

Набор для выделения РНК из растений DiamondDNA™

Назначение набора DiamondDNA™

Набор предназначен для выделения тотальной РНК из живых тканей (проростки, участки живых побегов или корней).

В отличие от широко используемых методов и наборов, основанных на токсичных веществах вроде фенола и хлороформа, набор DiamondDNA не содержит высокотоксичных веществ. Кроме того, набор позволяет выделять РНК из растительных объектов с высоким содержанием полисахаридов, которые, в случае использования методов на основе кислого фенола, выделяются вместе с нуклеиновыми кислотами и осложняют дальнейшую очистку, хранение и исследование.

Входящие в состав набора буферы позволяют выделять препараты РНК в высокой концентрации без примесей высокомолекулярной ДНК. Выделенная с помощью DiamondDNA РНК пригодна для дальнейших операций гибридизации, транскрипции и ПЦР.

Принцип выделения РНК с помощью DiamondDNA™

Методика выделения РНК из растений с помощью DiamondDNA включает в себя лизис тканей в лизирующем буфере, денатурацию протеинов, ДНК и РНКаз, осаждение и очистка препарата РНК.

Принципиальная простота и низкая продолжительность процесса выделения и очистки РНК достигается использованием селективного солевого буфера, являющегося продуктом разработки оборонных предприятий. При соблюдении протокола выделения обеспечивается высокая чистота препарата РНК (OD260/OD280 не менее 1,8) для последующего проведения обратной транскрипции.

Состав набора DiamondDNA™

1. Лизис-буфер.
2. Протеаза.
3. Денатурирующий буфер.
4. Осаждающий буфер.
5. Солевой буфер.
6. ТЕ-буфер.

В наборе не содержатся токсичные вещества и запрещенные к свободному обороту компоненты.

Необходимое оборудование

- Центрифуга для пробирок 1,5 мл ($\geq 10000g$).
- Дозаторы (от 1 до 1000 мкл).
- Морозильная камера (-16 -20°C).
- Встряхиватель для пробирок (Vortex)

Хранение и подготовка к работе набора DiamondDNAtm

При получении набора необходимо поместить фермент (протеазу) в морозильную камеру (-20°C) для более длительного хранения. Фермент находится в лиофилизированном виде и переносит транспортировку при комнатной температуре без заморозки. Перед использованием фермент необходимо растворить в бидистиллированной или деионизированной воде (1 мл на 1 пробирку). В дальнейшем хранить только замороженным.

Остальные компоненты набора необходимо хранить при комнатной температуре (в составе отсутствуют нестойкие соединения). Допускается выпадение осадка солей в буферных растворах при понижении температуры менее +15°C, при этом достаточно нагреть растворы до +60°C для полного восстановления их свойств. В состав набора не входит 70 % этанол, используемый для отмывки РНК от осаждающего буфера, поэтому его необходимо приготовить заранее.

Срок годности набора составляет не менее 6 месяцев.

Протокол выделения РНК из растений

До начала работы: Добавить 1 мл ТЕ-буфера в пробирку с Протеазой.
Размешать все буферы на Vortex.
Приготовить 70% этанол.

1. В пробирку типа Эппендорф (1,5 мл) добавить 150 мкл Лизис буфера и 10 мкл Протеазы, поместить примерно 25-50 мг живых растительных тканей. Тщательно измельчить с помощью пестика. Центрифугировать 1 мин. 10000 – 13000 об./мин. Супернатант (100 мкл) перенести в новую пробирку.

2. Добавить 300 мкл Денатурирующего буфера, встряхнуть на Vortex на средней скорости.

3. Центрифугировать 5 мин. при 10000 – 13000 об./мин., супернатант перенести в новую пробирку (300 мкл).

4. Добавить 300 мкл Осаждающего буфера. Встряхнуть на Vortex на средней скорости.

5. Центрифугировать 10 мин. при 10000 – 13000 об./мин., супернатант слить, пробирку промокнуть на салфетке.

6. Добавить 600 мкл 70% этанола (в состав набора не входит). Центрифугировать 1 мин при 13000 об./мин. Спирт тщательно удалить с помощью пипетки. Подсушить 1 мин. при комнатной температуре.

7. Добавить 100 мкл ТЕ-буфера, перемешать на Vortex или пипетированием для тщательного растворения осадка. Добавить 100 мкл Солевого буфера, перемешать на Vortex. Поместить в морозильную камеру (-16 -20°C) на 10 мин.

8. Центрифугировать 10 мин при 13000 об./мин. Буфер слить, остатки удалить пипеткой не затрагивая осадок.

9. Добавить 600 мкл 70% этанола (в состав набора не входит). Центрифугировать 1 мин при 13000 об./мин.

10. Спирт слить, остатки удалить пипеткой не затрагивая осадок. Осадок просушить (1 мин на воздухе, растворить в 25 – 50 мкл воды или ТЕ-буфера, встряхнуть на Vortex, или пипетированием).

Примечание. Не следует брать слишком много растительного материала. Работать в перчатках, маске и очках, чтобы избежать попадания РНКаз. Раствор ДНК не должен иметь окраски. Весь лабораторный пластик, включая пестики, должны быть обработаны от нуклеаз. Качество РНК проверить на электрофорезе. Сразу поставить реакцию обратной транскрипции в присутствии ингибитора РНКаз. В случае необходимости перед реакцией обратной транскрипции обработать препарат ДНКазой, или проводить реакцию с олиго-dT праймером (например, для исследования транскриптома). РНК хранить при -70 °С, или при -20°C в 70% этаноле (остановиться на стадии 9).