

Выделение ДНК и РНК из растений на магнитных частицах SileksMagNA

Выделение ДНК из растений на магнитных частицах SileksMagNA-G

Кат. номер: KIDPL0100

Выделение ДНК/РНК из растений на магнитных частицах SileksMagNA

Кат. номер: KIRPL0100

Назначение: выделение ДНК и РНК из растений

Условия хранения: +4°C

Условия транспортировки: особых условий не требуется

Содержание:

1. Состав набора	1
2. Дополнительные реактивы	2
3. Меры предосторожности	2
4. Описание	2
5. Протокол выделения	4
6. Комментарии к протоколу	6
7. Связанные продукты	7
8. Приложение 1. Долгосрочное хранение нукл. кислот в буфере <i>FinalWash</i>	8
9. Приложение 2. RNA Protector	8
10. Контактные данные	9

1. Состав набора

Набор содержит количество реагентов, достаточное для проведения 100 процедур выделения в соответствии с предлагаемым протоколом.

Компонент набора

• Буфер Plant Lysis 1	15 мл
• Буфер Plant Lysis 2	15 мл
• Меркаптоэтанол (для кат. номера: KIRPL0100)	1 мл
• Стелянные шарики для гомогенизации	10 мл
• Магнитные частицы SileksMagNA-G (для кат. номера: KIDPL0100)	1 мл
• Магнитные частицы SileksMagNA (для кат. номера: KIRPL0100)	1 мл
• Буфер Binding	30 мл
• Буфер Wash 1	10 мл
• Буфер Wash 2	60 мл
• Буфер Final Wash	60 мл
• Буфер Elution	10 мл
• RNA Protector (для кат. номера: KIRPL0100)	0.5 мл

2. Дополнительные реактивы

Хлороформ-изоамиловый спирт

Для работы с набором потребуется смесь хлороформ:изоамиловый спирт (24:1 по объему).

В случае отсутствия изоамилового спирта можно использовать только хлороформ.

Смесь и хлороформ должны храниться в темном месте, при охлаждении (желательно при +4 °С), под слоем дистиллированной воды, короткая эстрагирует продукты распада хлороформа.

РНКаза и/или ДНКаза (приобретается отдельно)

Поскольку в процессе выделения на частицах выделяются оба типа нуклеиновых кислот, для удаления нежелательного типа нуклеиновой кислоты требуется применение соответствующей нуклеазы.

Мы рекомендуем проводить обработку нуклеазой после процедуры выделения. Это позволяет получить более качественный результат.

Для удаления нуклеазы мы рекомендуем воспользоваться нашим набором «Очистка ДНК и РНК после ферментативных реакций», кат. номер K0900 (приобретается отдельно).

3. Меры предосторожности

Некоторые компоненты набора могут нанести вред здоровью в случае проглатывания, длительной ингаляции или попадания на кожу и в глаза. Настоятельно рекомендуем для работы использовать перчатки и защитные очки.

Не смешивайте компоненты набора с кислотами, хлорными дезинфектантами и отбеливателями. Это может привести к реакции с выделением токсичных паров. Если для удаления промывочных буферов используется аспиратор, проследите, чтобы колба для сбора была пуста или не содержала кислот и хлорных дезинфектантов.

В наборе используются органические соединения, длительное ингаляционное воздействие которых может вызывать головокружения и головные боли.

Избегайте попадания компонентов набора на одежду, кожу и в глаза.

При попадании компонентов набора в глаза нужно немедленно промыть глаза большим количеством воды. 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.

4. Описание

Основная проблема при выделении из растительного материала – большое разнообразие исходных образцов. Несмотря на то, что существует несколько модификаций протоколов выделения, ни один протокол нельзя считать универсальным. Качество выделения всегда будет зависеть от типа (лист, иголка, зерно, мякоть и т.д.) и состояния образца (время и температура сбора, стадия роста и т.д.). Даже при использовании коммерческого набора необходима адаптация набора к конкретному образцу. Основной проблемой выделения являются компоненты – в основном, полисахариды и полифенолы – ингибирующие последующие ферментативные реакции.

В предлагаемом наборе мы постарались сделать процедуру выделения более универсальной (не самой лучшей) и воспроизводимой. Выделение с помощью набора позволяет получить нуклеиновую кислоту в количествах и чистоте, необходимых для аналитических и исследовательских работ. Набор позволяет проводить всю процедуру выделения непосредственно в пробирке на 1,5 мл. В случае работы с некоторыми специфическими типами образцов - в первую очередь, плохо поддающихся разрушению - может потребоваться растирание в ступке или использование дезинтегратора (гомогенизатор, мельница для размельчения).

