



Инструкция по применению реагента RiZol для выделения суммарной РНК из биологических образцов

Арт.3789.100 100 мл

Арт.3789.250 250 мл

*Реагент **RiZol** предназначен для применения в исследовательских целях. Не предназначен для in vitro диагностики.*

Информация о продукте:

Реагент **RiZol** представляет собой монофазный водный раствор, содержащий фенол и гуанидин-изотиоцианат, предназначенный для выделения высококачественной суммарной РНК из образцов человеческого, животного, растительного, дрожжевого, бактериального и вирусного происхождения.

Под действием реагента **RiZol** происходит гомогенизация биологического образца и лизис клеток, не нарушая целостность РНК за счет ингибирования действия РНКаз. Гомогенизированный раствор разделяется на водную и органическую фазы путем добавления хлороформа и центрифугирования. РНК остается исключительно в водной фазе. Выделенная РНК может быть использована для синтеза кДНК, ОТ-ПЦР, трансляции in vitro и др.

Форма выпуска: реагент **RiZol**, фасовка 60 мл или 250 мл.

Меры предосторожности:

1. Все операции с реагентом рекомендуется проводить в вытяжном шкафу.
2. При работе с реагентом **RiZol** используйте латексные или п/э перчатки, халат и средства для защиты глаз (очки).
3. В состав реагента включены фенол и гуанидин-изотиоцианат, являющиеся токсичными и раздражающими веществами, которые при попадании на кожу вызывают ожоги.
4. Избегайте попадания реагента на кожу или одежду. Не допускайте вдыхания паров.

В случае контакта: немедленно обработайте место контакта слабым раствором соды, промойте глаза или кожу большим количеством воды в течение как минимум 15 минут и при необходимости обратиться за медицинской помощью.

Необходимые материалы и оборудование:

- центрифуга с охлаждением и ускорением не менее 12000g;

- стерильные микроцентрифужные пробирки 1,5-2 мл;
- устройство для разрушения и гомогенизации тканей:
 - для замороженных тканей - жидкий азот, ступка с пестиком;
 - свежие или зафиксированные ткани можно измельчить скальпелем на фрагменты 0,3-0,5 см или использовать стеклянный гомогенизатор Даунса, шариковый гомогенизатор (бисерная мельница);
- раствор для лизиса эритроцитов;
- пробирки объемом не менее 10 мл;
- хлороформ;
- изопропанола;
- гликоген;
- 70% этанол;
- вода, обработанная диэтилпиروкарбонатом (ДЭПК) и предназначенная для экспериментов с использованием РНК.

Протокол:

Протокол включает следующие этапы:

1. Гомогенизация пробы - 1 мл реагента **RiZol** + 50-100 мг ткани, $5 - 10 \times 10^6$ клеток или выращенных на 10 см^2 в монослое клеток.
2. Разделение фаз – гомогенизированный раствор + 0,2 мл хлороформа.
3. Выделение РНК из водной фазы + 0,5 мл изопропанола + 1 мкл гликогена.
4. Очищение РНК – 70% этанол.
5. Элюция РНК – вода, обработанная ДЭПК.

1. ГОМОГЕНИЗАЦИЯ

Общие рекомендации:

- Гомогенизацию следует проводить при комнатной температуре.
- Объем образца не должен превышать 10% объема реагента **RiZol**, используемого для гомогенизации. Недостаточное количество добавленного реагента может привести к ухудшению качества РНК, а также возможно загрязнение геномной ДНК.

А. ТКАНЬ.

Гомогенизируйте образцы тканей в реагенте **RiZol** (1 мл / 50-100 мг ткани). Мягкие ткани гомогенизируются пипетированием, в случае нахождения в ткани нерастворимых частиц используйте стеклянный гомогенизатор Даунса или полипропиленовый пестик для пробирок.

Замороженные ткани измельчаются в порошок в ступке с добавлением жидкого азота во избежание оттаивания образца.

