ополосните кювету раствором 50 мМ NaOH, а затем стерильной водой*)

Как и все другие способы выделения мРНК за поли(A)<sup>+</sup> последовательность, полученный препарат, очищенный в ходе одного раунда, обычно содержит небольшие примеси рибосомальной РНК. Примеси этой РНК следует учитывать, когда идет расчет количества полученной мРНК. Чтобы оценить количество этих примесей, в случаях, когда количество полученного материала это позволяет, мы рекомендуем провести денатурирующий электрофорез в агарозном геле.

### Определение концентрации и чистоты мРНК в агарозном геле

Количество и качество мРНК может быть быстро определено при помощи электрофореза в агарозном геле с последующим окрашиванием этидиум бромидом. И хотя денатурирующий гель (см. ниже) устраняет эффект образования вторичной структуры, влияющей на подвижность мРНК в геле, проводить электрофорез в нативном геле значительно проще и чувствительность при окрашивании этидиум бромидом также выше. Денатурирующий формальдегидный гель создает условия, при которых можно более точно определить размер РНК и перенос на мембрану идет эффективнее. Для проведения электрофореза обработайте электрофоретическую ванну



раствором 50 мМ NaOH, а затем ополосните стерильной водой, чтобы избавиться от РНаз. Для проведения электрофореза РНК используйте отдельную электрофоретическую ванну, так как препараты ДНК содержат очень много РНаз.

### Электрофорез в нативном геле

1. Приготовьте 1%-ый агарозный гель, используя стерильный TBE буфер. Добавьте в гель при его приготовлении этидиум бромид до концентрации 0.5 мкг/мл.
2. Смешайте образец (0.5-2 мкг РНК) с буфером для нанесения (10% сахарозы, 90% деионизованного формамида (*готовится путем обработки формамида хелатирующими смолами*), 0.05% бромфенолового синего, 0.05% ксилена цианолового). Объем образца не должен быть больше 50% от объема буфера.
3. Прогрейте образец при 60-65 °С в течении 3 мин, охладите до комнатной температуры и наносите образец на гель.

мРНК, выделенная предлагаемым набором выглядит как шмер от 8000 до 300 оснований. Регион с наибольшей интенсивностью расположен в районе прилбл. 2000 оснований. РНК, выделенная в ходе одного раунда, обычно содержит 10-25% примеси рибосомальной РНК (рРНК), видимой на геле в качестве полос в районе 2000 оснований (18s рРНК), 5000 оснований (28s рРНК) и иногда в районе 100 оснований (5s рРНК) (*наличие полос не свидетельствует о плохой работе системы, примеси рРНК не влияют функционально на большинство областей применения мРНК*). Полосы рРНК обычно не видны после второго раунда очистки.

### Электрофорез в формальдегидном (денатурирующем) геле

Ключевой момент для получения хорошего формальдегидного геля -приготовление тонкого геля (прилбл. 2-3 мм) и нанесение маленького объема образца. Толщина формальдегидного геля приблизительно наполовину тоньше геля, используемого для разделения препаратов ДНК.

(Приводимый ниже протокол рассчитан на приготовление 50 мл раствора геля).

1. Добавьте 1 г агарозы высокого качества в 36 мл воды, обработанной диэтил пирокарбонатом, добавьте 5 мл **10x MOPS-ЭДТА** (0.5 М MOPS, рН 7.0, 10 мМ ЭДТА, стерилизованный фильтрованием). Кипятите до полного растворения агарозы. Перелейте горячий раствор в стерильный мерный цилиндр на 50 мл и доведите до 41 мл водой, обработанной диэтил пирокарбонатом. Дайте раствору остыть до прилбл. 60 °С, добавьте 9 мл 37%-ого формальдегида и залейте гель в форму. Дайте гелю постоять 1 час при комнатной температуре, добавьте **1x MOPS-ЭДТА** и проведите префорез при 60 В в течении 30 мин.
2. Смешайте 9 мкл буфера для нанесения (см. выше) и 2 мкл образца РНК (нужно брать около 3 мкг РНК). Прогрейте смесь при 70 °С в течении 5 мин и сразу наносите на гель. Чтобы избежать "вымывания" образца из лунки геля, следите за тем, чтобы буфер едва закрывал лунки геля (*еще одна причина, вызывающая вымывание образца из геля, присутствие следов спирта в растворе образца. Поэтому при высушивании образца старайтесь избавляться от малейших следов спирта*).
3. Проведите электрофорез при 60 В в течении 1 часа. Постарайтесь обеспечить рециркуляцию буфера в электрофоретической ванне. Если автоматическая рециркуляция недоступна, периодически прекращайте электрофорез и вручную переносите буфер из одной части электрофоретической ванны в другую.
4. Проведите окраску геля в течении 2 мин в растворе 5 мкг/мл этидиум бромида, приготовленном на воде, обработанной диэтил пирокарбонатом. От избытка этидиум бромида отмывайте гель в воде в течении 5 мин. Поменяйте воду и проведите отмывку еще 10 мин. Сфотографируйте гель или проводите отмывку дальше.

Окраска формальдегидного геля при помощи этидиум бромида имеет свои трудности, так как этидиум бромид крепко связывается с матрицей геля и создает сильный фон. Уменьшить фон можно уменьшая время окрашивания и увеличивая продолжительность отмывок. Как вариант, можно перед окрашиванием выдержать гель в воде 10-15 мин, для удаления из геля формальдегида, это позволит РНК ренатурировать и, таким образом, повысится способность к связыванию этидиум бромида.



## Возможные проблемы и пути их решения

Проблема	Возможная причина	Возможное решение
МЧ в лизате медленно собираются магнитным штативом	Вязкость лизата слишком высока или лизат плохо отцентрифугирован	- Повторите процедуру гомогенизирования образца и/или повторите центрифугирования лизата на большей скорости или более продолжительное время. - Уменьшите количество ткани или клеток, используемых для выделения
мРНК отсутствует или выход мРНК низкий	Остатки соли не полностью удалены перед элюцией  Присутствие РНаз, мРНК деградировала в процессе выделения	Повторите элюцию осадка МЧ деионизованной водой повторно  Повторите выделение, принимая во внимание предосторожности, описанные выше
Конечный раствор мРНК слабо окрашен	В растворе содержатся остатки МЧ со стадии элюции	Отцентрифугируйте раствор РНК при 12000-14000хg в течении 5 мин и перенесите чистый раствор в стерильную пробирку

### Последний совет

Когда вы приступаете к выделению специфической мРНК, всегда необходимо помнить, что количества специфической мРНК всегда несоизмеримо меньше, чем количества поли(А) фракции мРНК. Разница в количествах составляет порядки, а в отдельных случаях, если экспрессии искомого гена нет, то и мРНК также будет отсутствовать в исходном материале. Как следствие – ожидаемый выход мРНК должен быть так мал, что мы даже не рекомендуем использовать метод электрофоретической оценки качества продукта. Единственная возможность убедиться, что выделено то, что ожидается – реакция обратной транскрипции на полученном материале с последующей ПЦР.

**Желаем Вам успехов !**

