



**ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ГЕНЕТИКИ И РАЗВЕДЕНИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ
ЖИВОТНЫХ ФИЛИАЛ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО
БЮДЖЕТНОГО НАУЧНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ЖИВОТНОВОДСТВА – ВИЖ
ИМЕНИ АКАДЕМИКА Л.К. ЭРНСТА»**

ВЫДЕЛЕНИЕ РНК ИЗ ПЛАВНИКОВ РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ

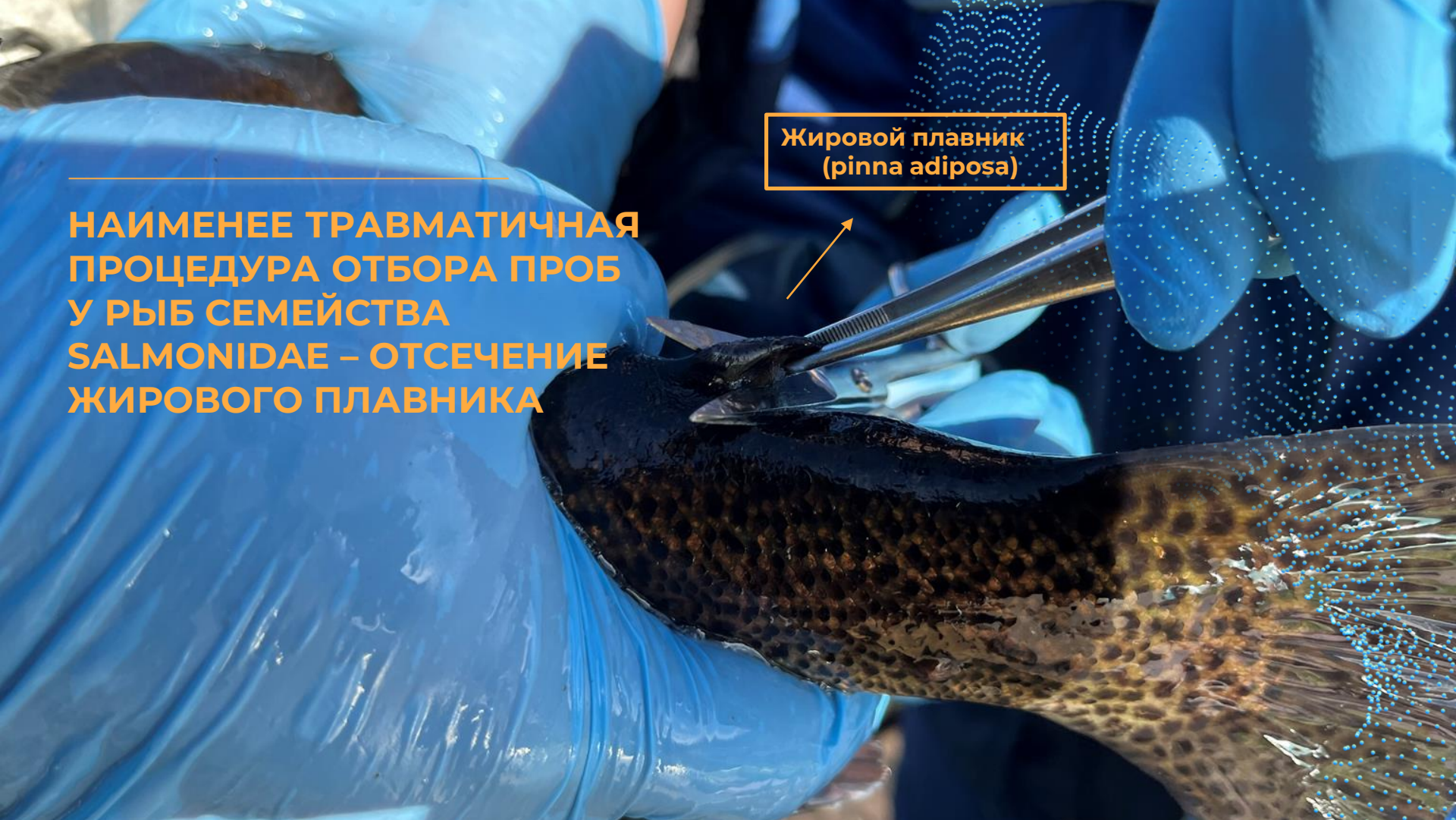
Материал подготовил м.н.с. лаборатории генетических технологий в агро – и аквахозяйстве Николаева Ольга Анатольевна

ВВЕДЕНИЕ

На сегодня экстракция нуклеиновых кислот возможна фактически из любой ткани живого организма. Выделение рибонуклеиновой кислоты обычно является рутинным мероприятием перед постановкой ПЦР, рт-ПЦР и других методов, с помощью которых изучается экспрессия гена или группы генов в различных тканях организма. Иногда для исследования достаточно взятия биоматериала от одного органа, однако статистически важным остается количество отобранных проб.