В. КЛЕТКИ.

1. Клетки, выращенные в монослое, должны быть лизированы непосредственно в культуральной чашке (чашка Петри, диаметр 35 мм). Отберите культуральную среду, добавьте 1 мл реагента реагента **RiZol** на 10 см² площади чашки и перемешайте лизат пипетированием.

2. Клетки, выращенные в суспензии, сначала должны осаждаться путем центрифугирования при 3000-5000g в течении 2 мин. После этого необходимо отобрать культуральную среду, а затем лизировать осадок в **реагенте RiZol** путем повторного пипетирования.

Используйте 1 мл **реагента RiZol** на 5 - 10 × 10⁶ клеток животных, растений или дрожжей или на 10⁷ бактериальных клеток. Для лучшего лизиса дрожжей и бактериальных клеток их инкубируют в течении 10 мин при температуре 50-55 °С, для гомогенизации используют бисерную мельницу.

С. Кровь в ЭДТА и клетки пунктата костного мозга в ЭДТА.

Для отмывки лейкоцитов, вам потребуется воспользоваться раствором для лизиса эритроцитов.

1. Для этого в отдельную пробирку объемом не менее 10 мл для каждого образца, добавьте 3,5 мл раствора для лизиса эритроцитов, после чего добавьте 1,25 мл для цельной цельной крови и 300 мкл. для костного мозга.

2. Перемешайте данную смесь на вортексе и инкубируйте при комнатной температуре в течении 5 минут.

3. После инкубации центрифугируйте пробы в течении 5 мин при 3000 об/мин.

4. Тщательно отберите надосадочную жидкость.

5. На дне должен образоваться лейкоцитарный осадок, к которому требуется добавить 1 мл реагента **RiZol** и тщательно перемешать данную смесь с помощью пипетирования.

6. Очень аккуратно перенесите полученный лизат в пробирку 1,5 мл типа эппендорф.

Примечание: Для корректной работы реагента RiZol не следует добавлять количество ядродержащих клеток менее 5×10⁶ и не более 15×10⁷, поскольку это может способствовать контаминации геномной ДНК. Для точного подсчета клеток рекомендуется использовать камеру Горяева или гематологические анализаторы в которых возможно осуществить подсчет клеток.

Избегайте промывания клеток перед добавлением реагента RiZol, так как это может способствовать деградации РНК. После гомогенизации инкубировать образец в течение 5 минут при комнатной температуре, чтобы обеспечить полную диссоциацию нуклеопротеидных комплексов.

2. РАЗДЕЛЕНИЕ ФАЗ

1) Добавьте 0,2 мл хлороформа к лизату.

- 2) Плотно закройте пробирку и активно перемешайте на вортексе содержимое в течение 30–60 секунд.
- 3) Полученную смесь инкубируйте при комнатной температуре в течение 15 минут.
- 4) Центрифугируйте смесь при 12000g в течение 15 минут при 4 °C. После центрифугирования смесь разделяется на фазы: нижнюю органическую фенольную фазу желтоватого цвета, межфазную белую и бесцветную верхнюю водную фазы. РНК остается исключительно в водной фазе, тогда как ДНК и белки находятся в межфазной и органической фазах. Объем водной фазы составляет около 50% от объема реагента **RiZol**, используемого для гомогенизации. Важно проводить центрифугирование для разделения фаз при температуре 4-10 °C. Если оно выполняется при повышенных температурах, некоторое количество ДНК может попасть в водную фазу.
- 5) Отберите водную фазу, держа пробирку под углом 45°, и переместите ее в новую пробирку.
Примечание: Постарайтесь максимально отобрать водную фазу, при этом не захватив среднюю и нижнюю фазы.

