

Instrukcja

Total RNA Midi

Zestaw do izolacji całkowitego RNA.

numer katalogowy	wielkość
032-20	20 izolacji

Produkt przeznaczony wyłącznie do badań naukowych.

Gwarancja

Firma A&A Biotechnology udziela gwarancji na niniejszy produkt.

Firma nie gwarantuje poprawnego działania produktu w przypadku:

- odstępstwa od dostarczonego wraz z produktem protokołu
- braku zalecanego w niniejszym protokole wyposażenia i materiałów
- użycia innych odczynników niż zalecane lub które nie wchodzą w skład produktu
- użycia przeterminowanych odczynników oraz elementów produktu

Spis treści

Specyfikacja	3
Skład	3
Dodatkowy sprzęt i odczynniki	3
Niezbędne	3
Opcjonalne	3
Ważne informacje	4
Przygotowanie materiału	4
Bakterie / drożdże	4
Hodowle komórkowe	4
Tkanki roślinne / zwierzęce	4
Krew świeża (nie mrożona)	4
Protokół izolacji RNA	5
Doczyszczanie eluatu RNA (opcjonalnie)	6
Zastosowanie DNAzy (nr kat. 1009-10, 1009-100)	6
Zastosowanie zestawu Clean-Up RNA Concentrator (nr kat. 039-25C, 039-100C)	6
Informacje Bezpieczeństwa	7

Specyfikacja

format	midikolumna
pojemność złoza	500 µg RNA
wielkość próbki	• hodowla bakteryjna: do 10 ml • hodowla drożdżowa: do 10 ml • krew: do 10 ml • hodowla komórkowa: do 1×10^7 • tkanka roślinna, zwierzęca: do 150 mg
objętość elucji	od 400 µl
roztwór elucyjny	woda ultraczysta

Skład

składnik	20 izolacji	przechowywanie
Midikolumny	20 szt.	15–25 °C
Kolumna równoważąca	1 szt.	15–25 °C
Probówki 15 ml	40 szt.	15–25 °C
A1 roztwór płuczący	200 ml	15–25 °C
Fenozol	50 ml	4 °C
Izopropanol	20 ml	15–25 °C
woda ultraczysta	15 ml	15–25 °C

Dodatkowy sprzęt i odczynniki

Niezbędne

- Jałowe probówki 15 ml typu Falcon
- Chloroform
- Wirówka
- Inkubator 50 °C

Opcjonalne

- RBCL (nr kat. 213-100, 213-250)
- DNAza (nr kat. 1009-10, 1009-100)
- Clean-Up RNA Concentrator (nr kat. 039-25C, 039-100C)

Ważne informacje

W przypadku pracy z RNA używać plastikowych materiałów zużywalnych wolnych od RNaz. Pracować sterylnie, używać jednorazowych rękawiczek i zmieniać je każdorazowo, kiedy wymaga tego dobra praktyka laboratoryjna.

Przygotowanie materiału

Bakterie / drożdże

1. Odwirować **10 ml** świeżej nocnej hodowli bakteryjnej / hodowli drożdży i usunąć supernatant.
2. Przejść do punktu 1. protokołu izolacji.

Hodowle komórkowe

1. Odwirować komórki w ilości **1 x 10⁷** i usunąć supernatant.
2. Przejść do punktu 1. protokołu izolacji.

Tkanki roślinne / zwierzęce

1. Tkanki (**50-150 mg**) należy rozetrzeć w moździerzu z ciekłym azotem..
2. Przenieść sproszkowane tkanki do probówki 15 ml typu Falcon (nie ma w zestawie).
3. Przejść do punktu 1. protokołu izolacji.

Krew świeża (nie mrożona)

1. Do **5-10 ml** krwi dodać odpowiednią ilość buforu **RBCL** do lizy erytrocytów (nie ma w zestawie).
Zalecamy użycie 5 objętości RBCL na 1 objętość krwi.
2. Całość wymieszać i pozostawić **w lodzie na 15 min.**
Po inkubacji roztwór z mętnego powinien zmienić się na szkarłatnie przezroczysty.
3. Wirować przez **5 min** przy **3000 x g**, a następnie usunąć supernatant.
4. Przejść do punktu 1. protokołu izolacji.

Protokół izolacji RNA

1. Do przygotowanej próbki dodać po **2,4 ml fenozolu** i mieszać przez pipetowanie, aż do całkowitej lizy komórek.

Fenozol inaktywuje endogenne RNAzy. Próby zawieszone w fenozolu mogą być przechowywane:

- do roku w temp. -20 °C, -80 °C
- do tygodnia w temp. +4 °C do +8 °C
- do 24 godzin w temp. pokojowej

Roztwór fenozolu zawiera fenol. Należy unikać jego kontaktu ze skórą i pracować w rękawiczkach ochronnych.

2. Inkubować próbkę przez **5 min** w temp. **50 °C**.

3. Do lizatu dodać **600 µl chloroformu** (nie ma w zestawie) i delikatnie mieszać próbkę przez kilkakrotne odwracanie probówki.

4. Próbkę pozostawić na **3 min** w temp. **pokojowej**.
Następnie wirować przez **5 min** przy **5000 RPM**.

W przypadku nieparzystej ilości próbek należy użyć do zrównoważenia kolumny równoważającej z odpowiednią ilością wody lub dowolnego roztworu równoważącego.

