

Выделение микро РНК на магнитных частицах SileksMagNA-Direct, бесфенольный метод (плазма, сыворотка, слюна, моча)

Кат. номер: KIMIRNA0300

Назначение: выделение микро РНК из образцов плазмы, сыворотки, слюны, мочи

Условия хранения: +4°C

Условия транспортировки: при температуре окружающей среды, особых условий не требуется

Состав набора

Набор содержит количество реагентов, достаточное для проведения 100 процедур выделения с использованием образца в объеме 300 мкл. Одно стандартное выделение предполагает использование 300 мкл образца.

Компонент набора

• Буфер DEMIX	50 мл
• Буфер APS	30 мл
• Магнитные частицы SileksMagNA-Direct	1 мл
• Буфер Elution	10 мл
• Буфер Fixation	0.3 мл
• RNA Protector	0.5 мл

Мы постоянно работаем над улучшением качества наших наборов и регулярно вносим изменения, улучшающие качество нашей продукции. Пожалуйста, следите за актуальной версией описания к набору. Спрашивайте нас о новых изменениях, чтобы всегда получать наилучшие результаты.

Содержание:

1. Описание	2
2. Важная информация	2
3. Дополнительные оборудование и реактивы, которые не входят в набор	2
4. Подготовка пробы	3
Подготовка плазмы	3
Подготовка мочи	4
Подготовка слюны	4
5. Выделение микро РНК	5
6. Комментарии	6
Приложение 1. RNA Protector	7
7. Связанные продукты	8
8. Контактные данные	8

1. Описание

Набор разработан на основе частиц SileksMagNA-Direct, которые обладают уникальной способностью сорбировать короткие олигонуклеотиды длиной от нескольких нуклеотидных оснований. Для максимальной эффективности сорбции фрагментов меньше 10 нуклеотидов нами разработаны буфера, позволяющие осуществлять эффективную сорбцию таких коротких фрагментов.

Нужно отметить, что набор выделяет все нуклеиновые кислоты, находящиеся в образце – микро РНК, РНК, ДНК – но содержание крупных нуклеиновых кислот может быть ниже по сравнению с наборами, предназначенными для выделения более крупных РНК и/или ДНК (например, KIRPS0100, Выделение ДНК/РНК из плазмы и сыворотки крови на магнитных частицах SileksMagNA). Несмотря на то, что в процессе выделения выделяются все виды нуклеиновых кислот, набор оптимизирован для выделения именно микро РНК.

При необходимости удаления из полученного материала ДНК, мы рекомендуем воспользоваться ДНКазой, как описано в протоколе ниже.

Преимуществом набора является неиспользование для выделения агрессивных и токсичных реактивов типа фенол, хлороформ или соли гуанидина. Отмывка сорбированных на частицах нуклеиновых кислот осуществляется дистиллированной водой без потери сорбированного материала. Сорбированные нуклеиновые кислоты могут при необходимости храниться в водной суспензии (от +4 °С до комнатной температуры) длительное время до момента окончательного выделения.

2. Важная информация

- Процедура выделения может масштабироваться как в большую, так и в меньшую сторону без потери качества. Важным условием является соблюдения соотношений объемов трех используемых в процедуры выделения компонентов: образец – буфер DEMIX - буфер APS. Емкость частиц является избыточной по отношению к тому количеству нуклеиновых кислот, которые содержатся в рекомендованных для выделения источниках образцов, поэтому количество добавляемых частиц может не масштабироваться.
- При работе с пробой в целях безопасности используйте медицинскую маску, закрывающую рот и нос, перчатки и защитные очки.
- Полученный в процессе выделения материал содержит нуклеиновую кислоту в денатурированной одноцепочечной форме и не рекомендуется для хранения даже после добавления реактива *RNA Protector*. Мы рекомендуем использовать полученный материал в тот же день. При необходимости, храните выделенный материал при -20 °С или ниже не дольше 1-2 суток.

