



## **FBio-Tri-Реагент**

для выделения РНК из  
биологического материала

(НК-5, 100 мл)



## Содержание

Описание .....	4
Ограничения на использование продукта.....	4
Гарантия .....	4
Меры предосторожности .....	5
Принцип действия .....	5
Необходимое оборудование и материалы .....	6
Важные замечания.....	7
Подготовка пробы .....	7
Выделение РНК .....	9
Выделение ДНК.....	10
Выделение белков .....	11
Проблемы и рекомендации.....	13
Контроль качества .....	16
Условия и срок хранения .....	17
Служба технической поддержки .....	17
Информация для заказов.....	17
Паспорт безопасности вещества .....	18

## **Описание**

FBio-Tri-Реагент предназначен для выделения тотальной РНК из тканей и клеток животных, растений, бактерий, дрожжей, а так же вирусных частиц, менее чем за 1 час. FBio-Tri-Реагент может также быть использован для одновременного выделения РНК, ДНК и белков из различных проб. Выделение можно проводить как из малых (50-100 мг ткани,  $5-10 \times 10^6$  клеток), так и из больших количеств материала ( $\geq 1$  г ткани,  $>10 \times 10^7$  клеток). После выделения РНК может сразу быть использована для анализа Northern blot, трансляции *in vitro*, молекулярного клонирования, ПЦР. Для получения лучших результатов при постановке ПЦР, после выделения РНК необходимо провести обработку ДНКазой.

## **Ограничения на использование продукта**

FBio-Tri-Реагент разработан и продается исключительно в научных целях. Набор не может быть использован в медицинских или в лечебных целях.

## **Гарантия**

Фрактал Био гарантирует изготовление всех продуктов согласно описанию в руководстве. Покупатель должен определить соответствие продукта для конкретного его использования. Если продукт не дает заявленного результата по любой причине, за исключением неправильного использования, мы бесплатно произведем замену продукта или вернем покупателю его полную

стоимость. Мы сохраняем за собой право изменять или модифицировать любой продукт в целях улучшения его качеств и дизайна. Если у Вас возникли вопросы по применению продукта или оценке результата, Вы можете обращаться в Службу технической поддержки (см. на обороте).

## **Меры предосторожности**

При работе с FBio-Tri-Реагентом необходимо соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противозидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981).

FBio-Tri-Реагент содержит ядовитое вещество (фенол) и раздражитель (гуанидин тиоционат). Контакт FBio-Tri-Реагента с кожей может вызывать ожоги. Необходимо соблюдать осторожность и быть внимательным при обращении с данным реагентом. При работе с FBio-Tri-Реагентом всегда используйте верхнюю лабораторную одежду, одноразовые перчатки и защитные очки. Полную информацию о рисках и предостережениях можно найти в паспорте безопасности вещества.

## **Принцип действия**

FBio-Tri-Реагент состоит из монофазного раствора фенола и гуанидин тиоционата. При гомогенизации или лизисе пробы, FBio-Tri-Реагент сохраняет целостность РНК,

разрушая клетки и клеточные компоненты. После добавления хлороформа и центрифугирования, смесь разделяется на 3 фазы: водная фаза содержит РНК, интерфаза содержит ДНК, органическая фаза содержит белок. После разделения фаз каждый компонент может быть отдельно выделен.

После переноса водной фазы, РНК извлекается осаждением изопропанолом. После удаления водной фазы, последовательными осаждениями извлекаются ДНК и белки. Осаждение этанолом позволяет выделить ДНК из интерфазы, добавочное осаждение изопропанолом позволяет выделить белки из органической фазы.

## **Необходимое оборудование и материалы**

- Микроцентрифуга с охлаждением
- Этанол (96%)
- Этанол (75%)
- Хлороформ
- Изопропанол
- Раствор 0,1 М цитрата натрия в 10% этаноле (выделение ДНК)
- Раствор 0,3 М гуанидин гидрохлорида в 96% этаноле (выделение белков)
- Пластиковые микропробирки объёмом 1.5 мл
- Дистиллированная вода (при необходимости)
- Одноразовые перчатки и халат

## Важные замечания

Прочтите внимательно данный раздел до начала выполнения работ.

