

Выделение циркулирующей нуклеиновой кислоты (ДНК/РНК) на магнитных частицах SileksMagNA-Direct™ (выделение из плазмы, сыворотки, мочи и других биологических образцов)

Кат. номер: KIRCN2000

Назначение набора: выделение циркулирующих нуклеиновых кислот (ДНК/РНК)

Условия хранения: +4°C

Условия транспортировки: особых условий не требуется

Количество выделений: 100 процедур выделений из 2 мл исходного образца

При необходимости выделения из образца с большим объемом необходимо приобрести дополнительно буфер **Lysis&Denaturation**, кат. номер BLD250, 250 мл

Применение выделенного материала: синтез первой цепи, ПЦР, секвенирование, другие молекулярно-биологические приложения

ВНИМАНИЕ! В связи с особенностями химии частиц и протоколом выделения, полученные нуклеиновые кислоты не могут быть использованы для рестрикционного анализа, а также для визуализации с использованием электрофореза.

Комплект поставки

Буфера, поставляемые с частицами *SileksMagNA-Direct™*, являются необходимыми компонентами для функционирования частиц.

Компонент	Количества
• Буфер Lysis&Denaturation SileksMagNA-Direct™	250 мл
• Магнитные частицы SileksMagNA-Direct™	1 мл
• Буфер Wash 1 SileksMagNA-Direct™	30 мл
• Буфер Elution SileksMagNA-Direct™	10 мл
• Буфер Fixation SileksMagNA-Direct™	0.5 мл

Таблица 1. Описание и свойства магнитных частиц *SileksMagNA-Direct™*

Основа	Оксид железа, инкапсулированный в инертную оболочку
Тип магнетизации	Суперпарамагнетик (нет остаточного намагничивания)
Форма частиц	Сфера
Размер	150-200 нм
Концентрация	50 мг/мл
Емкость частиц:	4 мкг тотальной нуклеиновой кислоты на 10 мкл частиц 8 мкг тотальной нуклеиновой кислоты на 1 мг частиц
Буфер хранения	вода
Условия хранения	+4 °C, не замораживать

Содержание:

1. Меры предосторожности	2
2. Описание	2
3. Циркулирующая нуклеиновая кислота (цНК)	3
4. Протокол выделения из плазмы	4
4.1. Подготовка плазмы	4
4.2. Выделение цНК из 2 мл плазмы	5
5. Протокол выделения из мочи	6
5.1. Подготовка мочи	6
5.2. Выделение цНК из 10 мл мочи	7
6. Рекомендации по модификации протокола	8
7. Комментарии	8
8. Связанные продукты	10
9. Контактные данные	10

1. Меры предосторожности



Некоторые компоненты набора могут нанести вред здоровью в случае проглатывания, ингаляции, 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 компонентов.

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

При попадании в глаза немедленно промыть 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

Частицы *SileksMagNA-Direct*™ являются принципиально новым типом частиц. Поверхность частиц покрыта специальным полимером, обеспечивающим избирательное связывание нуклеиновых кислот всех форм и размеров. Связывание белков на поверхности частиц минимально. Как правило, белки связываются в комплексе с нуклеиновыми кислотами и удаляются во время процедуры отмывки.

В отличие от частиц с силикатным покрытием, частицам *SileksMagNA-Direct*™ для связывания нуклеиновых кислот не требуется специальных условий, таких как наличие солей в необходимой концентрации, спиртов, буферов с определенным значением pH.

Частицы *SileksMagNA-Direct*™ эффективно связывают нуклеиновые кислоты находящиеся в одно- или двухцепочечной форме, а также короткие олигонуклеотиды. Связывание может проходить в любых

условиях - в присутствии или отсутствии солей, хаотропных агентов, спиртов, ионных и неионных детергентов, в дистиллированной воде.

Частицы *SileksMagNA-Direct*™ в первую очередь предназначены для выделения свободно циркулирующих нуклеиновых кислот (цНК) из плазмы, сыворотки, мочи и других биологических образцов. Применение частиц для выделения из других объектов нами изучается. По мере поступления информации мы будем предлагать новые протоколы и сопутствующие реактивы.

В отличие от частиц с силикатным покрытием, частицы *SileksMagNA-Direct*™ прочно связывают и удерживают связанную нуклеиновую кислоту. Нуклеиновая кислота может быть десорбирована с поверхности частиц только с использованием специального буфера *Elution SileksMagNA-Direct*™. После отбора элюата в полученный препарат необходимо добавить буфер *Fixation SileksMagNA-Direct*™, который стабилизирует полученную нуклеиновую кислоту и предохраняет ее от повреждений.