НАИМЕНЕЕ ТРАВМАТИЧНАЯ
ПРОЦЕДУРА ОТБОРА ПРОБ
У РЫБ СЕМЕЙСТВА
SALMONIDAE – ОТСЕЧЕНИЕ
ЖИРОВОГО ПЛАВНИКА

Жировой плавник
(pinna adiposa)





ХРАНЕНИЕ БИОМАТЕРИАЛА

осуществляется с помощью
РНК-стабилизирующего
раствора, либо путем
мгновенной заморозки

ВЫДЕЛЕНИЕ РНК

В лаборатории молекулярной генетики применяются реагенты, которые приобретаются набором или же по отдельности. Среди преимуществ коммерческих наборов можно выделить:

- Наличие практически всех необходимых реагентов для процедуры выделения нуклеиновых кислот
- Описание продукта, доступный протокол работы с реагентом
- Обратная связь с дистрибьютором по оставшимся вопросам

Важное условие при выделении РНК – проводить всю работу на льду или в криоштативах во избежание разрушения молекулы РНК ввиду ее неустойчивости. Также при работе с реагентами необходимо соблюдать правило личной и общей техники безопасности.



Процедура экстракции нуклеиновых кислот проходит три стадии

01

Лизис

Клеточных стенок,
затем мембран;
деградация белков

02


Разделение фаз

На нижнюю –
органическую,
интерфазу и
верхнюю фазу

03

Элюирование

Отделение ДНК
или РНК от других
клеточных
компонентов



ПРОТОКОЛ ВЫДЕЛЕНИЯ РНК НАБОРОМ VIOLAB MIX

СТАДИЯ I. ЛИЗИС ОБРАЗЦА

1. Добавить по 500 мкл реагента «ЛИРА» в пробирки для гомогенизатора и в пробирки на 2 мл. «ЛИРА» содержит фенол и гуанидин тиоцианат, необходимые для лизиса образца.

СТАДИЯ I. ЛИЗИС ОБРАЗЦА

2. Отрезать кусочек ткани (примерно 50 мг) в пробирку для гомогенизатора



СТАДИЯ I. ЛИЗИС ОБРАЗЦА

3. Гомогенизировать образцы
4. Перенести измельченный образец с помощью дозатора в пробирку на 2мл



ДОПОЛНИТЕЛЬНО

5. Для лучшей очистки ДНК от РНК рекомендуется центрифугирование 10 минут 10 - 12 тыс.об. В осадок выпадут внеклеточные мембраны, полисахариды, высокомолекулярная ДНК. Супернатант будет содержать РНК и белки. Важно использовать центрифугу с функцией охлаждения. Каждый раз центрифугирование будет проходить при температуре 4°C



СТАДИЯ 2. РАЗДЕЛЕНИЕ ФАЗ

6. Добавить 200 мкл хлороформа. Энергично встряхнуть пробирку в течение 10 с.
7. Инкубировать 3 минуты, периодически перемешивая. При перемешивании должна образоваться однородная суспензия. Хлороформ денатурирует белок и липиды и помогает поддерживать разделение органической и водной фазы.
8. Центрифугировать 10 минут 10 тыс. оборотов. После центрифугирования смесь разделится на нижнюю фазу (органическую), интерфазу и верхнюю фазу (водная).



СТАДИЯ 3 ЭЛЮЦИЯ РНК

9. Отобрать 300 мкл надосадочной жидкости, перенести в пробирку на 1,5 мл. Водная фаза, содержащая РНК, переносится аккуратно, избегая захвата интерфазы и нижней фазы.
10. Добавить 40 мкл ацетата натрия
11. Внести 70 мкл раствора для осаждения РНК
12. Добавить 410 мкл изопропилового спирта
13. Аккуратно перемешать, инкубировать 5 - 10 минут