- Центрифугирование в каждом шаге выделения осуществляется в микроцентрифуге при температуре 2-4 °С.
- При работе с РНК и ДНК необходимо использовать только одноразовые пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку “RNase-free”, “DNase-free”.
- Для приготовления смесей и добавления нуклеиновых кислот используйте только наконечники с фильтрами.
- Работать только в одноразовых перчатках.
- Всё лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы, должны быть строго стационарным.
- Выделение РНК и ДНК необходимо проводить в ламинарном боксе.
- Рекомендуется проводить **отрицательный контроль** – выделение из воды, и использовать его при последующей проверке выделения.

## Подготовка пробы

1. Гомогенизируйте пробу

**Ткань:** гомогенизируйте пробу ткани в FBio-Tri-Реагенте (из расчёта 1 мл FBio-Tri-Реагента на 50-100 мг ткани). Объём ткани не должен превышать 10% от объёма FBio-Tri-Реагента.

**Монослой клеток:** лизируйте клетки непосредственно в чашке, в которой росли клетки. Используйте 1 мл FBio-Tri-Реагента на каждые 10 см<sup>2</sup> поверхности чашки. Суспендируйте клетки.

**Важно!** FBio-Tri-Реагент не совместим с пластиковыми чашками. Используйте только стеклянные чашки.

**Суспензия клеток:** осадите клетки центрифугированием и добавьте к клеткам FBio-Tri-Реагент (из расчёта 1 мл FBio-Tri-Реагент на 5-10 x 10<sup>6</sup> клеток животных, растений, дрожжей или 10<sup>7</sup> клеток бактерий). Ресуспендируйте клетки.

**Кровь:** к 150 мкл крови добавьте 850 мкл FBio-Tri Реагента. Тщательно перемешайте.

2. Инкубируйте гомогенизированную пробу 5 минут при комнатной температуре.

**Важно!** Если в образцах высокое содержание жиров, белков, полисахаридов или внеклеточного материала, то необходимо провести дополнительный этап. После инкубации, центрифугируйте образцы 10 минут при 12.000 x g. Перенесите супернатант в чистую микропробирку и переходите к пункту 3.

3. Добавьте хлороформ из расчёта 200 мкл хлороформа на каждый миллилитр FBio-Tri-Реагент добавленного в пункте 1. Тщательно перемешайте.

**Важно!** Хлороформ не должен содержать изоамилового спирта или других добавок.



4. Инкубируйте смесь 5-15 минут при комнатной температуре.
5. Центрифугируйте смесь 15 минут 12.000 x g. После центрифугирования смесь будет разбита на три фазы: нижняя органическая фаза (содержит белки), средняя интерфаза (содержит ДНК) и верхняя водная фаза (содержит РНК).

## **Выделение РНК**

1. Перенесите водную фазу в чистую микропробирку. Интерфазу и органическую фазу храните в холоде для последующего выделения ДНК и белков.
2. Добавьте изопропанол из расчёта 500 мкл изопропанола на каждый миллилитр FBio-Tri-Реагента добавленного в пункте 1 Подготовка пробы. Тщательно перемешайте.
3. Инкубируйте смесь 10 минут при комнатной температуре.
4. Центрифугируйте смесь 10 минут при 12.000 x g.
5. Удалите супернатант. К осадку добавьте 75% этанол из расчёта 1 мл этанола на каждый миллилитр FBio-Tri-Реагента добавленного в пункте 1 Подготовка пробы. Тщательно перемешайте.
6. Центрифугируйте смесь 5 минут при 7.500 x g.

7. Удалите супернатант. Осадок РНК подсушите – оставьте на 5-10 минут микропробирку открытой на воздухе или под вакуумом. Не следует высушивать РНК полностью, так как это существенно снизит её растворимость. Так же не следует использовать для просушки центрифугирование под вакуумом (Speed-Vac).

8. Добавьте к осадку РНК необходимое количество воды. Для лучшего растворения рекомендуется оставить микропробирку на 10-15 минут при 55-60 °С.

## **Выделение ДНК**

1. В микропробирку с интерфазой и органической фазой добавьте 96% этанол из расчёта 300 мкл этанола на каждый миллилитр FBio-Tri-Реагента добавленного в пункте 1 Подготовка пробы. Тщательно перемешайте.

2. Инкубируйте смесь 2-3 минуты при комнатной температуре.

3. Центрифугируйте смесь 5 минут при 2.000 x g.

