

## Выделение тотальной нуклеиновой кислоты (ДНК и РНК) из мочи на магнитных частицах SileksMagNA

Кат. номер: KIRUR25

**Назначение набора:** выделение тотальной нуклеиновой кислоты (ДНК и РНК)

**Условия хранения:** +4°C

**Условия транспортировки:** особых условий не требуется

### Состав набора

Набор содержит количество реагентов, достаточное для проведения 100 процедур выделения. Одно выделение предполагает использование 25 мл мочи.

### Компонент набора

• Буфер <b>START</b>	1.5 л
• Буфер <b>Binding</b>	1.0 л
• Магнитные частицы <b>SileksMagNA</b>	1 мл
• Буфер <b>Wash 1</b>	30 мл
• Буфер <b>Wash 2</b>	30 мл
• Буфер <b>Wash 3</b>	30 мл
• Буфер <b>Final Wash</b>	30 мл
• Буфер <b>Elution</b>	10 мл
• <b>RNA Protector</b>	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. Меры предосторожности	2
2. Описание	2
3. Подготовка образца	3
4. Протокол выделения	4
Приложение 1	
Долгосрочное хранение нуклеиновых кислот в буфере <i>Final Wash</i>	6
Приложение 2	
RNA Protector	6
5. Комментарии	7
6. Связанные продукты	8
7. Контактные данные	8

## 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 aspirатор, проследите, чтобы колба-ловушка была пуста или не содержала указанных выше компонентов. 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

Набор предназначен для эффективного и быстрого (~30 мин) выделения тотальной нуклеиновой кислоты из мочи (включая нуклеиновую кислоту из содержащихся в моче клеток и всю свободную нуклеиновую кислоту, находящуюся в объеме). Выделенные нуклеиновые кислоты могут использоваться как в ПЦР, так и для любых других молекулярно-биологических применений (синтез кДНК путём обратной транскрипции, мечение, клонирование, секвенирование и т.д.). Принцип используемого в наборе метода основан на обратимом связывании нуклеиновых кислот на поверхности магнитных частиц.

Протокол выделения можно модифицировать, в случае, когда не требуется получение большего количества ДНК/РНК.

Большая часть ДНК и РНК в организме содержится внутри клеток. Небольшое количество нуклеиновых кислот обнаруживается свободно циркулирующим в крови и моче. Эти молекулы ДНК и РНК образуются как в ходе разрушения клеток, так и в ходе нормальной секреторной активности клеток, в ходе которой происходит образование внеклеточных везикул (экзосомы и другие), содержимое которых выбрасывается в кровоток и затем через почки попадают в мочу. Также источником циркулирующих нуклеиновых кислот могут служить находящиеся в кровотоке и моче вирусы и бактерии.

Наличие таких свободно циркулирующих ДНК и РНК позволяет использовать малоинвазивные методы диагностики для выявления ряда клинических заболеваний и нарушений. Обнаружение специфических ДНК и/или РНК создаёт уникальный потенциал для ранней диагностики

различных патологий.

Используя анализ циркулирующей нуклеиновой кислоты, можно обнаруживать рак на ранних стадиях, вирусные инфекции и многое другое.

Большинство наборов для выделения нуклеиновых кислот из мочи основаны на том, что на первой стадии проводится осаждение циркулирующих в моче клеток при помощи центрифугирования образца с последующим выделением из полученного осадка. Проблема в использовании данного подхода - возможное отсутствие клеток в образце.

Предлагаемый нами набор позволяет выделить всю находящуюся в образце нуклеиновую кислоту - как находящуюся в клетках, если они присутствуют, так и свободно циркулирующую нуклеиновую кислоту различного происхождения.

На Рисунке 1 схематически представлена процедура выделения нуклеиновых кислот из мочи. Общая схема сводится к обработке образца лизирующим и связывающим буферами, сорбции нуклеиновых кислот магнитными частицами. Затем частицы отмывают от загрязнений буферами из набора. После нескольких процедур отмывки нуклеиновые кислоты десорбируют.

