

Carrier-iRNA

Nosič pro precipitaci malých množství RNA nebo DNA
(katalogové číslo C078, C079)

rev. 11/2022

Popis

Carrier-iRNA je polyinosinová kyselina ve kvalitě pro molekulární biologii. Jedná se o účinný nosič pro etanolovou precipitaci pikogramových a vyšších množství RNA nebo DNA. Carrier-iRNA má několik výhod před jinými nosiči jakými jsou tRNA, kvasničná RNA nebo sonikovaná DNA pro koncentraci nukleových kyselin před další analýzou. Carrier-iRNA je syntetický polymer, který není zdrojem biologických kontaminací vzorků. Nukleové kyseliny získané po etanolové precipitaci v přítomnosti Carrier-iRNA jsou bezprostředně použitelné pro následné aplikace jakými jsou PCR a RT-PCR.

Technické údaje

Komponenty a balení

- Carrier-iRNA je dodáván v deionizované, ultračisté a sterilní vodě (18 Mohm.cm) v koncentraci ~10 mg/ml.
- Základní balení obsahuje 0,5 ml Carrier-iRNA v 2 ml umělohmotné zkumavce se šroubovacím uzávěrem.
- Carrier-iRNA je také součástí soupravy pro RNA nebo DNA precipitaci, obsahující mimo Carrier-iRNA také Carrier-ACRYL a Carrier-GLY, každý o objemu 1 ml. Srovnání vlastností různých nosičů pro RNA a DNA precipitaci je uvedeno s klíčovými referencemi v tabulce č. 1.

Skladování a stabilita

- Skladovat při teplotě $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$. Materiál snáší opakované rozmrazování. Pro redukci viskozity po zamražení doporučujeme zahřát zkumavku s Carrier-iRNA na 37°C po dobu 15 min. Neotevřená zkumavka je stabilní do expiračního data uvedeného na štítku.

Kontrola kvality

Každá šarže Carrier-iRNA je analyzována v řadě testů. Pro tyto testy je využíván pufr CAB (Carrier Assay Buffer): 10 mM Tris-HCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, pH 7.5 při 37°C .

- Test na precipitaci nukleových kyselin. Economy DNA marker (Kat. č. D071, 2,5 μl) je smíchán s 0,2 ml 10 mM Tris-HCl pufru, pH 8.0 + 1 mM EDTA, 1 μl Carrier-iRNA, 20 μl 3 M octanu sodného, pH 5.2 a 0.6 ml 96 % ethanolu. Po inkubaci 30 min při $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ je směs centrifugována při 12,000 x g, analyzována elektroforézou v agarózovém gelu s ethidium bromidem a vyhodnocována v UV světle. Více než 90% všech komponent DNA markeru je obsaženo v DNA precipitátu.
- Test na nikovací aktivitu. Plasmid pUC19 (1 μg) v 50 μl pufru CAB je inkubován s Carrier-iRNA (50 μg) 1 hod při 37°C a následně analyzován elektroforézou v agarózovém gelu s ethidium bromidem. Nikovací aktivita není pozorována.
- Test na ribonukleázovou aktivitu. RNA (~1 μg) v 50 μl CAB je inkubována 1 hod při 37°C s Carrier-iRNA (50 μg) a následně analyzována elektroforézou v agarózovém gelu s ethidium bromidem. Při prohlížení pod UV světlem nejsou pozorovány žádné změny ve vlastnostech testované RNA.

Kat. č.	Název výrobku a specifikace	Množství
C078	Carrier-iRNA	1x 0,5 ml
C079	Carrier-iRNA	5x 0,5 ml
C085s	Carrier-iRNA, GLY, ACRYL (sada)	1x 0,5 ml + 2x 1 ml



Tabulka 1. Srovnání vlastností nosičů pro RNA/DNA precipitaci.

Nosič	Hlavní komponenta	Výhody	Nevýhody
Carrier-iRNA (dříve označovaný RNA nosič)	Polyinosinová kyselina ⁽¹⁾	Chemicky definovaná RNA, která je vhodnější pro cDNA syntézu než běžně používané rRNA nebo tRNA.	Inhibuje reakce katalyzované terminální transferázou nebo polynukleotid kinázou. Interferuje s určováním koncentrace RNA/DNA.
Carrier-ACRYL	Lineární polyakrylamid ^(2,3)	Inertní neutrální nosič, neinhibuje DNA-protein interakce a enzymové reakce. Neinterferuje s určováním koncentrace RNA/DNA. Neprecipituje krátké oligonukleotidy (≤ 20 pb).	Nevhodný pro precipitaci krátkých oligonukleotidů (≤ 20 pb).
Carrier-GLY	Polysacharid (glykogen z ústřic) ⁽⁴⁾	Purifikovaný glykogen neinhibuje klonování DNA a většinu enzymových reakcí. Neinterferuje s určováním koncentrace RNA/DNA. Je vhodný pro precipitaci i krátkých oligonukleotidů (≥ 8 pb).	Může inhibovat některé DNA-protein interakce. Může inhibovat reverzní transkripci dlouhých RNA templátů.

Reference

1. Winslow, S. G., and P. A. Henkart. 1991. Polyinosinic acid as a carrier in the microscale purification of total RNA. *Nucleic Acids Res.* 19: 3251-3253.
2. Gaillard, C., and F. Strauss. 1990. Ethanol precipitation of DNA with linear polyacrylamide as carrier. *Nucleic Acids Res.* 18: 378.
3. Sachdeva, R., and M. Simm. 2011. Application of linear polyacrylamide coprecipitation of denatured templates for PCR amplification of ultra-rapidly reannealing DNA. *Biotechniques* 50: 217-219.
4. Tracy, S. 1981. Improved rapid methodology for the isolation of nucleic acids from agarose gels. *Prep. Biochem.* 11: 251-268.

Protokol

Požadované přístroje a roztoky

- Mikrocentrifuga (12.000 x g)
- PCR Sodium acetate buffer solution, 3 M, pH 5.2. Top-Bio, Kat. č. P053
- PCR Ethanol, 96%, Top-Bio, Kat. č. P054
- PCR Ethanol, 75%, Top-Bio, Kat. č. P044
- 10 mM Tris - 1 mM EDTA buffer, připravený 100x ředěním z 1 M PCR Tris-EDTA buffer solution, Top-Bio, Kat. č. P055
- PCR Ultra H₂O (Top-Bio, Kat. č. P040) nebo PCR H₂O (Top-Bio, Kat. č. P042)

Procedura

1. Ke vzorku RNA nebo DNA (maximálně 400 μ l v 1,5 ml zkumavce) přidat 1 μ l Carrier-iRNA (10 μ g).
2. Přidat 0.1 objemu 3 M octanu sodného, pH 5.2.
3. Přidat 2,5 – 3,0 x objemu vzorku 96% ethanolu.

Příklad smíchání reagens

DNA/RNA vzorek	Carrier-iRNA	3M Sodium acetate buffer	96% Ethanol
200 μ l	1 μ l	20 μ l	600 μ l

4. Směs krátce vortexovat (2 sec) a nechat stát alespoň 30 min při -20°C.
5. Centrifugovat zkumavku 15 min při 4°C v mikrocentrifuze při maximální rychlosti (12,000 x g).
6. Pečlivě odstranit supernatant a přidat 200 μ l 75% ethanolu.
7. Centrifugovat zkumavku 2 min a pečlivě odstranit supernatant.
8. Vysušit peletu 15 min na vzduchu.
9. Rozpustit RNA nebo DNA v 10 mM Tris-HCl + 1 mM EDTA pufru, PCR ultra H₂O nebo PCR H₂O.