

Carrier-GLY

Nosič pro precipitaci malých množství RNA nebo DNA
(katalogové číslo C083 a C084)

rev. 04/2025

Popis

Carrier-GLY je vysoce purifikovaný polysacharid (glykogen) z ústřic. Jedná se o inertní nosič, který neobsahuje hostitelské DNA, RNA, nikázy, DNázy a RNázy a je ve srovnání s tRNA, kvasničnou RNA nebo sonikovanou DNA vhodnějším nosičem pro precipitaci nukleových kyselin z důvodu menší pravděpodobnosti že by interferoval s enzymatickými reakcemi při manipulaci s RNA nebo DNA a navíc je účinnější při RNA a DNA precipitaci. Pomocí Carrier-GLY mohou být precipitovány i malá množství (pikogramy/ml) RNA nebo DNA oligonukleotidů o velikosti pouhých 8 párů bazí.

Technické údaje

Komponenty a balení

- Carrier-GLY je dodáván jako vysoce purifikovaný glykogen v deionizované, ultračisté a sterilní vodě (18 Mohm.cm) v koncentraci ~20 mg/ml.
- Základní balení obsahuje 1 ml Carrier-GLY v 2-ml umělohmotné zkumavce se šroubovacím uzávěrem.
- Carrier-GLY je také součástí soupravy pro RNA a DNA precipitaci, obsahující mimo Carrier-GLY také Carrier-iRNA (0,5 ml) and Carrier-ACRYL (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. Neotevřená zkumavka je stabilní do expiračního data uvedeného na štítku.

Kontrola kvality

Každá šarže Carrier-GLY je analyzována v řadě testů. Pro tyto testy je využíván pufr CAB (Carrier assay buffer): 10 mM Tris-HCl, 2 mM MgCl_2 , 1 mM dithiothreitol, pH 7.5 při 37°C .

- Test na precipitaci nukleových kyselin. Economy DNA marker (Kat. č. D071, 2,5 μ) je smíchan s 0,2 ml 10 mM Tris-HCl pufru s 1 mM EDTA, 1 μ l Carrier-GLY, 20 μ l 3 M octanu sodného, pH 5.2, a 0.6 ml 96 % etanolu. 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 μ g) v 50 μ l pufru CAB je inkubován s Carrier-GLY (50 μ g) 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 μ g) v 50 μ l CAB je inkubována 1 hodiny při 37°C s Carrier-GLY (50 μ g) a následně analyzována elektroforézou v agarózovém gelu s ethidium bromidem. Při prohlížení pod UV světlem nejsou pozorovány žádné změny ve vlastnostech testované RNA
- Nepřítomnost nukleových kyselin. Carrier-GLY (200 μ g) je vpraven do agarózového gelu s ethidium bromidem. DNA není pozorována při prohlížení gelů v UV světle.

Kat. č.	Název výrobku a specifikace	Množství
C083	Carrier-GLY	1x 1 ml
C084	Carrier-GLY	5x 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-GLY (20 μ g glykogenu).
2. Přidat 0.1 objemu 3M octanu sodného, pH 5.2.
3. Přidat 2,5 – 3,0 x objemu vzorku 96% ethanolu.

Příklad smíchání reagens

DNA/RNA vzorek	Carrier-GLY	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 zkumavky 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 zkumavky 2 min a pečlivě odstranit supernatant
8. Vysušit peletu 15 min v otevřené zkumavce.
9. Rozpustit RNA nebo DNA v 10 mM Tris-1 mM EDTA pufru, PCR ultra H₂O nebo PCR H₂O.