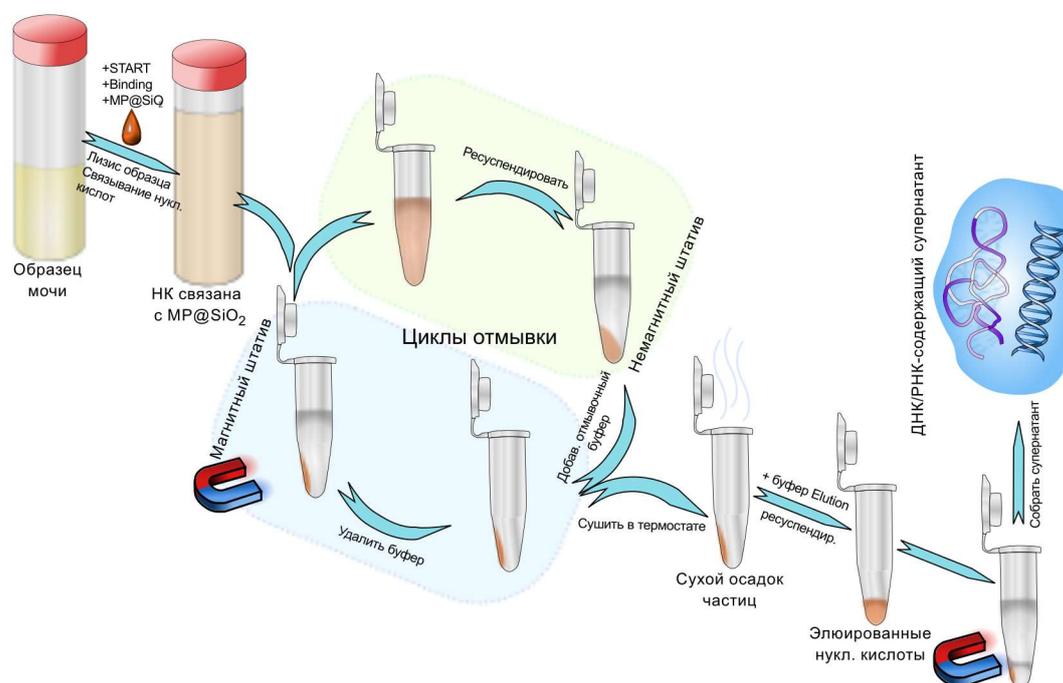


Рисунок 1. Схема процедуры выделения.

### 3. Подготовка образца

Для получения достоверного результата желательно, но не обязательно, использовать пул из образцов мочи, собранных в течении дня.

Рекомендуемые условия хранения: +4 °С.

Рекомендуемое время хранения: не дольше 5 дней.

Перед процедурой выделения образец необходимо перемешать.

### 4. Протокол выделения

**Важно!** Перед работой внимательно прочитайте раздел Комментарии.

**Перед началом работы:**

Проверьте все буфера на предмет наличия осадка. Выпадение осадка не означает порчу буфера. При образовании осадка прогрейте буфер до 50 °С до растворения осадка.

Буфера **Lisys&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:

- ручным пипетированием (требуется минимум 15 пипетирований каждого образца для качественного ресуспендирования);
- используя компактный миксер LabMix Mini 201 (5 секунд на низкой или средней скорости).