3. ВЫДЕЛЕНИЕ РНК

- 1) Осажденную РНК из водной фазы смешать с 0,5 мл изопропанола и 1 мкл гликогена в новом микроцентрифужной пробирке.
- 2) Инкубировать смесь при комнатной температуре в течение 10 минут и центрифугировать при 12000g в течении 10 минут при 4 °C. После чего на дне пробирки образуется гелеобразный или белый РНК-осадок (часто невидимый перед центрифугированием).
- 3) Аккуратно удалите супернатант, оставив РНК-осадок на дне пробирки.
- 4) По стенке пробирки добавьте 500 мкл 70% этанола.
- 5) Центрифугируйте образец в течении 5 мин на максимальной скорости при 4 °C.
- 6) Аккуратно удалите этанол, не задев РНК-осадок.
- 7) Повторить процедуры с 4 по 6 еще 1 раз.
- 8) Высушите осадок на воздухе в течение до 10 минут при комнатной температуре. Важно избегать полного высушивания РНК, поскольку это значительно уменьшит его растворимость. Не сушите РНК вакуумным центрифугированием.
- 9) Растворить РНК-осадок в 35 мкл воды, обработанной ДЭПК.
- 10) Заморозьте полученный образец РНК при -70 °C для хранения.

Примечание: После выделения, РНК следует проверить на качество с помощью гель-электрофореза.

Рекомендации по выделению РНК из небольших образцов:

1. Для облегчения выделения РНК из небольших образцов (<10⁶ клеток или <10 ткани) проодят гомогенизацию (или лизис) в 0,8 мл **реагента RiZol**. Затем добавьте хлороформ и продолжайте разделение фаз и другие этапы выделения, как описано выше.
2. После проведения гомогенизации (перед добавлением хлороформа) образцы можно хранить при -70 °С более двух лет.
3. Для клеток, выращенных в монослое, используйте количество **реагента RiZol** в зависимости от площади культуральной чашки, а не от количества клеток.

Использование недостаточного количества **реагента RiZol** может привести к загрязнению выделенной РНК примесями ДНК.

4. Используйте перчатки и держите пробирки закрытыми в течение всей процедуры для исключения загрязнения РНКазой.
5. Может потребоваться дополнительный этап выделения для образцов с высоким содержанием белков, жиров и полисахаридов в таких тканях как мышцы, жировая ткань и клубневые части растений. После гомогенизации удалите нерастворимый материал путем центрифугирования при 12000 g в течение 10 минут при 4 °С. Полученный осадок содержит внеклеточные мембраны, полисахариды и высокомолекулярную ДНК, в то время как супернатант содержит РНК. В образцах из жировой ткани избыток липидов локализуется в верхнем слое, который следует удалить. Перенесите прозрачный супернатант в новую пробирку и продолжайте разделение фаз и другие стадии выделения РНК, как описано выше.

Транспортировка: при комнатной температуре в темном месте.

Условия хранения: при комнатной температуре в темном месте, при 20 °С.

Срок хранения: при соблюдении условий хранения и транспортировки - 1 год.

ООО «Диаэм»

Москва

ул. Магаданская, д. 7, к. 3 ■ тел./факс: (495) 745-0508 ■ sales@dia-m.ru

www.dia-m.ru

С.-Петербург
+7 (812) 372-6040
spb@dia-m.ru

Новосибирск
+7 (383) 328-0048
nsk@dia-m.ru

Воронеж
+7 (473) 232-4412
vrn@dia-m.ru

Йошкар-Ола
+7 (927) 880-3676
nba@dia-m.ru

Красноярск
+7 (923) 303-0152
krsk@dia-m.ru

Казань
+7 (843) 210-2080
kazan@dia-m.ru

Ростов-на-Дону
+7 (863) 303-5500
rnd@dia-m.ru

Екатеринбург
+7 (912) 658-7606
ekb@dia-m.ru

Кемерово
+7 (923) 158-6753
kemerovo@dia-m.ru

Армения
+7 (094) 01-0173
armenia@dia-m.ru