3. Дополнительные оборудование и реактивы, которые не входят в набор

- микропробирки
- Вортекс
- Центрифуга с оборотами 12000 – 14000 обор./мин
- Магнитный штатив для пробирок 1.5 мл
- Вода, тип I, 18 МОм/см
- Термостат, дающий температуру +80 °С

4. Подготовка пробы

Правильная подготовка пробы играет важную роль для корректного анализа как выделяемой микро РНК, содержащейся во внеклеточных везикулах, так и других внеклеточных нуклеиновых кислот. Главная задача при подготовке пробы – избежать попадания в пробу нуклеиновых кислот из клеток, которые могут быть повреждены в процессе сбора и транспортировки образца.

Подготовка плазмы

В процессе транспортировки и хранения образца крови, клетки могут разрушаться. В результате в образце образуется дополнительный пул нуклеиновых кислот, не относящихся к исходно циркулирующим нуклеиновым кислотам (цНК). Наличие нуклеиновых кислот от разрушенных в процессе транспортировки клеток крови снижает достоверность и чувствительность выявления истинных цНК.

Для предотвращения разрушения клеток крови в процессе хранения и транспортировки мы рекомендуем использовать для забора крови пробирки со специальными стабилизаторами. Такими стабилизаторами могут являться КзЭДТА, формальдегид и другие реагенты, повышающие стабильность клеток.

Лучший способ подготовки качественной плазмы - отделение плазмы по возможности сразу после получения образца крови с последующим хранением при температуре не выше +4 °С. Для длительного хранения подготовленную плазму рекомендуется замораживать при -80 °С.

Мы рекомендуем для отделения плазмы использовать следующую процедуру:

1. Центрифугируйте образец крови при комнатной температуре при 800 x *g*, 20 минут. Мягкое центрифугирование необходимо для предотвращения повреждения клеток крови.
2. Осторожно отберите плазму в другую пробирку. При отборе плазмы избегайте захватывания клеток, собравшихся на разделе фаз.
3. Центрифугируйте собранную плазму при комнатной температуре при 6000 x *g*, 20 минут. Повторное центрифугирование позволяет удалить оставшиеся в плазме клетки.
4. Отберите плазму в новую пробирку. Храните плазму при температуре не выше +4°С.

Рекомендуемое время хранения плазмы (в процессе хранения замороженной плазмы избегайте замораживание/оттаивание):

- +4 °С - до 1 месяца
- 20 °С - до 1 года
- 80 °С - несколько лет

Подготовка мочи

Моча должна собираться в соответствии со стандартными установленными процедурами.

Для лучшей сохранности нуклеиновых кислот в моче мы рекомендуем использовать специальные пробирки со стабилизаторами, в которых ДНК и РНК в моче могут стабильно храниться длительное время (более 2 лет).

Мы рекомендуем для подготовки мочи, свободной от клеток, использовать следующую процедуру:

1. Центрифугируйте образец мочи при комнатной температуре при 800 x *g* , 20 минут. Мягкое центрифугирование необходимо для предотвращения повреждения клеток и удаления дебриса.
2. Осторожно отберите мочу в другую пробирку. При отборе мочи избегайте захватывания осадка.
3. Центрифугируйте собранную мочу при комнатной температуре при 6000 x *g* , 20 минут. Повторное центрифугирование позволяет удалить оставшиеся в моче клетки и дебрис.

После получения образца мочи мы рекомендуем хранить его при температуре +4 °C не более 5 суток. Для длительного хранения мочу рекомендуется замораживать при -80 °C.

Рекомендуемое время хранения мочи (в процессе хранения замороженной мочи избегайте замораживание/оттаивание):

- +4 °C - 5 суток
- 20 °C - до 1 месяца
- 80 °C - несколько лет

Подготовка слюны

Слюна должна собираться в соответствии со стандартными установленными процедурами.

Стандартно используются стерильные ватные тампоны, которые впитывают слюну. Тампон затем помещается в контейнер с буфером и транспортируется для дальнейшего лабораторного анализа.

Мы рекомендуем для подготовки слюны, свободной от клеток, использовать следующую процедуру:

1. Центрифугируйте образец слюны при комнатной температуре при 8000 x *g* , 20 минут. Мягкое центрифугирование необходимо для предотвращения повреждения клеток и удаления дебриса.
2. Осторожно отберите образец слюны в другую пробирку. При отборе супернатанта избегайте захватывания осадка.

