

Инструкция по применению

Транспортировка: при комнатной температуре

Хранение: при комнатной температуре в темном месте, при 20°C

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

НАЗНАЧЕНИЕ. TriZ Reagent 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 TriZ Reagent 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.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Все операции с реагентом проводятся в вытяжном шкафу.
2. При работе с TriZ Reagent 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.

СОСТАВ НАБОРА

- TriZ Reagent – 60 мл. или 250 мл.

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 (например: Erythrocyte lysis solution, IG-HL-250)
- Пробирки объемом не менее 10 мл.
- Chloroform.
- Isopropanol.
- Glycogen.
- 70% Ethanol.
- Nuclease – Free water.

ПРОТОКОЛ

Протокол включает следующие этапы:

- Гомогенизация пробы - 1 мл TriZ Reagent + 50 - 100 мг ткани, 5 - 10 x 10⁶ клеток или выращенных на 10 см² в монослое клеток.
- Разделение фаз – гомогенизированный раствор + 0,2 мл Chloroform.
- Выделение РНК из водной фазы + 0,5 мл Isopropanol +1 мкл. Glycogen.
- Очищение РНК – 70% Ethanol
- Элюция РНК – Nuclease – Free water

1. ГОМОГЕНИЗАЦИЯ

Общие рекомендации:

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

A. ТКАНЬ.

Гомогенизируйте образцы тканей в реагенте TriZ Reagent (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.

B. КЛЕТКИ.

1. Клетки, выращенные в монослое, должны быть лизированы непосредственно в культуральной чашке (чашка Петри, диаметр 35 мм). Отберите культуральную среду, добавьте 1 мл TriZ Reagent 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 TriZ Reagent путем повторного пипетирования.

Реагент предназначен только для исследовательских целей, не для *in vitro* диагностики

Используйте 1 мл. TriZ Reagent на $5 - 10 \times 10^6$ клеток животных, растений или дрожжей или на 10^7 бактериальных клеток. Для лучшего лизиса дрожжей и бактериальных клеток их инкубируют в течении 10 мин при температуре 50-55°C, 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 TriZ Reagent и тщательно перемешать данную смесь с помощью пипетирования.
6. Очень аккуратно перенесите полученный лизат в пробирку 1,5 мл типа эппендорф.

Примечание: Для адекватной работы TriZ Reagent не следует добавлять количество ядродержащих клеток менее 5×10^6 и не более 15×10^7 , 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 TriZ Reagent, 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 Chloroform 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 °С. После центрифугирования смесь разделяется на: 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 TriZ Reagent, используемого для гомогенизации. Важно проводить центрифугирование для разделения фаз при температуре 4-10 °С. 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. Isopropanol и 1 мкл. Glycogen в новом эппендорфе
- 2) Инкубировать смесь при комнатной температуре в течение 10 минут и центрифугировать при 12000g в течении 10 минут при 4 °С. 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% Ethanol.
- 5) Центрифугируйте образец в течении 5 мин на максимальной скорости при 4 °С.
- 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 полной сушки РНК, поскольку это значительно уменьшит его растворимость. Не сушите РНК вакуумным центрифугированием.
- 9) Растворите РНК-осадок в 35 мкл Nuclease – Free water
- 10) Заморозьте образец (-70°C) для хранения

Примечание: После выделения РНК следует проверить на качество с помощью гельэлектрофореза.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ВЫДЕЛЕНИЮ РНК

1. Для облегчения выделения РНК из небольших образцов (<10⁶ клеток или <10 мг ткани) проводят гомогенизацию (или лизис) в 0,8 мл TriZ Reagent. Затем добавьте хлороформ и продолжайте разделение фаз и другие этапы изоляции, как описано выше.
 2. После гомогенизации (перед добавлением хлороформа) образцы можно хранить при -70 °С более двух лет.
 3. Для клеток, выращенных в монослое, используйте количество TriZ Reagent в зависимости от площади культуральной чашки, а не от количества клеток.
- Использование недостаточного количества TriZ Reagent может привести к загрязнению ДНК изолированной РНК.
4. Используйте перчатки и держите пробирки закрытыми в течение всей процедуры для исключения загрязнения РНКазой.
 5. Может потребоваться дополнительная ступень изоляции 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.

Производитель: ООО «Иноген»

197376, Санкт-Петербург, наб. реки Карповки, дом 5
тел. (812) 921-70-15
e-mail: info@inogene.ru
www.inogene.ru

Реагент предназначен только для исследовательских целей, не для in vitro диагностики