Время выделения составляет от 1 часа до 2 часов в зависимости от особенностей выделения. Выделенная нуклеиновая кислота – ДНК и РНК - может использоваться сразу или после обработки соответствующей нуклеазой для проведения любой ферментативной реакции (постановки реакции обратной транскрипции, ПЦР, секвенирования и т.п.), а также для любых других молекулярно-биологических применений.

Протокол выделения можно модифицировать для масштабирования, в случае, когда требуется получение большего количества нуклеиновой кислоты. Для масштабирования необходимо пропорционально изменить количества используемых реактивов.

Сбор, хранение и подготовка растительного материала

Наилучшим вариантом является выделение нуклеиновой кислоты из свежесобранных образцов. Особенно важно использование свежего материала при анализе экспрессии генов. При невозможности провести выделение в течение суток образцы следует хранить в не пропускающей влагу упаковке (например, полиэтиленовом пакете) в холодильнике при температуре +4 °С. При необходимости длительного хранения образцы необходимо либо засушить, либо заморозить. В первом случае рекомендуется пассивная сушка при комнатной температуре. Нужно иметь в виду, что нуклеиновая кислота, особенно РНК, плохо сохраняются в высушенных образцах. Использование нагревающих сушильных шкафов для ускорения высушивания существенно снижает выход РНК. В случае, если используется заморозка, важно помнить, что после оттаивания образец должен быть обработан немедленно. Хранение или повторная заморозка размороженного образца крайне нежелательны. В результате разрыва клеток кристаллами льда высвобождается множество нуклеаз, вызывающих быструю деградацию РНК.

Для отбора и обработки пробы удобны следующие приёмы:

- **Лист.** Высечку листовой пластины в форме диска легко получить с помощью стандартной пробирки типа Эппендорф. Для этого поместите листовую пластину между горлышком пробирки и крышкой. Закрыв крышку, вырежьте таким образом из листа диск.
- **Хвоя.** Хвоинку можно поместить в пробирку целиком. Перед процедурой выделения хвоинку лучше разрезать на более мелкие фрагменты. Это существенно облегчит её гомогенизацию.
- **Семена, зёрна.** Можно хранить непосредственно в пробирке. Перед обработкой семена желательнее замочить в буфере *Plant Lysis* и дать им набухнуть. В зависимости от характеристик исходного материала для набухания может потребоваться от 30 минут до нескольких часов (необходимо подбирать экспериментально в каждом конкретном случае).
- **Мясистые ткани.** Например, мякоть плодов, ткани растений-суккулентов. Из-за сравнительно малого числа клеток на единицу объёма содержание ядер, а следовательно, нуклеиновых кислот, в таких тканях невелико. В связи с этим требуется большее количество исходного материала. Рекомендуемый объём образца — не менее 100-150 мм³. Для получения образца удобно воспользоваться скальпелем или ножом, вырезав образец кубической формы со стороной около 5 мм.

Таблица 1. Рекомендуемые количества различных образцов*.

Образец	Количество образца
Листья без выраженной сочной или мясистой паренхимы (напр., клён, берёза, роза, огурец и т.п.).	1 диск диам. 10 мм
Листья с выраженной сочной или мясистой паренхимой (напр., сочные чешуи и побеги луков, листья капусты, разл. толстянки и т.п.).	2-3 диска диам. 10 мм или объём 150 мм ³
Хвоя	1-2 хвоинки ели, пихты 0,5-1 хвоинка сосны, кедра
Мякоть плодов (томат, яблоко и т.п.)	150 мм ³
Проростки	1 шт. длиной 1 см
Сухие семена и зёрна	2-3 шт. мелких семян, 1 зерно или крупное семя
Гербарные образцы, сухие растения	Аналогично соответствующим свежим образцам (см. выше)

*Приведённые в таблице данные являются приблизительными. В каждом конкретном случае требуется подбор оптимального количества.