После получения образца слюны мы рекомендуем хранить его при температуре +4 °C не более 5 суток. Для длительного хранения полученную слюну рекомендуется замораживать при -80 °C.

Рекомендуемое время хранения слюны (в процессе хранения замороженной слюны избегайте замораживание/оттаивание):

- +4 °C - 5 суток
- 20 °C - до 1 месяца
- 80 °C - несколько лет

5. Выделение микро РНК

Процедура выделения

В протоколе описывается процедура выделения из образца плазмы. Выделение из сыворотки, слюны, мочи производится аналогично.

Выделение микро РНК из плазмы

1. Внесите **300 мкл** плазмы в 1.5 мл пробирку.
2. Добавьте **450 мкл** буфера **DEMIX**.
3. Тщательно перемешайте раствор пипетированием.
4. Инкубируйте при комнатной температуре в течение **5 минут**.
5. Внесите **300 мкл** буфера **APS** (см. Комментарии к разделу Выделение микро РНК).
6. Закройте пробирку и тщательно перемешайте образовавшуюся суспензию на вортексе.
7. Инкубируйте при комнатной температуре в течение **5 минут**.
8. Центрифугируйте пробирку при **12'000 об./мин** (или 14'000 об./мин) в течение **5 минут**.
9. Перенесите супернатант в чистую пробирку. Будьте осторожны, чтобы не захватить осадок.
10. Внести **5 мкл** хорошо перемешанных частиц **SileksMagNA-Direct™**. Тщательно ресуспендируйте эту смесь.
11. Инкубируйте **5 мин** при $T_{комн}$ при периодическом перемешивании.
12. Поместите пробирку в **магнитный штатив** для сбора частиц (может потребоваться до 1 минуты).
13. Удалите супер. Будьте осторожны, чтобы не захватить магнитные частицы.
14. Поместите пробирку в **немагнитный штатив**.
15. Добавьте **1000 мкл** дистиллированной воды. Тщательно ресуспендируйте эту смесь.
16. Поместите пробирку в **магнитный штатив** для сбора частиц (может потребоваться до 1 минуты).
17. Удалите супернатант. Будьте осторожны, чтобы не захватить магнитные частицы.
18. Поместите пробирку в **немагнитный штатив**.
19. Добавьте **200 мкл** дистиллированной воды.
20. Тщательно ресуспендируйте до получения гомогенной суспензии.
21. Поместите пробирку в **магнитный штатив** для сбора частиц. Удалите супернатант.
22. После удаления супернатанта поместите пробирку в **немагнитный штатив**.
23. Добавьте **30 мкл** буфера **Elution**.
24. Тщательно перемешайте до получения гомогенной суспензии.
25. Инкубируйте пробирку в **термостате при 80°C** в течение **5 минут**.
26. Поместите пробирку в **магнитный штатив** для сбора частиц.
27. Перенесите элюат содержащий микро РНК в чистую пробирку.
28. К собранному элюату добавьте **2 мкл** буфера **Fixation**.

Для замедления деградации выделенной нуклеиновой кислоты добавьте к элюату **3 мкл** препарата **RNA Protector**. Помните, даже при хранении при -20°C выделенная нуклеиновая кислота подвержена сильной деградации.

Мы рекомендуем использовать выделенный материал в тот же день.

При необходимости удаления из полученного материала мешающую ДНК мы предлагаем воспользоваться ниже проводимым протоколом.

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**Общие замечания**

Предлагаемый набор оптимизирован для выделения микро РНК. Сохранение пропорционального количества других сопутствующих при выделении нуклеиновых кислот не является задачей данного набора и может варьировать от типа пробы.

Комментарии к разделу Подготовка пробы

Приводимые в разделе способы подготовки пробы являются рекомендательными, но не обязательными. Могут использоваться другие способы подготовки пробы или другие условия (другие буфера, параметры центрифугирования и т.п.). Основное требование к подготовленной пробе – в подготовленной пробе не должны содержаться примеси нуклеиновых кислот, образовавшихся из клеток, разрушенных в процессе манипуляции с пробой.