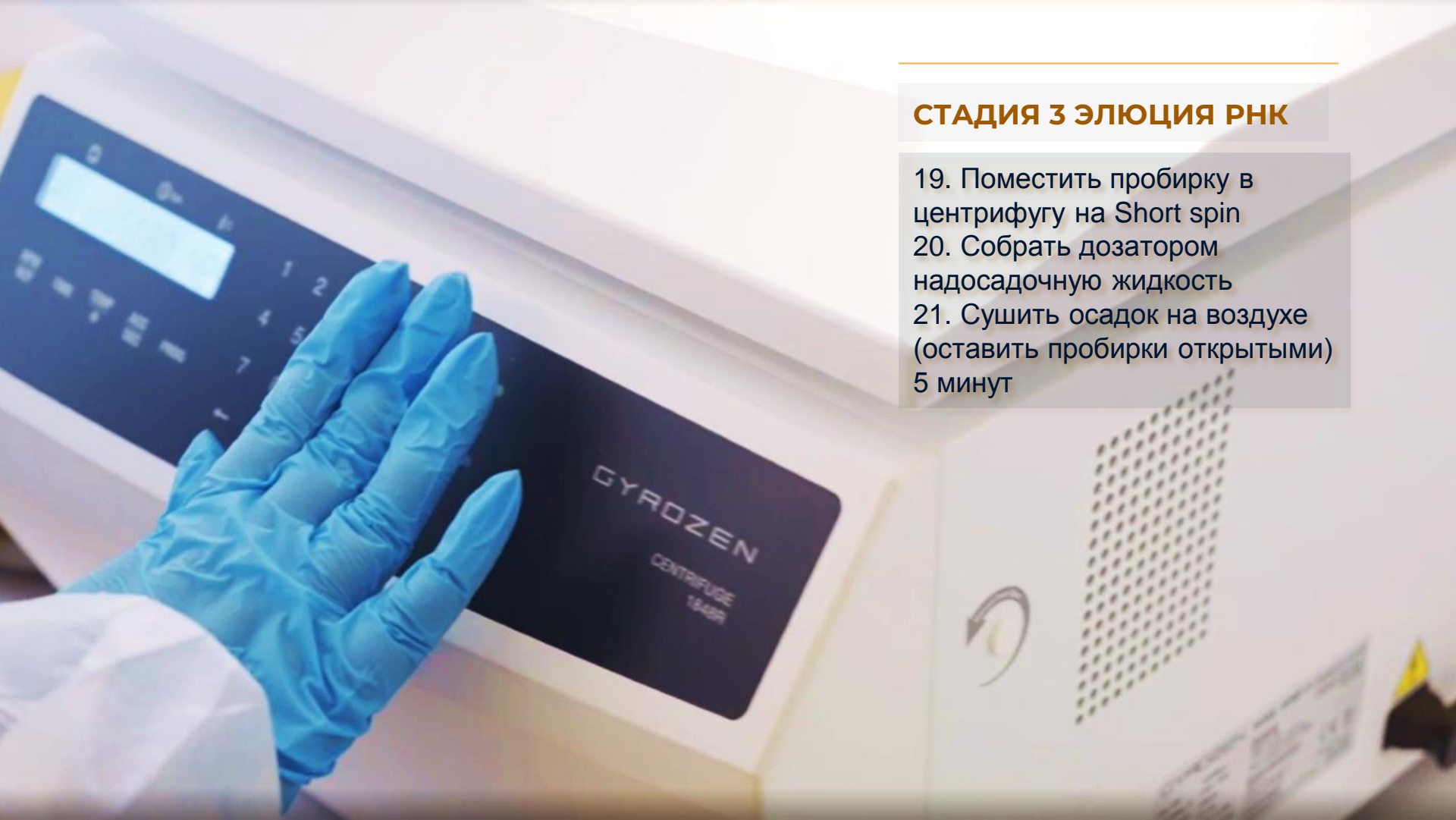
СТАДИЯ 3 ЭЛЮЦИЯ РНК

14. Центрифугировать 10 минут 10 тыс. оборотов.
Раствор для осаждения РНК способствует выпадению РНК в осадок, а изопропиловый спирт промывает нуклеиновую кислоту. После центрифугирования слить надосадочную жидкость в стакан «слив»
15. Добавить 900 мкл охлажденного этилового спирта 70°, перемешать
16. Центрифугировать 5 минут 10 тыс. оборотов, слить надосадочную жидкость в стакан «слив»



СТАДИЯ 3 ЭЛЮЦИЯ РНК

19. Поместить пробирку в центрифугу на Short spin
20. Собрать дозатором надосадочную жидкость
21. Сушить осадок на воздухе (оставить пробирки открытыми) 5 минут





СТАДИЯ 3 ЭЛЮЦИЯ РНК

22. Добавить 80 мкл воды, очищенной от РНКаз, инкубировать 10 минут
23. Перемешать на Vortex
24. Хранить образцы в морозильной камере при -20°C

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!

Работа подготовлена в рамках
выполнения государственного
задания № FGGN-2022-0007