4. Перенесите супернатант в чистую микропробирку. Храните в холоде для последующего выделения белков.

5. Добавьте к осадку раствор 0,1 М цитрата натрия в 10% этаноле из расчёта 1 мл раствора на каждый миллилитр FBio-Tri-Реагента добавленного в пункте 1 Подготовка пробы.

6. Инкубируйте смесь не менее 30 минут при комнатной температуре, периодически перемешивая.
7. Центрифугируйте смесь 5 минут при 2.000 x g.
8. Удалите супернатант и повторите пункты 5, 6, 7.
9. Добавьте к осадку 75% этанол из расчёта 1.5-2 мл этанола на каждый миллилитр FBio-Tri-Реагента добавленного в пункте 1 Подготовка пробы. Ресуспендируйте осадок.
10. Инкубируйте смесь 10-20 минут при комнатной температуре.
11. Центрифугируйте смесь 5 минут при 2.000 x g.
12. Удалите супернатант. Осадок растворите в необходимом количестве воды или TE буфера.

## **Выделение белков**

1. К супернатанту из пункта 4. Выделение ДНК добавьте изопропанол из расчёта 1,5 мл изопропанола на каждый миллилитр FBio-Tri-Реагента добавленного в пункте 1 Подготовка пробы. Тщательно перемешайте.
2. Инкубируйте смесь 10 минут при комнатной температуре.
3. Центрифугируйте смесь 10 минут при 12.000 x g.

4. Удалите супернатант. К осадку добавьте раствор 0.3 М гуанидин гидрохлорида в 96% этаноле из расчёта 2 мл раствора на каждый миллилитр FBio-Tri-Реагента добавленного в пункте 1 Подготовка пробы.
5. Инкубируйте смесь 20 минут при комнатной температуре.
6. Центрифугируйте смесь 5 минут при 7.500 x g.
7. Удалите супернатант и повторите пункты 4, 5, 6 ещё 2 раза.
8. Добавьте к осадку 2 мл 96% этанола и инкубируйте смесь 20 минут при комнатной температуре.
9. Центрифугируйте смесь 5 минут при 7.500 x g.
10. Удалите супернатант. Осадок подсушите 5-10 минут под вакуумом.
11. Добавьте к осадку необходимое количество воды.

## Проблемы и рекомендации

Проблема	Возможная причина	Решение
<b>1.Выделение РНК</b>		
А. Малое количество выделяемой РНК	Неполная гомогенизация или лизис проб.	Увеличьте объём FBio-Tri-Реагента в 1,5 раза и время инкубации.
	Конечный осадок РНК растворен не полностью.	Прогрейте пробу 10-15 минут при 55-60 °С, затем тщательно ресуспендируйте
В. $A_{260}/A_{280} < 1,65$	Количество пробы слишком мало	Увеличьте объём пробы
	Не была проведена инкубация пробы 5 минут при комнатной температуре после гомогенизации	Убедитесь, что инкубация была проведена. При необходимости увеличьте время инкубации.
	Присутствует контаминация водной фазы фенольной фазой.	При переносе водной фазы, следите, чтобы наконечник пипетки не касался фенольной фазы.

	Конечный осадок РНК растворен не полностью.	Прогрейте пробу 10-15 минут при 55-60 °С, затем тщательно ресуспендируйте
С.Присутствует деградация РНК	Ткани/клетки не были сразу использованы или не были заморожены после взятия образцов.	Следите, чтобы ткани/клетки хранились при -70 °С и использовались сразу после разморозки.
	Образцы хранились при -20 °С	Образцы должны храниться при -70 °С
	Используемые жидкие растворы или микропробирки не были RNase-free	Весь используемый пластик должен иметь маркировку RNase-free. Соблюдайте технику по предотвращению контаминации
D. Присутствует ДНК контаминация	Объём FBio-Tri-Реагента используемого для гомогенизации, слишком мал	Увеличьте объём FBio-Tri-Реагента в 1,5 раза.