При использовании частиц *SileksMagNA-Direct*™ процедура выделения выглядит следующим образом:

1. **подготовка образца** (лизис и денатурация): освобождение нуклеиновых кислот от комплексов с белками и другими компонентами,
2. **связывание**: не требуются дополнительные буфера для связывания нуклеиновых кислот на частицах,
3. **отмывка**: рекомендуется одна отмывка с использованием специального буфера *Wash SileksMagNA-Direct*™ для удаления примесей, связанных с сорбированными нуклеиновыми кислотами. Дальнейшая отмывка осуществляется с применением дистиллированной воды.
4. **элюция**: специальный буфер *Elution SileksMagNA-Direct*™.

3. Циркулирующая нуклеиновая кислота

ДНК, РНК и микро РНК являются составными частями клеток. Небольшое количество нуклеиновых кислот обнаруживается циркулирующими в крови. Эти молекулы ДНК, РНК и микро РНК образуются из разрушенных клеток, содержимое которых выбрасывается в кровоток. Наличие таких циркулирующих ДНК, РНК и микро РНК позволяет использовать неинвазивные методы диагностики для выявления ряда клинических заболеваний и нарушений. Обнаружение специфических ДНК, РНК и микро РНК создаёт уникальный потенциал для ранней диагностики различных патологий:

- обнаруживать рак на ранних стадиях,
- вирусные инфекции,
- проводить неинвазивную перинатальную диагностику в период беременности, выявлять некоторые формы диабета,
- многое другое.

Терминология:

Плазма крови – это жидкий компонент цельной крови. В ней нет клеток, но содержатся все белки (глобулины, альбумины, фибриногены и др.), электролиты, факторы свёртывания и прочие неклеточные компоненты крови.

В упрощённом виде это можно представить как: Плазма = [Кровь] – [Клетки]

Сыворотка крови – это плазма крови, лишённая факторов свёртывания и прочих белков, вовлечённых в этот процесс. Обычно это жидкость, которая остаётся после свёртывания крови (коагуляции). В упрощённом виде это можно представить как: Сыворотка = [Плазма] – [Факторы свёртывания]

Свободно циркулирующие нуклеиновые кислоты могут находиться в плазме и сыворотке как в свободном несвязанном виде, так и в виде комплексов с протеинами, гистонами, быть связанными на поверхностях клеток или остатках клеточных стенок, находится внутри везикул.

Для выделения и анализа цНК чаще применяют плазму, чем сыворотку. В связи с этим, процедура подготовки плазмы для выделения цНК является одной из важнейших стадий, обеспечивающая эффективность последующего выделения.

4. Протокол выделения из плазмы

4.1 Подготовка плазмы

Правильная подготовка плазмы - очень важная процедура.

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.

Самый надежный способ подготовки качественной плазмы - отделение плазмы 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 600 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°C.

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

- +4 °С - до 2-х недель
- 20 °С - до 1 года
- 80 °С - несколько лет

4.2 Выделение цНК из 2 мл плазмы

1. Внесите **2 мл** плазмы или сыворотки крови в 5 мл пробирку.
2. Добавьте **2.4 мл** буфера **Lysis&Denaturation**.
Тщательно перемешайте раствор.
3. Инкубируйте при комнатной температуре в течение **20 минут**.
4. Внести **5 мкл** хорошо перемешанных частиц **SileksMagNA-Direct™**. Тщательно перемешайте эту смесь.
5. Перемешать, инкубировать **10 мин** при $T_{комн}$ при периодическом перемешивании.
6. Поместите пробирку в **магнитный штатив** для сбора частиц (может потребоваться до 1 минуты).
Удалите супернатант.
Будьте осторожны, чтобы не захватить магнитные частицы.
7. Поместите пробирку в **немагнитный штатив**.
Ресуспендируйте магнитные частицы в **200 мкл** буфера **Wash 1**.
Тщательно перемешайте до получения гомогенной суспензии.
Перенесите полученную суспензию в 1.5 мл пробирку для дальнейшего выделения.
8. Поместите пробирку в **магнитный штатив** для сбора частиц. Удалите супернатант. 9. Поместите пробирку в **немагнитный штатив**.
Добавьте **500 мкл** дистиллированной воды
Тщательно перемешайте до получения гомогенной суспензии.
10. Поместите пробирку в **магнитный штатив** для сбора частиц. Удалите супернатант.
11. Повторите процедуру описанную в пп. 9, 10 еще 2 раза.
12. После удаления супернатанта поместите пробирку в **немагнитный штатив**.
Добавьте **50 мкл** буфера **Elution**.
Тщательно перемешайте до получения гомогенной суспензии.
13. Инкубируйте пробирку в **термостате при 80°C** в течение **5 минут**.
14. Поместите пробирку в **магнитный штатив** для сбора частиц.
Перенесите ДНК/РНК содержащий элюат в чистую пробирку.
15. К собранному элюату добавьте **1 мкл** буфера **Fixation**.
Если для элюции использовали 100 мкл буфера Elution, после элюции необходимо добавить 2 мкл буфера Fixation.
Храните полученный раствор с выделенной нуклеиновой кислотой при -20°C .