## Выделение нуклеиновых кислот из 25 мл мочи

- |        |   |
|--------|---|
| Lisys  | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Внесите <b>25 мл</b> образца мочи в пробирку на 50 мл.</li> <li>2. Добавьте <b>15 мл</b> хорошо перемешанного буфера <b>START</b> и тщательно перемешайте раствор.</li> <li>3. Инкубируйте при комнатной температуре в течение <b>5 минут</b>.<br/><i>Более длительная инкубация (до 15 минут) позволяет повысить выход ДНК/РНК.</i></li> <li>4. Внесите <b>10 мл</b> буфера <b>Binding</b> и тщательно перемешайте раствор. Инкубируйте при комнатной температуре <b>5 минут</b>.</li> <li>5. Добавьте <b>10 мкл</b> хорошо перемешанных магнитных частиц <b>SileksMagNA</b>. Тщательно перемешайте эту смесь. Инкубируйте <b>15 минут</b> при комн. темп. Мы рекомендуем использовать перемешивание на ротаторе во время инкубации.</li> <li>6. Поместите пробирку в <b>магнитный штатив</b> для сбора частиц (может потребоваться до <b>1 минуты</b>). Удалите супернатант. Будьте осторожны, чтобы не захватить магнитные частицы.</li> <li>7. Поместите пробирку в <b>немагнитный штатив</b>. Ресуспендируйте магнитные частицы в <b>300 мкл</b> хорошо перемешанного буфера <b>Wash 1</b> и тщательно перемешайте до получения гомогенной суспензии.</li> </ol> |
| Wash 1 | <p>Перенесите полученную суспензию в чистую 1.5 мл пробирку для дальнейшего выделения.</p> <p>Инкубируйте в течение <b>3 минут</b> при комнатной температуре. Во время инкубации несколько раз перемешайте содержимое пробирки.</p> <p>Использование шейкера для пробирок улучшает результат и сокращает время процедуры. При использовании шейкера инкубируйте тщательно гомогенизированные частицы в течение <b>2 минут</b> при 1250-1500 обор/мин в зависимости от модели шейкера.</p>   |
| Wash 2 | <ol style="list-style-type: none"> <li>8. Поместите пробирку в <b>магнитный штатив</b> для сбора частиц. Удалите супернатант.</li> <li>9. Поместите пробирку в <b>немагнитный штатив</b>. Добавьте <b>300 мкл</b> хорошо перемешанного буфера <b>Wash 2</b> и тщательно перемешайте до получения гомогенной суспензии.</li> </ol> <p>Инкубируйте в течение <b>3 минут</b> при комнатной температуре. Во время инкубации несколько раз перемешайте содержимое пробирки.</p> <p>Использование шейкера для пробирок улучшает результат и сокращает время процедуры. При использовании шейкера инкубируйте тщательно гомогенизированные частицы в течение <b>2 минут</b> при 1250-1500 обор/мин в зависимости от модели шейкера.</p>  |
| Wash 3 | <ol style="list-style-type: none"> <li>10. Поместите пробирку в <b>магнитный штатив</b> для сбора частиц. Удалите супернатант.</li> <li>11. Поместите пробирку в <b>немагнитный штатив</b>. Добавьте <b>300 мкл</b> буфера <b>Wash 3</b> и тщательно перемешайте до получения гомогенной суспензии.</li> </ol> <p>Инкубируйте в течение <b>3 минут</b> при комнатной температуре. Во время инкубации несколько раз перемешайте содержимое пробирки.</p> <p>Использование шейкера для пробирок улучшает результат и сокращает время процедуры. При использовании шейкера инкубируйте тщательно гомогенизированные частицы в течение <b>2 минут</b> при 1250-1500 обор/мин в зависимости от модели шейкера.</p>   |
|        | <ol style="list-style-type: none"> <li>12. Поместите пробирку в <b>магнитный штатив</b> для сбора частиц. Удалите супернатант.</li> </ol>   |

FinaWash

13. 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 без разрушения. Температура хранения может варьировать от комнатной (+22 °С) до -70 °С. Для завершения выделения переходите к пункту 14 данного протокола.