Комментарии к разделу Выделение микро РНК

Протокол рассчитан на выделение из образца объемом 300 мкл.

При использовании образца меньших объемов мы рекомендуем масштабировать выделение в соответствии с ниже приводимой таблицей.

Таблица 1. Масштабирование протокола в зависимости от начального количества образца

Исходный образец, мкл	Буфер DEMIX, мкл	Буфер APS, мкл	Магн. частицы, мкл	Промывка 1, H ₂ O, мкл	Промывка 2, H ₂ O, мкл	Буфер Elution, мкл	Буфер Fixation, мкл	RNA Protector, мкл
100	150	100	5	400	200	30	2	3
200	300	200	5	800	200	30	2	3
300	450	300	5	1000	200	30	2	3

Буфер **APS** способствует удалению белка из образца. Образование суспензии белка происходит при достижении pH от нейтрального до слабокислого значения (от 6 до 4). При работе с образцом плазмы процесс образования суспензии белка особенно четко виден после добавления необходимого количества буфера **APS**. Если после добавления буфера **APS** и его тщательного перемешивания раствор остается прозрачным, необходимо дополнительно добавлять буфер **APS** маленькими каплями до образования устойчивой белковой суспензии.

Необходимое количество добавляемого буфера **APS** можно контролировать с помощью индикаторной pH бумажки. В качестве референтного цвета индикаторной pH бумажки можно использовать дистиллированную воду. Цвет индикаторной бумажки с нанесенной каплей воды соответствует тому значению pH, которое

должно быть достигнуто при добавлении буфера **APS** к образцу. Значение pH может быть немного более кислым (до pH4), но ни в коем случае не щелочным (pH7 и выше). Выделение микро РНК из образца с щелочным значением pH возможно, но качество и воспроизводимость выделения может быть хуже. Особенно важно контролировать количество добавляемого буфера **APS** по значению pH к образцам с низким содержанием белка, где образование нерастворимой суспензии видно хуже. Это рекомендуется делать при первом проведении эксперимента по выделению из конкретного типа образца.

При работе с плазмой, после внесения буфера **APS**, наблюдается самое обильное образование нерастворимой белковой суспензии по сравнению с другими типами проб (слюна, моча). Чаще всего, именно при работе с плазмой может потребоваться корректировать рекомендуемые в протоколе количества буфера **APS**.

После центрифугирования и осаждения образовавшейся белковой суспензии супернатант должен быть прозрачным и иметь цвет от бесцветного до светло-желтого.

Элюировать микро РНК сорбированную на частицах SileksMagNA-Direct нужно только с применением входящего в набор специального буфера **Elution** для данных частиц и затем обязательно нужно добавлять к собранному элюату буфер **Fixation**. Элюция сорбированной микро РНК при помощи воды или TE невозможна.

При необходимости удаления ДНК, мы рекомендуем после выделения провести дополнительную обработку образца ферментом ДНКазой с последующим обязательным переосаждением оставшейся нуклеиновой кислоты.

Для такого переосаждения мы рекомендуем использовать наш набор «Очистка ДНК/РНК после ферментативных реакций», кат. номер K0900.

При дальнейшей работе с микро РНК мы рекомендуем соблюдать следующие правила:

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 постановке реакции синтеза первой цепи в объеме 25 мкл рекомендуемое количество элюата - 2.5 мкл. Использование большего количества элюата может приводить к ингибированию реакции синтеза первой цепи и, как следствие, снижение чувствительности выявления в полимеразной цепной реакции.

Приложение 1

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 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, KIRPS0100,
- Выделение циркулирующей нуклеиновой кислоты из плазмы и сыворотки крови на магнитных частицах SileksMagNA, KIRCNA1000,
- 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 1/10 от объема, добавляемого для элюции.

Например, если для элюции использовали 30 мкл элюирующего буфера, после элюции и отбора

собранныго препарата нужно добавить 3 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 инаktivацией фермента).

6. Связанные продукты

- 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

7. Контактные данные

телефон: +7 495 737 4224

эл. почта: info@sileks.com