



**Набор реагентов для выделения РНК
методом сорбции на спин-колонках
«RNA Pro Q**

#RNAproQ -50

Инструкция по применению

1. Назначение

1.1. Полное название

Набор реагентов для выделения РНК методом сорбции на спин-колонках «RNA Pro Q».

1.2. Назначение

Набор реагентов «RNA Pro Q» Raissol™ предназначен для выделения РНК из 50 образцов животных и растительных тканей, культуры клеток млекопитающих, бактерий, дрожжей.

1.3. Область применения

Набор для выделения РНК «RNA Pro Q» может быть использован в научных лабораторных центрах и институтах, исследовательских лабораториях, для выделения РНК из животных и растительных тканей, культуры клеток млекопитающих, бактерий, дрожжей с целью последующих исследований с применением обратной транскрипции, ОТ-ПЦР, Нозерн блота, ферментативной подготовки библиотек к должно быть не менее, секвенирования и др.

1.4. Принцип действия

3-реагент полностью лизирует клетки образца, высвобождая РНК. Затем с помощью осаждающего буфера 1 и последующего центрифугирования происходит разделение лизата на три фазы: водную, интерфазу и органическую, при этом в верхней водной фазе находится РНК. Водную фазу переносят на спин-колонки с кремниевой мембраной, где РНК адсорбируется, после чего следует промывка и элюция РНК.

2. Характеристика набора

Компоненты набора являются одноразовыми. Набор реагентов «RNA Pro Q» не требует технического обслуживания и калибровки.

2.1. Состав набора

Набор материалов и реагентов «RNA Pro Q» рассчитан на 50 выделений.

№	Реагент/вспомогательный материал	Описание	#RNAproQ-50	
			Объем, мл	Кол-во, шт.
1	3-реагент	Прозрачная бесцветная жидкость без посторонних примесей и включений с характерным запахом фенола	30	1
2	Осаждающий буфер	Прозрачная бесцветная жидкость без посторонних примесей и включений, без запаха	5	1
3	Связывающий буфер	Прозрачная бесцветная жидкость без посторонних примесей и включений, с резким запахом	12,5	1
4	Промывочный буфер	Прозрачная бесцветная жидкость без посторонних примесей и включений, с резким запахом	70	1
5	Элюирующий буфер	Прозрачная бесцветная жидкость без посторонних примесей и включений, без запаха	5	1
7	Спин-колонки с собирательными пробирками	Собирательная пробирка объемом 2 мл без крышки, сорбционная колонка с кремнеземной мембраной емкостью до 200 мкг РНК		50

3. Меры предосторожности при работе с набором

Работу проводят в соответствии с МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Потенциальный риск применения набора – класс 2а. Необходимо одновременное обеспечение и соблюдение персоналом правил биологической безопасности и требований к организации и проведению данных работ с целью предотвращения контаминации нуклеиновыми кислотами исследуемых проб, помещений и оборудования.

3.1. Необходимость обучения персонала

Для работы с данным набором реагентов необходимо участие специалиста с высшим/средним медицинским или биологическим образованием. Персонал должен иметь навыки работы с биохимическими реактивами и современным лабораторным оборудованием.

3.2. Меры безопасности, позволяющие предохранять оператора

3-реагент содержит фенол (токсичное и раздражающее вещество), промывочный буфер содержит легковоспламеняющиеся жидкости. Работа с набором реагентов должна проводиться с использованием приточно-вытяжной вентиляции, вдали от огня и источников искрообразования, электрооборудование и освещение должно быть взрывобезопасно.

При работе с набором следует соблюдать следующие меры предосторожности:

- пользоваться лабораторными перчатками, лабораторными халатами, защитными очками, при необходимости, респираторами для защиты дыхательных путей;
- не принимать пищу, пить или курить в лабораторных помещениях;
- после работы с пробами и реактивами следует тщательно вымыть руки водой с мылом.

Избегать контакта компонентов набора с кожей, глазами, слизистыми оболочками и одеждой. При попадании промыть большим количеством воды в течение нескольких минут. При приеме внутрь немедленно обратиться за медицинской помощью.

4. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором

4.1. Указания о необходимости использования специального оборудования

Работу с набором следует проводить в боксе для стерильных работ с приточно-вытяжной вентиляцией, установленном в рабочей зоне 2 (МУ 1.3.2569-09).

4.2. Дозирующие устройства

Набор автоматических дозаторов переменного объема на 20-200 мкл и 100-1000 мкл.

4.3. Другое используемое оборудование

- Вортекс (например, Biosan Microspin FV-2400);
- скоростная центрифуга для пробирок объемом 1,5-2 мл до 13 тыс. об/мин с возможностью поддержания температуры +4°C (например, Eppendorf 5424 R);
- штатив для микроцентрифужных пробирок объемом 1,5-2 мл;
- штатив для дозаторов переменного объема;
- морозильная камера -20°C (для хранения образцов).

4.4. Лабораторная посуда

Емкости для сброса наконечников и пробирок.

4.5. Материалы и реагенты, не входящие в состав набора

- Микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 или 2 мл;
- одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 1000 мкл;
- одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл;
- одноразовые медицинские халаты и одноразовые медицинские перчатки;
- защитные очки;
- комплект средств для обработки рабочего места.

5. Анализируемые пробы

5.1. Предварительная подготовка биологического материала

5.1.1. Ткани животных

При наличии консервирующих реагентов в пробирке с образцом необходимо центрифугировать пробирку при максимальных оборотах с последующим удалением супернатанта. Далее внести физиологический раствор в объеме 50% от номинального объема пробирки, перемешать образец и центрифугировать при максимальных оборотах с последующим удалением супернатанта.

При наличии физиологического раствора в пробирке с образцом необходимо центрифугировать пробирку при максимальных оборотах с последующим удалением супернатанта.

При необходимости отрезать фрагмент ткани массой 10-100 мг с помощью пинцета и скальпеля.

5.1.2. Растительные ткани

Необходимо измельчить растительную ткань в мелкий порошок в ступке с помощью пестика в присутствии жидкого азота. Затем быстро перенести 10-100 мг измельченной ткани в пробирку объемом 1,5-2 мл.

5.1.3. Суспензия клеток (млекопитающих, растений, бактерий или дрожжей)

Центрифугировать суспензию клеток в течение 2 минут при 3-5 тыс. об/мин. Удалить супернатант.

6. Проведение процедуры выделения РНК

6.1. Лизис

1. В пробирки объемом 1,5-2 мл поместить 10-100 мг образца и добавить 600 мкл 3-реагента. При использовании жидких образцов объем 3-реагента должен превышать объем образца в 10 раз (60 мкл образца – 600 мкл 3-реагента).
2. Интенсивно перемешать пробирки на вортексе. Инкубировать при комнатной температуре в течение 10 минут, периодически встряхивая. Сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
3. Центрифугировать пробирки при +4°C в течение 10 минут при 13 тыс. об/мин.
4. Аккуратно, не задевая осадок, перенести супернатант в новые пробирки объемом 1,5-2 мл.

6.2. Экстракция и сорбция РНК

1. Добавить в пробирки 100 мкл осаждающего буфера, интенсивно перемешивать пробирки на вортексе в течение 15-30 сек.
2. Центрифугировать пробирки при +4°C в течение 10 минут при 13 тыс. об/мин.

3. Аккуратно, не задевая интерфазу, перенести 250 мкл верхней водной фазы в новые пробирки объемом 1,5-2 мл.
4. Добавить 250 мкл связывающего буфера и перемешать пробирки с помощью многократного переворачивания.
5. Перенести весь объем смеси в спин-колодку.
6. Центрифугировать пробирки в течение 1 минуты при 10-13 тыс. об/мин. Удалить фильтрат из собирательных пробирок.