	Образцы содержали органические растворители, сильные буферы или щелочные растворы	Проведите повторное выделение с полученным раствором РНК.
<b>2. Выделение ДНК</b>		
А. Малое количество выделяемой ДНК	Неполная гомогенизация или лизис проб.	Увеличьте объём FBio-Tri-Реагента в 1,5 раза и время инкубации.
	Конечный осадок ДНК растворен не полностью.	Прогрейте пробу 10-15 минут при 55-60 °С, затем тщательно просуспенсируйте
В. $A_{260}/A_{280} < 1,70$	Не полностью удалён фенол	Проведите добавочный этап промывки цитратом натрия.
С. Присутствует РНК контаминация	Водная фаза осталась на интерфазе	Перед началом выделения ДНК убедитесь, что водная фаза полностью удалена.

	Осадок ДНК не был хорошо промыт раствором 0.1 М цитрата натрия в 10% этаноле.	Проведите добавочный этап промывки цитратом натрия.
<b>3. Выделение белков</b>		
А. Малое количество выделяемых белков	Неполная гомогенизация или лизис проб.	Увеличьте объём FBio-Tri-Реагента в 1,5 раза и время инкубации.
	Конечный осадок растворен не полностью.	Прогрейте пробу 10-15 минут при 55-60 °С, затем тщательно ресуспендируйте
С. Присутствует деградация белков	Ткани/клетки не были сразу использованы или не были заморожены после взятия образцов.	Следите, чтобы ткани/клетки хранились при -70 °С и использовались сразу после разморозки.

## Контроль качества

Набор тестируется выделением РНК, ДНК и белков из биологической жидкости в соответствии с протоколами, описанными выше.



## **Хранение и стабильность**

FBio-Tri-Реагент может храниться до 12 месяцев без изменения качественных характеристик при температуре 2-8 °С.

## **Служба технической поддержки**

В случае появления вопросов обращайтесь в службу технической поддержки: [technic@fractalbio.com](mailto:technic@fractalbio.com).

## **Информация для заказов**

Наименование	Кат.номер
FBio-Tri-Реагент, 100 мл	НК-5

Произведено: ООО “Фрактал Био”, 190020, г. Санкт-Петербург, ул. Бумажная, д. 17

сайт: [fractalbio.com](http://fractalbio.com)

E-mail: [info@fractalbio.com](mailto:info@fractalbio.com)

Контактный телефон/факс: (812) 495-96-95

## Паспорт безопасности вещества

### Символы факторов риска:



Сигнальное слово: **ОПАСНО!**

### Характеристика опасности:

**H301** – Токсично при проглатывании

**H311** – Токсично при контакте с кожей

**H314** – Вызывает серьезные ожоги кожи и повреждения глаз

**H330** – Опасен при вдыхании

**H341** – Предположительно вызывает генетические дефекты

**H373** – Может наносить вред органам в результате длительного или многократного воздействия

**H412** – Вредно для водных организмов с долгосрочными последствиями

### Предупреждения:

Предотвращение

**P260** – Избегать вдыхания пыли

**P273** - Избегать попадания в окружающую среду.

**P280** – Использовать защитные перчатки / защитную одежду / средства защиты глаз / лица.

**P284** – Использовать защиту органов дыхания

Реагирование

**P301+P310** – При проглатывании: немедленно обратиться в токсикологический центр или доктору/терапевту.

**P305+P351+P338** – При попадании в глаза: Осторожно промыть глаза водой. Снять контактные линзы, если вы пользуетесь ими и это легко сделать. Продолжить промывание глаз.

**Дополнительная маркировка:** При контакте с кислотами образуется очень токсичный газ.

**Код опасности:** T – токсично

**Факторы риска (R):**

**23/24/25** – Токсично при вдыхании, при контакте с кожей, при проглатывании

**32** – При контакте с кислотами образуется очень токсичный газ

**34** – Вызывает ожоги

**48/21/22/23** – Причиняет серьезный ущерб здоровью при продолжительном вдыхании, контакте с кожей, проглатывании.

**52/53** – Вредно для водных организмов, может вызывать долгосрочное опасное воздействие на водную среду.

**68** – Возможный риск необратимых последствий.

**Меры безопасности (S):**

**26** – В случае попадая в глаза: промыть глаза с большим количеством воды и обратиться к врачу.

**36/37/39** – Использовать соответствующую защитную одежду, перчатки и защиту глаз / лица.

**45** – При несчастном случае или если вы чувствуете недомогание, немедленно обратиться к врачу (показать этикетку).

**61** – Избегать попадания в окружающую среду. См. специальные паспорта безопасности инструкции

**Температура воспламенения – 78 °С**