5. Протокол выделения из растений на магнитных частицах

Схема протокола

Этап	Добавляемые компоненты	Количества	Действия или время
1	Образец Шарики для гомогенизации Буфер Plant Lysis 1+2 Меркаптоэтанол (для выделения РНК, кат. KIRPL0100)	50 мкл 250 мкл 10 мкл	Тщательно гомогенизировать
2			+65 °С, 30 минут
3			Центрифугировать, 12000 об./мин, 5 мин.
4			Перенести супер в новую пробирку
5	Хлороформ:изоамиловый спирт	200 мкл	Вортекс
6			Центрифугировать, 12000 об./мин, 5 мин.
7			Перенести супер в новую пробирку
8	Хлороформ:изоамиловый спирт	200 мкл	Вортекс
9			Центрифугировать, 12000 об./мин, 5 мин.
10			Перенести 100 мкл супера в новую пробирку
11	Буфер Binding	300 мкл	Пипетировать, инкубировать 5 мин при T _{комн}
12	Магнитный частицы	10 мкл	Пипетировать Инкубировать 5 мин при T _{комн}
13			Собрать частицы в магнитном штативе
14			Удалить супер
15	Буфер Wash 1	100 мкл	Пипетировать
16			Собрать частицы в магнитном штативе
17			Удалить супер
18	Буфер Wash 2	400 мкл	Пипетировать
19			Собрать частицы в магнитном штативе
20			Удалить супер
21	Буфер Wash 2	200 мкл	Пипетировать
22			Собрать частицы в магнитном штативе
23			Удалить супер
24	Буфер Final Wash	400 мкл	Пипетировать
25			Собрать частицы в магнитном штативе
26			Удалить супер
27	Буфер Final Wash	200 мкл	Пипетировать
28			Собрать частицы в магнитном штативе
29			Удалить супер
30			+60 °С, 5 минут
31	Буфер Elution	50 мкл	
32			+60 °С, 5 минут
33			Собрать частицы в магнитном штативе
34			Перенести супер в новую пробирку

Протокол выделения

Перед выделением обязательно внимательно прочитайте комментарии к протоколу.

1. Внесите в 1.5 мл пробирку шарики для гомогенизации в количестве прибл. 50 мкл по объему.
Внесите **250 мкл** буфера **Plant Lysis 1+2** (125 мкл Plant Lysis 1 и 125 мкл Plant Lysis 2)
Внесите **10 мкл меркаптоэтанола** (для выделения РНК, набор с кат. номером KIRPL0100)
Внесите образец.
Гомогенизируйте образец как можно тщательнее.
2. Поместите пробирку в термостат и инкубируйте в течение **30 минут при +65 °С**.
В процесс инкубации периодически встряхивайте пробирку на вортексе.
3. Центрифугируйте пробирку в течение **5 минут при 12000 об./мин**.
4. Перенесите супернатант в новую пробирку.
5. Добавьте к супернатанту **200 мкл** смеси **хлороформ:изоамиловый спирт**.
Хорошо перемешайте на вортексе.
6. Центрифугируйте пробирку в течение **5 минут при 12000 об./мин**.
7. Перенесите супернатант в новую пробирку.
8. Добавьте **200 мкл** смеси **хлороформ:изоамиловый спирт**. Хорошо перемешайте на вортексе.
9. Центрифугируйте пробирку в течение **5 минут при 12000 об./мин**.
10. Перенесите **100 мкл супернатанта** в новую пробирку.
11. Добавьте к супернатанту **300 мкл** буфера **Binding**.
Перемешайте содержимое пробирки пипетированием.
Инкубируйте пробирку в течение **5 минут при T_{комн.}**
12. Внесите **10 мкл магнитных частиц**.
SileksMagNA-G для выделения ДНК или SileksMagNA для выделения ДНК и РНК.
Перемешайте содержимое пробирки пипетированием.
Инкубируйте пробирку в течение **5 минут при T_{комн.}**
13. Соберите частицы в магнитном штативе.
14. Удалите супернатант.
15. Добавьте к частицам **100 мкл** буфера **Wash 1**.
Перемешайте содержимое пробирки пипетированием.
16. Соберите частицы в магнитном штативе.
14. Удалите супернатант.
15. Добавьте к частицам **400 мкл** буфера **Wash 2**.
Перемешайте содержимое пробирки пипетированием.
16. Соберите частицы в магнитном штативе.
17. Удалите супернатант.
18. Добавьте к частицам **200 мкл** буфера **Wash 2**.
Перемешайте содержимое пробирки пипетированием.
19. Соберите частицы в магнитном штативе.
20. Удалите супернатант.
21. Добавьте к частицам **400 мкл** буфера **Final Wash**.
Перемешайте содержимое пробирки пипетированием.
22. Соберите частицы в магнитном штативе.
23. Удалите супернатант.
24. Добавьте к частицам **200 мкл** буфера **Final Wash**.
Перемешайте содержимое пробирки пипетированием.
25. Соберите частицы в магнитном штативе.
26. Удалите супернатант.

