

## SileksMag-oligo(dT)<sub>30</sub>

магнитные частицы с олиго(dT)<sub>30</sub> нуклеотидным зондом для выделения полиаденилированных мРНК

Кат. номер: K0190

**Назначение:** выделение полиаденилированных мРНК

**Условия хранения:** +4°C

**Условия транспортировки:** особых условий не требуется

Содержание:

1. Описание	1
2. Свойства и преимущества	2
3. Важная информация	2
4. Рекомендуемые буфера	3
5. Протокол выделения поли(А)РНК из культуры клеток	3
6. Связанные продукты	5
7. Контактные данные	5

### 1. Описание

Магнитные частицы с олиго(dT)<sub>30</sub> нуклеотидным зондом (oligo(dT)<sub>30</sub>) поставляются в виде водной суспензии в готовом для использования виде. Использование частиц возможно также в системах автоматического выделения.

Магнитные частицы с олиго(dT)<sub>30</sub> нуклеотидным зондом для аналитического выделения мРНК из неочищенных клеточных лизатов и ткани. Выделение происходит за счет гибридизация ковалентно связанных олиго(dT)<sub>30</sub> с полиаденилированным участком, присутствующим в большинстве мРНК эукариот. Частицы можно применять не только для прямого выделения мРНК после лизиса, но также для вторичной очистки ранее выделенной тотальной РНК.

Технология магнитной сепарации масштабируема и позволяет выделять интактную мРНК в небольших объемах, без необходимости концентрировать выделенную мРНК при помощи преципитации.

Частицы можно использовать многократно.

Со связанной на частицах мРНК можно поступить двумя способами:

1. элюировать,
2. использовать связанный олиго(dT)<sub>30</sub> нуклеотидный зонд в качестве праймера в реакции первой цепи кДНК.

Основное преимущество данных частиц в том, что они обладают низкой неспецифической сорбцией белков и нуклеиновых кислот на своей поверхности.

**Таблица 1. Описание и свойства магнитных частиц SileksMag-oligo(dT)<sub>30</sub>**

<b>Основа</b>	Оксид железа
<b>Тип магнетизации</b>	Суперпарамагнетик (нет остаточного намагничивания)
<b>Форма частиц</b>	Сфера
<b>Размер</b>	150-200 нм
<b>Концентрация</b>	5 мг/мл
<b>Емкость частиц:</b>	около 2 мкг поли(А) мРНК на 1 мг частиц
<b>Буфер хранения</b>	Дистиллированная вода
<b>Условия хранения</b>	+4 °C, не замораживать

## 2. Свойства и преимущества

Свойства	Преимущества
➤ Ковалентно пришитый олиго(dT) <sub>30</sub>	Надежная фиксация зонда на поверхности
➤ Высокая концентрация олиго(dT) <sub>30</sub> на поверхности	Возможно получение большого количества поли(А)РНК. 1 мг частиц с олиго(dT) <sub>30</sub> способен связать около 2 мкг поли(А)РНК
➤ Длинная ножка, на которой пришит олиго(dT) <sub>30</sub> к поверхности частиц	Значительно повышается эффективность связывания
➤ Связанные на поверхности мРНК могут быть непосредственно использованы в молекулярно-биологических приложениях	Связанную мРНК можно без предварительной элюции использовать в гибридизации, реакции обратной транскрипции и т.п.
➤ Низкое неспецифическое связывание нуклеиновых кислот	Возможно выделение мРНК свободных от примесей посторонних нуклеиновых кислот
➤ Инкапсулирование	Поверхность частиц химически инертная
➤ Частицы являются в высокой степени гомогенными	Выделению на частицах одинакового размера дает высокую воспроизводимость в разных условиях
➤ Устойчивость коллоидного состояния	Частицы легко переводятся в коллоидное состояние, не "слеживаются" при длительном хранении
➤ Быстрая собираемость в магнитном поле	Процедура выделения ускоряется
➤ Отсутствие остаточной намагниченности после удаления из магнитного поля	Частицы не слипаются, легко переводятся в коллоидное состояние
➤ Стабильность в биологических буферных системах от pH 5 до pH 9	Можно использовать максимально подходящие для конкретного объекта буфера для отмывок и хранения
➤ Стабильность в различных системах лизирующих и промывочных буферов от pH 5 до pH 12	Можно использовать максимально подходящие для конкретного объекта буфера
➤ Стабильность в детергентах	Можно использовать большинство стандартно применяемых детергентов (Tween 20, Triton X100, SDS и т.п.)
➤ Возможность многократного использования	Частицы могут быть отмыты и использованы многократно

## 3. Важная информация

- Не подвергайте частицы процедурам центрифугирования, замораживания и высушивания. Центрифугирование приводит к агрегации частиц и, как следствие, снижению их активности. Высушивание и замораживание также приводит к агрегации частиц.
- Перед началом работы проведите расчет необходимого количества частиц и исходного материала, исходя из емкости применяемых частиц.