Если целью выделения является РНК, мы рекомендуем как можно скорее после выделения провести постановку реакции обратной транскрипции, так как растворенная РНК может деградировать в процессе хранения.

5. Протокол выделения из мочи

5.1 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 $600 \times g$, 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 $6000 \times g$, 20 минут. Повторное центрифугирование позволяет удалить оставшиеся в моче клетки и дебрис.

После получения образца мочи мы рекомендуем хранить его при температуре $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ не более 5 суток. Для длительного хранения мочу рекомендуется замораживать при $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

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

- $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ - 5 суток
- $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ - до 1 месяца
- $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ - несколько лет

5.2 Выделение цНК из 10 мл мочи

Мы рекомендуем использовать объем 10 мл, как оптимальный для большинства методов анализа. В случае начального объема, отличающегося от рекомендованного, измените пропорционально только количество добавляемого буфера *Lysis&Denaturation*. Добавляемые количества других компонентов остаются прежними.

1. Внесите **10 мл** мочи в 50 мл пробирку.
2. Добавьте **12 мл** буфера **Lysis&Denaturation**.
Тщательно перемешайте раствор.
3. Инкубируйте при комнатной температуре в течение **20 минут**.
4. Внести **5 мкл** хорошо перемешанных частиц **SileksMagNA-Direct™**. Тщательно перемешайте эту смесь.
5. Перемешать, инкубировать **10 мин** при $T_{комн}$ при периодическом перемешивании.
6. Поместите пробирку в **магнитный штатив** для сбора частиц (может потребоваться до 1 минуты).
Удалите супернатант.
Будьте осторожны, чтобы не захватить магнитные частицы.
7. Поместите пробирку в **немагнитный штатив**.
Ресуспандируйте магнитные частицы в **200 мкл** буфера **Wash**.
Тщательно перемешайте до получения гомогенной суспензии.
Перенесите полученную суспензию в 1.5 мл пробирку для дальнейшего выделения.
8. Поместите пробирку в **магнитный штатив** для сбора частиц. Удалите супернатант. 9. Поместите пробирку в **немагнитный штатив**.
Добавьте **500 мкл** дистиллированной воды
Тщательно перемешайте до получения гомогенной суспензии. 10.
Поместите пробирку в **магнитный штатив** для сбора частиц.
Удалите супернатант.
11. Повторите процедуру описанную в пп. 9, 10 еще 2 раза.
12. После удаления супернатанта поместите пробирку в **немагнитный штатив**.
Добавьте **50 мкл** буфера **Elution**.
Тщательно перемешайте до получения гомогенной суспензии.
13. Инкубируйте пробирку в **термостате при 80°C** в течение **5 минут**.
14. Поместите пробирку в **магнитный штатив** для сбора частиц.
Перенесите ДНК/РНК содержащий элюат в чистую пробирку.
15. К собранному элюату добавьте **1 мкл** буфера **Fixation**.
Если для элюции использовали 100 мкл буфера Elution, после элюции необходимо добавить 2 мкл буфера Fixation.
Храните полученный раствор с выделенной нуклеиновой кислотой при -20°C .

Если целью выделения является РНК, мы рекомендуем как можно скорее после выделения провести постановку реакции обратной транскрипции, так как растворенная РНК может деградировать в процессе хранения.

6. Рекомендации по модификации протокола

1. Мы рекомендуем брать магнитные частицы *SileksMagNA-Direct™* в следующих количествах:

от 100 мкл до 2 мл исходного образца плазмы, сыворотки	- 5 мкл,
от 2 мл до 10 мл исходного образца плазмы, сыворотки	- 10 мкл,
от 1 мл до 15 мл исходного образца мочи	- 5 мкл,
от 15 мл до 30 мл исходного образца мочи	- 10 мкл.

Однако, в зависимости от качества вашей пробы, из которой осуществляется выделение, и задач, может потребоваться оптимизировать количество магнитных частиц.

