

Реактив «Трио» для выделения РНК.

Описание.

Реактив представляет собой однофазный раствор фенола и тиоцианата гуанидина с буферными компонентами и добавками. Реактив предназначен для выделения РНК методом кислой фенол-хлороформной экстракции с гуанидинтиоцианатом. Рассчитан на 25, 100, 500, 1000 выделений.

Принцип метода.

Раствор, используемый для выделения РНК, основан на методике (Chomczynski P, Sacchi, 1987) с дополнениями. Гуанидин тиоцианат-фенол-хлороформная экстракция представляет собой один из наиболее универсальных методов выделения РНК, позволяющий работать с огромным спектром различных образцов, включая ткани растений, животных, мицелий и плодовые тела грибов, бактериальные культуры, образцы сложного состава. В ходе обработки ткани раствором реактив «Трио» одновременно стабилизирует РНК и разрушает клеточные структуры.

Для работы дополнительно требуются следующие расходные материалы:

1. Хлороформ (0,2мл на одно выделение)
2. Спирт изопропиловый безводный (до 800мкл на одно выделение)
3. Спирт этиловый 75% (800мкл на одно выделение)
4. Пробирки на 2мл (2 или 3 шт. на одно выделение)

Протокол для применения.

1. Добавить к образцу 1 мл реактива. Объем жидкого образца не должен превышать 100 мкл.
2. Гомогенизировать образец и выдержать 5 мин при комнатной температуре. При большом количестве твердых нерастворимых примесей центрифугировать смесь (5 минут 8-10 тысяч об./мин., при комнатной температуре), супернатант перенести в новые пробирки.
3. Добавить 200 мкл хлороформа и тщательно перемешать.
4. Выдержать 8 мин при комнатной температуре с периодическим перемешиванием смеси (можно пользоваться ротационным перемешивателем).
5. Центрифугировать смесь (10 минут, 8-10 тысяч об/мин, при комнатной температуре). При центрифугировании смесь расслаивается на две фазы. РНК содержится в верхней водной фазе.
6. Осторожно перенести верхнюю РНК-содержащую фазу в новую пробирку. Не допускать встряхивания пробирки и захвата интерфазы, если это произошло – повторить центрифугирование.
7. Добавить к верхней фазе 1 объем изопропилового спирта, тщательно смешать.
8. Центрифугировать (15 минут, 10 тысяч об./мин., при комнатной температуре), супернатант слить (осторожно, осадок может отделиться от стенки!)
9. Дважды промыть осадок 75% этанолом. В случае отстаивания осадка от стенки микропробирки, собрать осадок центрифугированием (10 минут, 8-10 тысяч об/мин, при комнатной температуре).

10. Высушить осадок и растворить в требуемом объеме воды (от 30 до 150 мкл воды).
При высушивании не допускать пересушивания (не сушить с нагревом, не использовать сушку в вакууме и т.п.)

Техника безопасности.

Осторожно! Реактив содержит фенол, гуанидинтиоцианат. Работы с реактивом производить только в вытяжном шкафу, работать в перчатках. Не допускать попадания на кожу, при попадании реактива на кожу промыть кожу большим количеством воды.
Только для исследовательских целей.

Условия хранения

Хранить в темном месте при +4°C.

Библиография.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem. 1987 Apr;162(1):156-9.