



Protocollo per l'annealing dei duplex RNA

Gli oligonucleotidi prodotti e consegnati da Bio-Fab sono deprotetti e purificati tramite HPLC; sebbene i nostri nucleotidi siano RNase-free, l'RNA è molto suscettibile alla degradazione di RNasi introdotte durante l'utilizzo, quindi è necessario che tutti i passaggi siano effettuati in assenza di RNasi. Gli oligonucleotidi ad RNA devono essere sempre utilizzati con i guanti; i reagenti le pipette, i tubi, etc devono essere RNase-free. Gli oligo ad RNA possono essere conservati fino a 6 mesi a -20°C se liofilizzati.

Annealing degli RNA/Duplex

Se ordinate gli oligo single strand (ss) RNA separatamente, dissolvete entrambi gli oligo fino ad una concentrazione adeguata (es. 100 µM in H₂O RNase-free 4<pH<9). Raccomandiamo di preparare delle aliquote e conservarle a -20°C.

Diluite separatamente un'aliquota di oligo RNA ad una concentrazione finale di 50 µM usando acqua RNase-free.

Miscelate 40 µl di ogni oligo diluito ed aggiungete 20 µl di Annealing Buffer (5X) *, portando tutto ad un volume finale di 100 µl e quindi ad una concentrazione finale di RNA DUPLEX DI 20 µM.

Incubate la soluzione per 1 minuto a 90-95°C e raffreddate molto lentamente (non meno di 30 minuti) fino a riportare la temperatura della soluzione a 25 °C. Conservate la soluzione a 4°C fino all'utilizzo. Consigliamo di utilizzare questa soluzione entro 24h.

Se ordinate gli oligo RNA Duplex in un unico tubo, sciogliete il pellet nell'Annealing Buffer (1X)* alla concentrazione desiderata; raccomandiamo di preparare delle aliquote e conservarle a -20°C.

Per la formazione dei duplex, diluire un'aliquota di RNA double strand (ds) alla concentrazione desiderata, utilizzando l'Annealing Buffer (1X).

Incubate la soluzione per 1 minuto a 90-95°C e raffreddate molto lentamente (non meno di 30 minuti) fino a riportare la temperatura della soluzione a 25°C. Conservate la soluzione a 4°C fino all'utilizzo. Consigliamo di utilizzare questa soluzione entro 24h.

Gli RNA duplex annilati possono essere conservati a -20°C. Non congelare e scongelare per più di 5 volte. Raccomandiamo di ripetere la procedura di annealing descritta in precedenza prima di usare le aliquote scongelate.

*Annealing buffer:

5 x Annealing buffer: 300 mM KCl, 30 mM HEPES-pH 7.5, 1.0 mM MgCl₂

1 x Annealing buffer: 60 mM KCl, 6 mM HEPES-pH 7.5, 0.2 mM MgCl₂

References:

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature, 2001, 411[6836]:494-8.

Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. Genes Dev, 2001, 15[2]:188-200.

Tuschl T, Zamore PD, Lehmann R, Bartel DP, Sharp PA. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. Genes Dev, 1999, 13[24]:3191-7.