6.3. Промывка РНК

1. Добавить в пробирки 700 мкл промывочного буфера.
2. Центрифугировать пробирки в течение 1 минуты при 10-13 тыс. об/мин. Удалить фильтрат из собирательных пробирок.
3. Повторить пункты 1, 2.
4. Вернуть колонки в собирательные пробирки. Центрифугировать пробирки в течение 1 минуты при макс. об/мин.

6.4. Элюция РНК

1. Перенести спин-колонки в новые пробирки объемом 1,5-2 мл. Собирательные пробирки утилизировать.
2. Добавить на центр мембраны спин-колонок 30-100 мкл элюирующего буфера. Инкубировать при комнатной температуре в течение 3-5 минут.

Рекомендация: для предотвращения деградации РНК внести ингибитор РНКаз.

3. Центрифугировать пробирки при +4°C в течение 1 минуты при 13 тыс. об/мин.
4. Утилизировать спин-колонки.

6.5. Условия хранения выделенных образцов РНК

Полученные растворы РНК готовы к применению, все дальнейшие манипуляции следует проводить при +4°C.

Перед хранением рекомендуется разделить растворы РНК на аликвоты, которые необходимо хранить при температуре -20°C и ниже не более 1 года. Для предотвращения деградации РНК рекомендуется добавлять ингибитор РНКаз и/или хранить образцы при температуре -72°C.

6.6. Показатели выделенных образцов РНК

По соотношению показателей поглощения A260/A280 чистота полученного раствора РНК соответствуют $\geq 1,9$.

6.7 Возможные трудности при выделении РНК

Проблема	Возможная причина	Описание решения
Неполное разделение фаз после центрифугирования	Плохо перемешанный лизат после добавления осаждающего буфера. Центрифугирование после добавления осаждающего буфера проводилось при неправильной температуре.	После добавления осаждающего буфера необходимо интенсивно перемешивать раствор на вортексе в течение 15-30 секунд. Убедитесь, что центрифугирование после добавления осаждающего буфера проводилось при 4°C.
Примеси геномной ДНК	При отборе водной фазы была захвачена часть интерфазы	Проводить отбор водной фазы более тщательно
Низкий выход РНК	Недостаточное количество исследуемого материала. Растительная ткань недостаточно гомогенизирована. Несоблюдение температурного режима во время центрифугирований.	Увеличить количество исследуемого материала. Повторить этап пробоподготовки, измельчив образец до мелкодисперсного состояния. Убедитесь, что все температурные режимы соблюдены.

7. Условия хранения, транспортировки и эксплуатации

7.1. Условия хранения

Буферы набора «RNA Pro Q» могут храниться при температуре от +4°C до +25°C в течение 12 месяцев с даты выпуска изготовителя. В случае наличия осадка при минимальных температурах хранения, растворы следует нагреть до комнатной температуры.

7.2. Условия транспортировки

Транспортировка **буферов** набора «RNA Pro Q» может производиться крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным) при температуре от +4°C до +25°C.

7.3. Информация по безопасной утилизации

Использованные пробирки, наконечники, перчатки, ветошь для обработки поверхностей в ШББ собирают в пластиковые закрывающиеся емкости, выносят в специально предназначенное вспомогательное помещение (МУ 1.3.2569-09) с целью последующей инактивации согласно требованиям СанПиН 2.1.7.2790-10. Наборы с истекшим сроком годности, а также в случае повреждения упаковки, утилизируют по классу Г, как токсикологически опасные отходы 1-4 классов опасности (СанПиН 2.1.7.2790-10).

7.4. Гарантийные обязательства производителя

Предприятие-производитель гарантирует соответствие функциональных характеристик набора требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение установленного срока годности (12 месяцев) при соблюдении всех условий транспортировки, хранения и применения.

Рекламации на качество набора реагентов направлять на предприятие-изготовитель ООО «Сесана» (107014, г. Москва, ул. Короленко, 8, email: sales@sesana.ru).

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и лабораторных работников при применении набора реагентов, рекомендуется направить сообщение на предприятие-изготовитель ООО «Сесана» по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулируемую организацию в соответствии с действующим законодательством.