



## Набор для выделения РНК “YellowSolve”

### Примечание

---

- Набор рассчитан на 30 выделений РНК из 1-10 млн. клеток каждое или 60 выделений РНК из проб, содержащих менее 1 млн. клеток.
- РНК может быть экстрагирована из кусочков ткани (биоптатов), осадка или суспензии клеток, а также из биологических жидкостей. При работе с биологическими жидкостями, объем биопробы не должен превышать 10% от добавляемого объема лизирующего раствора **YellowSolve**.
- Выделение РНК можно проводить как при охлаждении так и при комнатной температуре.
- Для успешной работы не забудьте сделать следующее: внимательно прочитать инструкцию, прокалить стеклянную посуду при +160 °С в течение 4-6 ч; автоклавировать или прокипятить пластиковую посуду в дистиллированной воде; для растворения РНК использовать только свежеперегнанную или MilliQ воду. Кипячение не инактивирует РНазы, но смывает и удаляет их.
- Работать желательно в резиновых перчатках во избежание попадания РНаз кожи рук в препараты РНК и предохранения собственной кожи от контакта с компонентами набора.
- Храните набор при +4 °С. Набор можно хранить и при комнатной температуре, но в темноте.
- При попадании компонентов набора на кожу, хорошо промойте участок кожи водой.

### Протокол

---

1. Быстро гомогенизируйте ткань (гомогенизатор или вортекс) или осадок / суспензию клеток (1-10 млн.) в 1 мл лизирующего раствора **YellowSolve** до полного исчезновения комочков клеточного материала. При работе с биологическими жидкостями, объем пробы не должен превышать 10% от объема лизирующего раствора **YellowSolve** (т.е. не более 0.1 мл пробы на 1 мл **YellowSolve**).
2. Для удаления возможных примесей внеклеточного материала, полисахаридов и пр., центрифугируйте лизат при 10-15 тыс. об/мин. в течение 5 мин. Соберите прозрачный супернатант в чистую пробирку.
3. Добавьте к супернатанту 0.1 мл хлороформа, энергично перемешайте смесь на вортексе и оставьте на столе на 20 минут, встряхивая пробирку примерно каждые 5 минут. При стоянии содержимое пробирки должно расслоиться на две фазы. Если этого не произошло (что иногда имеет место при работе с тканями богатыми липидами), добавьте еще 0.1 мл хлороформа и повторите процедуру.
4. Центрифугируйте пробирку при 10-15 тыс. об./мин. в течение 5 мин. По окончании центрифугирования в пробирке образуются два слоя жидкости. Перенесите верхний содержащий РНК слой жидкости в чистую пробирку. Старайтесь не захватить белую белковую интерфазу, если таковая присутствует. Нижний, содержащий фенол слой жидкости вылейте в отходы.

5. К отобранному верхнему слою добавьте равный объем депротеинизирующего раствора **GreenClean** и энергично встряхивайте смесь на вортексе 2-3 минуты, после чего центрифугируйте, как описано в п.4.
6. Перенесите верхний слой жидкости в чистую пробирку. В случае, если наблюдается остаточная интерфаза (что иногда имеет место при работе с клетками головного мозга и почек), добавьте к отобранному верхнему слою жидкости равный объем хлороформа и энергично встряхивайте смесь 1-2 минуты, после чего центрифугируйте, как описано в п.4.
7. Отберите верхний, содержащий РНК, слой жидкости в чистую пробирку, замерьте его объем, добавьте к нему 2 объема **96%-ного этанола**, хорошо перемешайте содержимое пробирки. Поместите пробирку на -20 °С на 20-30 мин. для формирования осадка РНК.
8. Осадите РНК центрифугированием при 10-15 тыс. об./мин. в течение 10-20 мин. Отберите и отбросьте спиртовой супернатант. Осторожно, по стенке пробирки, добавьте к осадку РНК 0,5 мл **80%-ного этанола** и центрифугируйте при 10-15 тыс. об./мин. в течение 15 мин. Внимательно следите, чтобы в процессе промывки осадок РНК не был смыт со дна пробирки и утерян.
9. После удаления этанола, еще раз открутите (30 сек) пробирку с осадком РНК для полного удаления остатков спирта со стенок пробирки.
10. Растворите осадок РНК в воде (**теперь - все поцедуры при +4 °С, т.е. во льду!**), отберите аликвоту и определите концентрацию РНК спектрофотометрически. Оцените нативность РНК электрофорезом в 1.2-1.5%-ной агарозе, приготовленной на x1-ном TBE и содержащей 0.3 мкг/мл бромистого этидия.
11. Храните препарат РНК замороженным в воде при -20 °С или ниже, либо в виде спиртового осадка при -20 °С (что предпочтительнее в случае длительного хранения РНК).