#### 4. Рекомендуемые буфера

Для работы с магнитными частицами SileksMag-oligo(dT)<sub>30</sub> мы рекомендуем использовать именно те буфера, которые мы приводим ниже.

Использование буферов, которые рекомендуют другие производители в своих протоколах, может привести к ухудшению результата и качества выделения.

- *Рекомендуемый Буфер для лизиса и связывания (Lysis and Binding Buffer, LBB)*  
100 mM Tris-HCl, pH 8.0  
500 mM LiCl  
1% LiDS  
10 mM EDTA, pH 8.0  
5 mM DTT
- *Рекомендуемый Буфер для 1-ой промывки (Wash 1 Buffer, W1)*  
10 mM Tris-HCl, pH 8.0  
150 mM LiCl  
0.1% LiDS  
1 mM EDTA, pH 8.0
- *Рекомендуемый Буфер для 2-ой промывки (Wash 2 Buffer, W2)*  
0.1-кратный SSC, pH 7.0  
готовится из 20-кратного SSC (0,3 М цитрата натрия в 3 М NaCl, доводят до pH 7.0 с помощью HCl)
- *Рекомендуемый Буфер для элюции (Elution Buffer, El)*  
10 mM Tris-HCl, pH 8.0

#### 5. Протокол выделения поли(А)РНК из культуры клеток

Протокол рассчитан на выделение поли(А)РНК из общего числа клеток в количестве от  $1 \times 10^5$  до  $2 \times 10^5$ . Следуя данному протоколу, будет выделен практически 100%-ный пул поли(А)РНК.

##### Схема протокола

1	2		3		4		5	6	
От $1 \times 10^5$ до $2 \times 10^5$ клеток	200 мкл LBB	5 мин	20 мкл частиц	5 мин	200 мкл W1 2 раза	3 мин	200 мкл W2 5 раз	50 мкл EL	5 мин +65 °C
Сбор центри- фугирова- нием	Лизис		Связывание		1-я отмывка 2 раза		2-я отмывка 5 раз	Элюция	

1. Внесите в 1.5 мл пробирку суспензию клеток в количестве от  $1 \times 10^5$  до  $2 \times 10^5$ . Соберите клетки центрифугированием при 8000 об./мин в течение 5 минут. После центрифугирования тщательно удалите супернатант.
2. Добавьте к осадку клеток 200 мкл буфера LBB. Тщательно перемешайте содержимое пробирки пипетированием до полного лизиса клеток. Инкубируйте пробирку в течение 5 минут при комнатной температуре.
3. Добавьте к лизату 20 мкл хорошо ресуспендированных частиц SileksMag-oligo(dT)<sub>30</sub>, тщательно перемешайте содержимое пробирки пипетированием. Инкубируйте пробирку в течение 5 минут при комнатной температуре. Поместите пробирку в магнитный штатив, как можно тщательнее удалите супернатант.

4. Перенесите пробирку в немагнитный штатив. Добавьте к частицам 200 мкл буфера W1. Тщательно ресуспендируйте частицы пипетированием.  
Инкубируйте пробирку в течение 3 минут при комнатной температуре.  
Поместите пробирку в магнитный штатив, как можно тщательнее удалите супернатант.  
Повторите процедуру отмывки с буфером W1 еще раз.
5. Перенесите пробирку в немагнитный штатив. Добавьте к частицам 200 мкл буфера W2. Тщательно ресуспендируйте частицы пипетированием.  
Поместите пробирку в магнитный штатив, как можно тщательнее удалите супернатант.  
Повторите процедуру отмывки с буфером W5 еще 4 раза.  
Поместите пробирку в магнитный штатив, как можно тщательнее удалите.
6. После окончания промывки, ресуспендируйте частицы в 50 мкл буфера EL или стерильной воды.  
Инкубируйте пробирку в течение 5 минут при +65 °С.  
Перенесите препарат поли(А)РНК в чистую пробирку.