Элюция

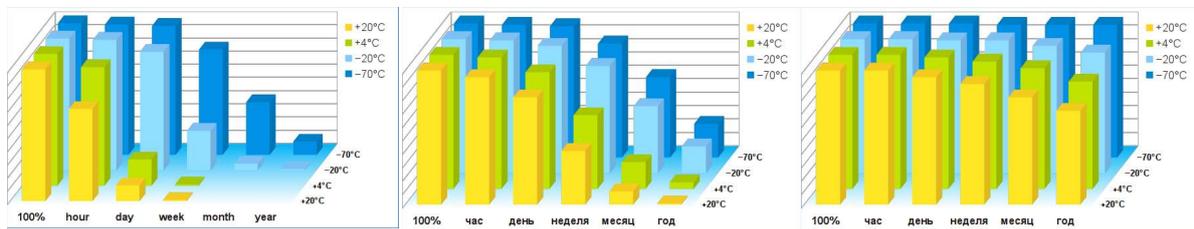
14. Поместите пробирку в **магнитный штатив** для сбора частиц. Удалите супернатант.
15. Инкубируйте пробирку в **термостате при 60 °С** в течение **5 минут**, чтобы высушить осадок частиц.
16. Добавьте **50 мкл** буфера **Elution**. Тщательно ресуспендируйте частицы до получения гомогенной суспензии.  
*Если хотите получить большую концентрацию ДНК/РНК, используйте 25 мкл буфера Elution вместо 50 мкл.*
17. Инкубируйте в **термостате при 60 °С** в течение **5 минут** или **10 минут** при **комнатной температуре**.  
Инкубирование при комнатной температуре позволяет получить ДНК/РНК с меньшим количеством примесей.
18. Поместите пробирку в **магнитный штатив** для сбора частиц. Перенесите ДНК/РНК-содержащий супернатант в чистую пробирку.
19. Если целью выделения была РНК, 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.

Храните полученный раствор с выделенной нуклеиновой кислотой при -20 °С.

## Приложение 1

### Долгосрочное хранение нуклеиновых кислот в буфере *FinalWash*

На диаграммах показана стабильность РНК при хранении в различных условиях:



Вода MilliQ

Вода с добавлением *RNasin*

В связанном виде на маг. частицах в буфере *FinalWash*

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  $1/10$  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 ДНКазой для удаления следов ДНК с последующей инактивацией фермента).

## 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.

## 5. Комментарии

Перед использованием образец необходимо тщательно перемешать. Можно использовать перемешивание на ротаторе в течение 5-10 минут или перемешивать вручную, переворачивая пробирку минимум 10-15 раз до полной гомогенизации.

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.

После тщательного ресуспендирования в промывочных буферах частицам необходима инкубация в течение 3 минут при ручном выделении и 1-2 минуты с использованием шейкера со скоростью 1250-1500 оборот/мин в зависимости от модели конкретного шейкера.

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.

Инкубирование более 5 минут при 60 °С может приводит к снижению чистоты выделяемой нуклеиновой кислоты за счет элюции частично сорбированных на частицах загрязняющих компонентов.

При хранении выделенной нуклеиновой кислоты нужно избегать замораживания-оттаивания, так как это приводит к фрагментации, вплоть до полного разрушения. Поэтому мы настоятельно рекомендуем использовать нуклеиновую кислоту для дальнейшей работы непосредственно после ее выделения.

При необходимости получения исключительно ДНК или РНК, мы рекомендуем после выделения провести дополнительную обработку образца соответствующим ферментом – ДНКазой или РНКазой – 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 РНК соблюдайте 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 постановки реакции синтеза первой цепи в объеме 25 мкл рекомендуемое количество элюата – не более 3 мкл. Использование большего количества элюата может приводить к ингибированию реакции.

## 6. 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  
MagRack16, кат. номер EQMR016  
MagRack40, кат. номер EQMR040  
MagRack50ML, кат. номер EQMR50ML

## 7. Контактные данные

телефон: +7 495 737 4224

эл. почта: [info@sileks.com](mailto:info@sileks.com)