27. Просушите частицы в термостате в течение **5 минут при +60 °С**.
28. Добавьте к частицам **50 мкл** буфера **Elution**.
29. Поместите частицы для элюции в термостат на **5 минут при +60 °С**.
30. Соберите частицы в магнитном штативе.
31. Перенесите супернатант, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту, в чистую пробирку.

Если целью выделения является РНК, внесите в образец **5 мкл** препарата **RNA Protector** (для кат. номера: KIRPL0100). Для получения препарата, содержащего только ДНК или РНК, полученную нуклеиновую кислоту нужно обработать соответствующей нуклеазой.

ДНК. Протокол для удаления РНК с использованием РНКазы

Для РНКазы не требуется специального буфера. Фермент можно добавлять прямо в образец. Добавьте 1 мкл РНКазы и инкубируйте 30 минут при +37 °С.

Для удаления нуклеазы мы рекомендуем воспользоваться нашим набором «Очистка ДНК и РНК после ферментативных реакций», кат. номер K0900 (приобретается отдельно).

РНК. Протокол для удаления ДНК с использованием ДНКазы I (из расчета на конечный объем 100 мкл)

1. Смешайте смесь, состоящую из:

- 10 мкл образца
- 10 мкл 10-кратного буфера для ДНКазы I
- 1 мкл ДНКазы I (прибл. 2 ед.)
- 79 мкл деионизированная стерильная вода

2. Инкубируйте 10 минут при +37 °С.

3. Инактивируйте фермент нагреванием в течение 10 минут при +75 °С.

Для удаления ДНКазы мы также рекомендуем воспользоваться нашим набором «Очистка ДНК и РНК после ферментативных реакций», кат. номер K0900 (приобретается отдельно).

6. Комментарии к протоколу

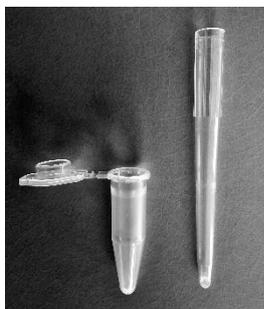
1. Для получения воспроизводимых результатов важно качественно гомогенизировать образец.



В набор входят стеклянные шарики для гомогенизации, которые позволяют в большинстве случаев не использовать такие способы гомогенизации, как перетирание в ступке или разрушение в мельнице. Чтобы эффективно гомогенизировать образец при помощи стеклянных шариков, мы рекомендуем использовать микропестик для 1.5 мл пробирок.

В качестве примера можно рассмотреть вариант, предлагаемый компанией CarlRoth.

<https://www.carlroth.com/com/en/homogenisers/micro-pestle-rnase-dnase-free/p/cxh9.1>



Сделать подобный микропестик можно также самостоятельно. Для этого нужно тонкую часть 1 мл наконечника для пипетки нагреть на пламени горелки (можно использовать пламя зажигалки) до начала плавления наконечника и образование капли. Затем нужно быстро и с нажимом упереть в дно 1.5 мл пробирки и немного поворачивать. Микропестик готов.

Также можно использовать стеклянную палочку с закругленным концом соответствующего диаметра. Конец палочки можно обработать надфилем для придания большей шероховатости.

В случае, если нужно обрабатывать большое количество образцов, мы рекомендуем использовать гомогенизирующую мельницу с шариками для гомогенизации.



На рисунках примеры мельниц.

С принципом работы таких мельниц можно познакомиться, посмотрев видео компании, производящих эту продукцию:

