

Instrukcja

Micro RNA

Zestaw do izolacji małowzrostkowego RNA

numer katalogowy	wielkość
035-25	25 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 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	3
Przygotowanie materiału	4
Bakterie / drożdże	4
Hodowle komórkowe	4
Tkanki roślinne / zwierzęce	4
Krew świeża (nie mrożona)	4
Protokół izolacji małowcząsteczkowego RNA	5
Protokół izolacji wielkowcząsteczkowego RNA	6
Informacje Bezpieczeństwa	7

Specyfikacja

format	minikolumna
pojemność złoza	10 µg RNA
wielkość próbki	• hodowla bakteryjna, drożdżowa : do 3 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	przechowywanie
Minikolumny	50 szt.	15–25 °C
Probówki 2 ml	25 szt.	15–25 °C
A1 roztwór płuczący	50 ml	15–25 °C
Fenozol	25 ml	4 °C
Izopropanol	17 ml	15–25 °C
Woda ultraczysta	8 ml	15–25 °C

Dodatkowy sprzęt i odczynniki

Niezbędne

- Jałowe probówki 1,5 ml typu Eppendorf
- Chloroform
- Mikrowirówka
- Inkubator 50 °C

Opcjonalne

- Roztwór płuczący A1, woda ultraczysta, RBCL
- Jałowe probówki 1,5 ml, 2 ml typu Eppendorf

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 **1-3 ml** świeżej nocnej hodowli bakteryjnej / hodowli drożdży i usunąć supernatant.
2. Przejść do punktu 1. protokołu izolacji małowzrostkowego RNA.

Hodowle komórkowe

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

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 małowzrostkowego RNA.

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 małowzrostkowego RNA.

Protokół izolacji małowzasteczkowego RNA

1. Do przygotowanej próbki dodać po **800 µl 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 **200 µl chloroformu** (nie ma w zestawie) i delikatnie mieszać próbkę przez kilkakrotne odwracanie probówki.
4. Próbkę pozostawić na **3 min** w temp. **pokowejej**.
Następnie wirować przez **10 min** przy **10 000-12 000 RPM**.

W przypadku braku rozdzięcia na dwie fazy (po wirowaniu), należy powtórnie wymieszać próbkę oraz ponownie wirować.
5. Pobrać górne frakcje (ok. **450 µl supernatantu**) do **nowej** probówki 1,5 ml (nie ma w zestawie).
Dodać po **150 µl izopropanolu**.
6. Dokładnie wymieszać i nanieść na minikolumnę.

Minikolumna zatrzymuje wielkowzasteczkowe RNA, natomiast małowzasteczkowe RNA nie jest wiązane przez złożo.
7. Wirować przez **1 min** przy **10 000-12 000 RPM**.

W celu odzyskania z minikolumny wielkowzasteczkowego RNA, należy przejść do protokołu odzyskiwania wielkowzasteczkowego RNA (str. 6).
8. Usunąć minikolumnę z probówki. Do przesączu dodać po **400 µl izopropanolu**.
9. Całość wymieszać przez pipetowanie i nanieść po **500 µl mieszaniny** na nową minikolumnę (w zestawie).
10. Wirować przez **1 min** przy **10 000-12 000 RPM**.
11. Wyjąć minikolumnę z probówki, wylać przesącz i ponownie umieścić w niej minikolumnę.
Następnie nanieść na minikolumnę pozostałą część mieszaniny.

12. Wirować przez **1 min** przy **10 000-12 000 RPM**.
13. Wyjąć minikolumnę z probówki, wyłączyć przesącz i ponownie umieścić w niej minikolumnę. Dodać po **700 µl** roztworu płuczącego **A1**.
14. Wirować przez **1 min** przy **10 000-12 000 RPM**.
15. Wyjąć minikolumnę z probówki, wyłączyć przesącz i ponownie umieścić w niej minikolumnę. Dodać po **700 µl** roztworu płuczącego **A1**.
16. Wirować przez **1 min** przy **10 000-12 000 RPM**.
17. Wyjąć minikolumnę z probówki, wyłączyć przesącz i ponownie umieścić w niej minikolumnę. Dodać po **200 µl** roztworu płuczącego **A1**.
18. Wirować przez **2 min** przy **10 000-12 000 RPM**.
19. Przenieść minikolumnę do **nowej** probówki 1,5 ml (nie ma w zestawie). Do złoża, znajdującego się na dnie minikolumny, dodać po **100 µl wody ultraczystej**.
20. Próbkę pozostawić na **3 min** w **temp. pokojowej**. Wirować przez **1 min** przy **10 000-12 000 RPM**.
21. Minikolumnę usunąć, a oczyszczone RNA znajdujące się w probówce przechowywać w temp. -20 °C, -80 °C, do czasu dalszych analiz.

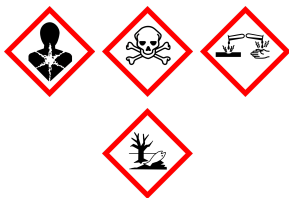
Protokół odzyskiwania wielkocząsteczkowego RNA

Roztwór płuczący A1, wodę jałową oraz probówki odbieralnikowe 1,5 ml i 2 ml należy zamówić dodatkowo.

1. Przenieść minikolumnę do **nowej** probówki 2 ml (nie ma w zestawie). Dodać po **700 µl** roztworu płuczącego **A1**.
2. Wirować przez **1 min** przy **10 000-12 000 RPM**.
3. Wyjąć minikolumnę z probówki, wyłączyć przesącz i ponownie umieścić w niej minikolumnę. Dodać po **700 µl** roztworu płuczącego **A1**.

4. Wirować przez **1 min** przy **10 000-12 000 RPM**.
5. Wyjąć minikolumnę z probówki, wylać przesącz i ponownie umieścić w niej minikolumnę. Dodać po **200 µl** roztworu płuczącego **A1**.
6. Wirować przez **2 min** przy **10 000-12 000 RPM**.
7. Przenieść minikolumnę do **nowej** probówki 1,5 ml (nie ma w zestawie). Do złoża, znajdującego się na dnie minikolumny, dodać po **100 µl wody ultraczystej**.
8. Próbkę pozostawić na **3 min** w **temp. pokojowej**. Wirować przez **1 min** przy **10 000-12 000 RPM**.
9. Minikolumnę usunąć, a oczyszczone RNA znajdujące się w probówce przechowywać w temp. -20 °C, -80 °C, do czasu dalszych analiz.

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@aabiotech.com, www.aabiotech.com

