

Instrukcja

Total RNA Mini Plus

Zestaw do izolacji całkowitego RNA. Procedura izolacji nie wymaga użycia chloroformu.

numer katalogowy	wielkość
036-25	25 izolacji
036-100	100 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:

- odstąpienia od dostarczonego wraz z produktem protokołu
- braku zalecanego w niniejszym protokole wyposażenia i materiałów
- użycia innych odczynników niż zalecane lub które nie wchodzi 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	4
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	minikolumna
pojemność złoza	100 µg RNA
wielkość próbki	• hodowla bakteryjna: do 3 ml • hodowla drożdżowa: do 1 ml • krew: do 2 ml • hodowla komórkowa: do 1×10^6 • tkanka roślinna, zwierzęca: do 50 mg
objętość elucji	od 100 µl
roztwór elucyjny	woda ultraczysta

Skład

składnik	25 izolacji	100 izolacji	przechowywanie
Minikolumny	25 szt.	100 szt.	15–25 °C
Probówki 2 ml	50 szt.	200 szt.	15–25 °C
A1 roztwór płuczący	50 ml	200 ml	15–25 °C
Fenozol Plus	15 ml	50 ml	4 °C
Izopropanol	15 ml	50 ml	15–25 °C
Woda ultraczysta	8 ml	30 ml	15–25 °C

Dodatkowy sprzęt i odczynniki

Niezbędne

- Jałowe probówki 1,5 ml typu Eppendorf
- Mikrowirówka
- 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

1. Odwirować **1-3 ml** świeżej nocnej hodowli bakteryjnej i usunąć supernatant.
2. Przejść do punktu 1. protokołu izolacji.

Drożdże

1. Odwirować **1 ml** hodowli drożdży i usunąć supernatant.
2. Przejść do punktu 1. protokołu izolacji.

Hodowle komórkowe

1. Odwirować komórki w ilości **1 x 10⁶** i usunąć supernatant.
2. Przejść do punktu 1. protokołu izolacji.

Tkanki roślinne / zwierzęce

1. Tkanki (**20-50 mg**) należy rozetrzeć w moździerzu z ciekłym azotem..
2. Przenieść sproszkowane tkanki do probówki 1,5 ml typu Eppendorf (nie ma w zestawie).
3. Przejść do punktu 1. protokołu izolacji.

Krew świeża (nie mrożona)

1. Do **1-2 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 **10 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 **400 µl fenozolu Plus** i mieszać przez pipetowanie, aż do całkowitej lizy komórek.

Fenozol Plus inaktywuje endogenne RNAzy. Próby zawieszone w fenozolu Plus 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 Plus 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 po **150 µl wody ultraczystej**.
Próbkę intensywnie wortexować przez **15 s**.

4. Próbkę pozostawić na **5 min** w temp. **pokojowej**.
Następnie wirować przez **15 min** przy **10 000-12 000 RPM**.

Podczas wirowania, DNA oraz białka osadzają się na dnie próbki. RNA pozostaje rozpuszczone w supernatancie.

5. Pobrać po **400 µl supernatantu** do **nowej** próbki 1,5 ml (nie ma w zestawie).
Dodać po **400 µl izopropanolu**.

6. Dokładnie wymieszać i nanieść na minikolumnę.

7. Wirować przez **1 min** przy **10 000-12 000 RPM**.

8. Przenieść minikolumnę do **nowej** próbki 2 ml (w zestawie).
Dodać po **700 µl** roztworu płuczącego **A1**.

9. Wirować przez **1 min** przy **10 000-12 000 RPM**.

10. Przenieść minikolumnę do **nowej** próbki 2 ml (w zestawie).
Dodać po **700 µl** roztworu płuczącego **A1**.

11. Wirować przez **1 min** przy **10 000-12 000 RPM**.

12. Wyjąć minikolumnę z próbki, wyłączyć przesącz i ponownie umieścić w niej minikolumnę.
Dodać po **300 µl** roztworu płuczącego **A1**.

13. Wirować przez **2 min** przy **10 000-12 000 RPM**.
14. Przenieść minikolumnę do **nowej** probówki 1,5 ml (nie ma w zestawie).
Do złoża, znajdującego się na dnie minikolumny, dodać po **50-100 µl wody ultraczystej**.
15. Próbkę pozostawić na **2 min** w **temp. pokojowej**.
Wirować przez **1 min** przy **10 000-12 000 RPM**.
16. Minikolumnę usunąć, a oczyszczone RNA znajdujące się w probówce przechowywać w temp. -20 °C, -80 °C, do czasu dalszych analiz.

Doczyszczanie eluatu RNA (opcjonalnie)

Zestaw Total RNA Mini Plus 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)

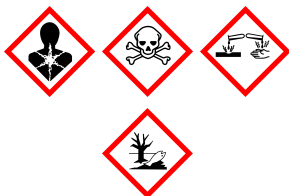
1. Do **100 µl eluatu RNA** dodać po:
1 µl DNAzy (10 U/µl)
10 µl 10x buforu reakcyjnego (w zestawie z DNAzą)
2. Inkubować próbkę przez **15 min** w temp. **37 °C**.
3. Inkubować próbkę przez **10 min** w temp. **65 °C** - inaktywacja DNAzy.

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 Plus

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