5. Pobrać górne frakcje do **nowej** probówki 15 ml (nie ma w zestawie).
Dodać po **800 µl izopropanolu**.

6. Dokładnie wymieszać i nanieść na midikolumnę.

7. Wirować przez **2 min** przy **4000 RPM**.

8. Dodać po **3,5 ml** roztworu płuczącego **A1**.

9. Wirować przez **2 min** przy **4000 RPM**.

10. Przenieść midikolumnę do **nowej** probówki 15 ml (w zestawie).
Dodać po **3,5 ml** roztworu płuczącego **A1**.

11. Wirować przez **10 min** przy **5000 RPM**.

12. Przenieść midikolumnę do **nowej** probówki 15 ml (w zestawie).
Do złoża, znajdującego się na dnie minikolumny, dodać po **200 µl wody ultraczystej**.

13. Próbkę pozostawić na **3 min** w **temp. pokojowej**.
Wirować przez **2 min** przy **4000 RPM**.
14. Do złoza, znajdującego się na dnie minikolumny, dodać po **200 µl wody ultraczystej**.
15. Próbkę pozostawić na **3 min** w **temp. pokojowej**.
Wirować przez **2 min** przy **4000 RPM**.
16. Midikolumnę usunąć, a oczyszczone RNA znajdujące się w próbówce przechowywać w temp. -20 °C, -80 °C, do czasu dalszych analiz.

Doczyszczanie eluatu RNA (opcjonalnie)

Zestaw Total RNA Midi efektywnie izoluje i oczyszcza RNA bez potrzeby jego dodatkowego doczyszczania.

W szczególnym przypadku, gdy konieczne jest usunięcie nawet śladowych ilości DNA zalecamy wybór jednej z metod:

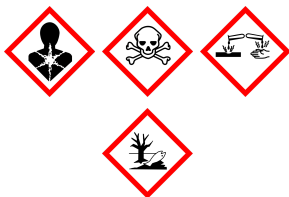
Zastosowanie DNAzy (nr kat. 1009-10, 1009-100)

1. Do **400 µl eluatu RNA** dodać po:
 4 µl **DNAzy** (10 U/µl)
 40 µl **10x buforu reakcyjnego** (w zestawie z DNAzą)
2. Inkubować próbkę przez **15 min** w temp. **37 °C**.
3. Inkubować próbkę przez **10 min** w temp. **65 °C** - inaktywacja DNAzy.

Zastosowanie zestawu Clean-Up RNA Concentrator (nr kat. 039-25C, 039-100C)

Zestaw oparty jest na mikrokolumnach i służy do usuwania śladowych ilości DNA.
Elucja RNA w ok. 30 µl wody ultraczystej.

Informacje Bezpieczeństwa



NIEBEZPIECZEŃSTWO

Fenozol

H301+H311+H331 Działa toksycznie po połknięciu, w kontakcie ze skórą lub w następstwie wdychania.
H314 Powoduje poważne oparzenia skóry oraz uszkodzenia oczu.

H341 Podejrzewa się, że powoduje wady genetyczne.

H373 Może powodować uszkodzenie narządów poprzez długotrwałe lub wielokrotne narażenie.

H411 Działa toksycznie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki.

P261 Unikać wdychania pyłu.

P273 Unikać uwolnienia do środowiska.

P280 Stosować rękawice ochronne/ odzież ochronną/ ochronę oczu/ ochronę twarzy.

P301+P310 W przypadku połknięcia: natychmiast skontaktować się z Ośrodkiem Zatruc lub lekarzem.

P305+P351+P338 W przypadku dostania się do oczu: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć

soczewki kontaktowe, jeżeli są i

można je łatwo usunąć. Nadal płukać.

P310 Natychmiast skontaktować się z Ośrodkiem Zatruc lub lekarzem.



NIEBEZPIECZEŃSTWO

A1 roztwór płuczący

H225 Wysoce łatwopalna ciecz i pary.

H319 Działa drażniąco na oczy.

H336 Może wywoływać uczucie senności lub zawroty głowy.

P210 Przechowywać z dala od źródeł ciepła, gorących powierzchni, iskrzenia, otwartego ognia i innych źródeł zapłonu. Palenia wzbronione.

P261 Unikać wdychania par.

P305+P351+P338 W przypadku dostania się do oczu: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć

soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.



NIEBEZPIECZEŃSTWO

Izopropanol

H225 Wysoce łatwopalna ciecz i pary.

H319 Działa drażniąco na oczy.

H336 Może wywoływać uczucie senności lub zawroty głowy.

P210 Przechowywać z dala od źródeł ciepła, gorących powierzchni, iskrzenia, otwartego ognia i innych źródeł zapłonu. Palenia wzbronione.

P261 Unikać wdychania par.

P305+P351+P338 W przypadku dostania się do oczu: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć

soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.



A&A BIOTECHNOLOGY
innovating life science

A&A Biotechnology, ul. Strzelca 40, 80-299 Gdańsk
tel. 883 323 761, 600 776 268
info@aabiot.com, www.aabiot.com