#### Рекомендации и комментарии к протоколу выделения из культур клеток

1. Если брать меньшее количество клеток, качество выделения будет выше.  
При выделении из ткани следует принимать во внимание количество клеток, содержащихся в образце. Рекомендуемый буфер для лизиса и связывания применим в большинстве случаев. При работе с тканью может потребоваться центрифугирование лизата для удаления не полностью лизированных кусочков ткани.  
При выделении из ранее выделенной тотальной РНК пробирку с образцом необходимо предварительно прогреть 5 минут при +65 °С, затем внести частицы SileksMag-oligo(dT)<sub>30</sub>, перемешать их пипетированием, и только затем внести буфер LBB.
2. Если нет возможности оценить и подсчитать количество клеток в стартовом материале, исходите из того, что образец после лизиса не должен ни в коем случае быть вязким. В случае вязкости лизата, его необходимо развести буфером LBB до состояния, когда вязкость будет отсутствовать.  
Время инкубации с буфером LBB в течение 5 минут – минимальное. Увеличение времени инкубации до 15 минут во многих случаях повышает качество выделения.
3. 20 мкл частиц SileksMag-oligo(dT)<sub>30</sub> достаточно, чтобы собрать практически всю поли(А)РНК из того количества клеток, которое мы рекомендуем в протоколе. При условии, что поли(А)РНК не подверглась деградации в процессе сбора и хранения материала.  
Наше утверждение основано на сравнительном выделении поли(А)РНК на частицах SileksMag-oligo(dT)<sub>30</sub> с выделением тотальной РНК на частицах SileksMagNA из того же количества клеток.
4. Во время отмывки буфером W1 необходима непродолжительная инкубация. Если это не делать, качество выделения снижается. В большинстве случаев, одной процедуры отмывки буфером W1 бывает достаточно, но две процедуры дают большую гарантию качества отмывки.
5. Для максимально полного удаления примесей посторонних нуклеиновых кислот требуется 5 процедур отмывки буфером W2. Качество отмывки зависит от того, насколько тщательно частицы пипетируются во время каждой отмывки.  
Для достижения максимального эффекта при отмывке мы рекомендуем после первой отмывки перенести частицы в чистую пробирку и провести еще 4 процедуры в чистой пробирке.  
Наша рекомендация основана на том, что в некоторых случаях пластик, в котором происходит выделение, может сорбировать на своей поверхности различные примеси, в том числе, нуклеиновые кислоты. При элюции эти примеси с большой вероятностью могут оказаться в конечном препарате.
6. Использование буфера EL или воды не принципиально. Также, как и объем элюции. Мы рекомендуем конечный объем элюции от 30 до 50 мкл. Элюция должна проводиться при +65 °С для полной денатурации олиго(dT) зонда с поли(А)РНК.  
Элюцию можно не проводить. Частицы со связанной РНК можно прямо вносить в реакционную смесь для проведения синтеза первой цепи кДНК (или для проведения других видов анализа).

### Повторное использование частиц

После проведения процедуры экстракции мРНК, частицы могут быть отмыты для дальнейшего повторного использования.

Для этого суспендируйте частицы в 5-кратном объеме 0.1 М NaOH (по отношению к начальному объему, в котором были суспендированы отмываемые частицы). Инкубируйте частицы при комнатной температуре в течении 5 минут, поместите пробирку с частицами в магнитный штатив и удалите раствор.

Перенесите частицы в немагнитный штатив. Ресуспендируйте частицы в 5-кратном объеме TE (по отношению к начальному объему, в котором были суспендированы отмываемые частицы) и повторите процедуру промывки 3-5 раз.

Ресуспендируйте частицы в PBS, TE или воде с 0.02% NaN<sub>3</sub> и храните частицы при +4°C.

Частицы могут быть повторно использованы по меньшей мере 5 раз.

При повторном использовании помните о возможности влияния не вполне отмытого материала на ваши результаты!

## 6. Связанные продукты

- SileksMag-oligo(dT)<sub>30</sub>, магнитные частицы с олиго(dT)<sub>30</sub> нуклеотидным зондом, кат. номер K0190
- 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  
MagRack40, кат. номер EQMR040  
MagRack50ML, кат. номер EQMR50ML

## 6. Контактные данные

телефон: +7 495 737 4224

эл. почта: info@sileks.com