2. Для получения более высокой концентрации нуклеиновых кислот в элюате допустимо использовать для элюции меньший объем буфера *Elution*. Минимально допустимый объем буфера *Elution* должен составлять не менее 2-х объемов к объему частиц. Буфер *Fixation* следует добавлять в полученному элюату в следующих количествах:

до 50 мкл элюата	- 1 мкл буфер <i>Fixation</i> ,
100 мкл элюата	- 2 мкл буфер <i>Fixation</i> .

3. При оценке качества выделения мы рекомендуем отдавать предпочтение методам на основе ПЦР по сравнению с методами определения количества выделенной нуклеиновой кислоты на спектрофотометре и другим методам оптической детекции. Следует использовать соответствующую нормализацию, особенно при сопоставлении концентраций нуклеиновых кислот, выделенных с помощью данного набора и с помощью наборов других производителей. Влияние примесей и вносимые в наборы других фирм соосадиители разной природы могут создавать ложное впечатление о результативности выделения.

4. Отличительной особенностью магнитных частиц *SileksMagNA-Direct™* является низкое количество ингибирующих компонентов. Полученный в результате элюат может быть полностью (без разведения) использован в реакции синтеза первой цепи. Компоненты реакции могут быть добавлены непосредственно в элюат без необходимости разводить реакционную смесь водой.



ВАЖНОЕ ПРИМЕЧАНИЕ

Качественное суспендирование частиц является ключевым моментом для получения хорошего результата.

Для получения высокого выхода и чистоты ДНК/РНК необходимо тщательно ресуспендировать частицы на каждом этапе отмывок.

7. Комментарии

Общие замечания

В 1 мл плазмы здорового человека содержится в среднем от 1 до 50 нг циркулирующей нуклеиновой кислоты (цНК). Количество цНК увеличивается в плазме больных людей, в особенности у онкологических больных, и у беременных женщин.

Низкая концентрация получаемой цНК делает бессмысленным использование спектрофотометрических методов оценки выделенного материала, даже с использованием интеркалирующих флуоресцентных красителей. Единственным правильным методом оценки является количественная ПЦР.

При конструировании праймеров и зондов нужно принимать во внимание сильную фрагментацию цНК, а размер ампликона по возможности не должен превышать 100 п.н..

При исследовании РНК мы не рекомендуем использовать олиго(дТ) праймеры для синтеза первой цепи. Использование рандомизированных праймеров обычно позволяет увеличить чувствительность метода. Некоторые исследователи предпочитают использование геноспецифических праймеров для увеличения специфичности детекции, но это может уменьшать чувствительность метода.

Комментарии к пунктам протокола

1. Перед использованием плазмы или сыворотки убедитесь, что она не содержит клеток крови. Если есть подозрения, что в плазме присутствуют клетки крови, повторите процедуру подготовки плазмы (см. раздел Подготовка плазмы).

При использовании замороженной плазмы (мочи) после оттаивания плазмы (мочи) тщательно перемешайте ее до равномерного состояния.

2. Перед использованием магнитные частицы необходимо тщательно перемешать.

3. 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.

4. Длительное хранение выделяемой нуклеиновой кислоты (ДНК, РНК) на частицах позволяет проводить накопление образцов, выделяя их до стадии элюции по мере поступления, с последующим одновременным окончательным выделением. Такой подход позволяет исключить возможность повреждения выделенной нуклеиновой кислоты в процессе хранения.

5. В реакцию синтеза первой цепи можно вносить любое (вплоть до максимального) количество полученного элюата. Большое количество элюата не будет приводить к ингибированию реакции.

Хранение цНК, 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.

6. Связывание нуклеиновых кислот на поверхности частиц очень прочное. Десорбция проводится в жестких условиях: при повышенной температуре и с использованием специальных реагентов. При этом двухцепочечная форма переходит в одноцепочечную. В результате полученная нуклеиновая кислота не может быть использована для ферментативного расщепления двухцепочечных форм (рестрикционный анализ). На электрофореze результат выделения будет выглядеть как шмер или совсем не визуализироваться, а результаты анализа с использованием интеркалирующих красителей могут давать некорректную оценку концентрации. Единственными методами оценки могут быть: ПЦР, секвенирование, гибридизационные методы.

7. Для выделения микро РНК из плазмы, сыворотки, слюны, мочи мы рекомендуем специально разработанный для оптимального выделения микро РНК набор «Выделение микро РНК, бесфенольный метод (плазма, сыворотка, слюна, моча)», кат. номер: KIMIRNA0300.

8. Связанные продукты

1. Буфер **Lysis&Denaturation**, 250 мл, кат. номер BLD250
2. Лабораторный миксер **LabMix Mini 201**, кат. номер EQMM201
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

9. Контактная информация

телефон: +7 495 737 4224

эл. почта: info@sileks.com