<https://www.youtube.com/watch?v=hqNvV4xiBbM>

2. Другим важным условием воспроизводимого выделения является стандартизация сбора образцов. Образцы по возможности нужно собирать на одной и той же стадии развития и в одном и тех же условиях окружающей среды. Если сбор образцов требует их накопления, необходимо наиболее оптимальный способ сохранения образца для последующего выделения. Сегодня существует много методов, которые хорошо отработаны и дают хорошие результаты для сбора и хранения собираемых образцов.
3. Буфер Plant Lysis, используемый в наборе, состоит из двух компонентов - Plant Lysis 1 и Plant Lysis 2 - и позволяет проводить выделение из разных образцов растений. Этот буфер дает возможность проводить выделение из образцов иголок, мхов, засушенных образцов. Выделение из свежих листьев с использованием этого буфера тем более не является проблемой. При хранении буфера Plant Lysis 1 при температуре +4 °C в буфере образуется осадок, который нужно растворить, поместив пробирку с буфером в горячую водяную баню до полного растворения осадка. Образование осадка не влияет на свойства буфера. При хранении буфера Plant Lysis 1 при комнатной температуре осадок в буфере не образуется.
4. Инкубирование с буфером Plant Lysis (смесь двух компонентов: Plant Lysis 1 и Plant Lysis 2) при +65 °C особенно важно для образцов, содержащих смолы, в также засушенных образцов. Рекомендуемое время инкубации с буфером после гомогенизации в приводимом выше протоколе (30 минут) может быть изменено в зависимости от образца и его состояния. Например, для свежих листьев и проростков инкубация может быть сокращена до 15 минут без потерь эффективности выделения. Для образцов типа иголок, а также засушенных образцов, в зависимости от их вида и состояния, может потребоваться увеличение времени инкубации до 1 часа. Время инкубации – это процедура, которая всегда требует оптимизации.
5. Двойная обработка смесью хлороформ:изоамиловый спирт (или только хлороформом в самом крайнем случае) позволяет лучше подготовить материал для дальнейшей очистки.
6. Выбор частиц для выделения зависит от предпочтительного типа выделяемой нуклеиновой кислоты. Частицы SileksMagNA-G позволяют выделять более чистую ДНК. РНК также присутствует в результате выделения, но некоторые формы РНК могут отсутствовать. Для полного удаления РНК требуется обработка РНКазой после выделения. Частицы SileksMagNA выделяют тотальную нуклеиновую кислоту, включая всю возможную ДНК и РНК, за исключением микро РНК. Нежелательную нуклеиновую кислоту можно удалить соответствующей нуклеазой.

7. Связанные продукты

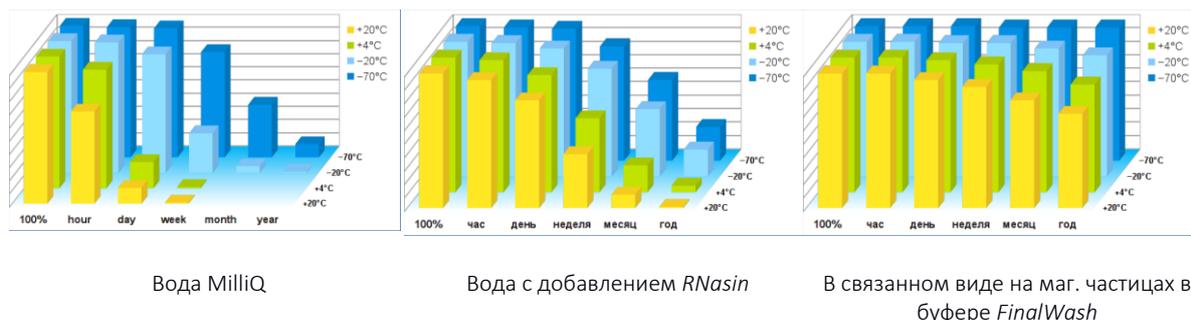
- SileksMagNA, магнитные частицы для выделения ДНК и РНК, кат. номер K0171
- SileksMagNA-G, магнитные частицы для улучшенного выделения ДНК, кат. номер K0172
- LabMix Mini 201, лабораторный миксер, кат. номер EQMM201
Миксер позволяет ускорить процедуру выделения, заменяя пипетирование
- Магнитные штативы для работы с магнитными частицами:
MagRack6, кат. номер EQMR006-2
MagRack16, кат. номер EQMR016

Приложение 1

Долгосрочное хранение нуклеиновых кислот в буфере *FinalWash*

Если в процессе работы с образцами требуется их накопление после выделения, мы рекомендуем собирать результаты выделений на частицах в буфере *FinalWash*. Не нужно элюировать сорбированную на частицах нуклеиновую кислоту. Магнитные частицы в буфере *FinalWash* можно хранить в диапазоне температур от комнатной до -70 °С. Нуклеиновая кислота, сорбированная на частицах, как ДНК, так и РНК, не подвергается деградации. Для элюции и окончательного выделения можно использовать только часть суспензии, в то время как остальную часть может использовать как архив.

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 РНКаз и окислительных повреждений. Поскольку препарат не является белковой 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 $\frac{1}{10}$ 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).

6. Контактные данные

телефон: +7 495 737 4224

эл. почта: info@sileks.com