

Instrukcja

Bead-Beat Total RNA Mini

Uniwersalny zestaw do izolacji całkowitego RNA z materiałów odpornych na lizę. Procedura z lizą mechaniczną.

numer katalogowy	wielkość
031-25BB	25 izolacji
031-100BB	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:

- 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	3
Przygotowanie materiału	4
Bakterie	4
Drożdże	4
Tkanki zwierzęce / roślinne	4
Protokół izolacji	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 drożdży: do 1 ml • tkanka: 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	25 szt.	100 szt.	15–25 °C
Probówki z kuleczkami cyrkoniovymi	25 szt.	100 szt.	15–25 °C
A1 roztwór płuczący	50 ml	200 ml	15–25 °C
Fenozol	25 ml	100 ml	4 °C
Izopropanol	15 ml	50 ml	15–25 °C
Woda ultraczysta	8 ml	15 ml	15–25 °C

Dodatkowy sprzęt i odczynniki

Niezbędne

- Jałowe probówki 1,5 ml typu Eppendorf
- Beadbeater (np. Mini-Beadbeater firmy BioSpec, FastPrep-24 firmy MP Biomedicals)
- Chloroform
- Mikrowirówka
- Inkubator 50 °C

Opcjonalne

- 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

UWAGA:

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

- do roku w temp. -20 °C, -80 °C
- do tygodnia w temp. od +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.

Bakterie

1. Odwirować **1-3 ml** świeżej nocnej hodowli bakteryjnej i usunąć supernatant.
2. Dodać po **800 µl fenozolu**, zawiesić osad, przenieść mieszaninę do probówki z kuleczkami cyrkoniovymi.
3. Prześć do punktu 1. protokołu izolacji.

Drożdże

1. Odwirować **1 ml** hodowli drożdży i usunąć supernatant.
2. Dodać po **800 µl fenozolu**, zawiesić osad, przenieść mieszaninę do probówki z kuleczkami cyrkoniovymi.
3. Prześć do punktu 1. protokołu izolacji.

Tkanki zwierzęce / roślinne

Uwaga:

Nie wszystkie typy tkanek nadają się do efektywnego rozbicia przy użyciu Beadbeatera.

Jest to kwestia wcześniejszych eksperymentów.

Metoda beadbeatingu jest sugerowana dla miękkich tkanek:

zwierzęce: np. mózg, tkanki miękkich organów, miękkie mięśnie, mięso, mięśnie ryb, itp.

roślinne: np. zielona miękka łodyga, miękkie liście, miękkie korzenie.

1. Przenieść **20-50 mg** miękkiej tkanki do probówki z kuleczkami cyrkoniovymi.
2. Dodać po **800 µl fenozolu**.
3. Prześć do punktu 1. protokołu izolacji.

Protokół izolacji

1. Próbki umieścić w urządzeniu Beadbeater i przeprowadzić proces wytrząsania. Czas wytrząsania powinien być wystarczający do rozpadu próbki, ale nie do nadmiernego jej rozgrzania, np. cykle 10-20 s wytrząsania, 1 min przerwy na chłodzenie.
2. Inkubować próbkę przez 5 min w temp. 50 °C.
3. Do lizatu dodać po 200 µl chloroformu (nie ma w zestawie) i delikatnie mieszać próbkę przez kilkakrotne odwracanie probówek.
4. Próbkę pozostawić na 3 min w temp. pokojowej.
Następnie wirować przez 10 min przy 10 000-12 000 RPM.
5. Pobrać górne frakcje (ok. 450 µl supernatantu) do nowej probówki 1,5 ml (nie ma w zestawie).
Należy upewnić się aby supernatant nie zawierał interfazy z niepożądanymi frakcjami DNA.
Dodać po 250 µl izopropanolu.
W przypadku izolacji niskocząsteczkowych frakcji RNA należy zwiększyć całkowitą objętość izopropanolu do 450 µl.
6. Dokładnie wymieszać i nanieść na minikolumnę.
7. Wirować przez 1 min przy 10 000-12 000 RPM.
8. Przenieść minikolumnę do nowej probówki 2 ml (w zestawie).
9. Dodać po 700 µl roztworu płuczącego A1.
10. Wirować przez 1 min przy 10 000-12 000 RPM.
11. Wyjąć minikolumnę z probówki, wylać przesącz i ponownie umieścić w niej minikolumnę.
Dodać po 700 µl roztworu płuczącego A1.
12. Wirować przez 1 min przy 10 000-12 000 RPM.
13. Wyjąć minikolumnę z probówki, wylać przesącz i ponownie umieścić w niej minikolumnę.
Dodać po 200 µl roztworu płuczącego A1.
14. Wirować przez 2 min przy 10 000-12 000 RPM.

15. Przenieść minikolumnę do **nowej** probówki 1,5 ml (nie ma w zestawie).
Do złoza, znajdującego się na dnie minikolumny, dodać po **100 µl wody ultraczystej**.
16. Próbkę pozostawić na **3 min** w **temp. pokojowej**.
Wirować przez **1 min** przy **10 000-12 000 RPM**.
17. 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 Bead-Beat Total RNA Mini 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)

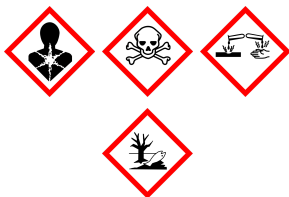
1. Do **100 µl eluatu RNA** dodać po:
 - 1 µl DNAzy** (10 U/µl)
 - 10 µl 10x buforu reakcyjnego** (w zestawie z DNAzą)
2. Inkubować próbkę przez **15 min** w temp. **37 °C**.
3. Inkubować próbkę przez **10 min** w temp. **65 °C** - inaktywacja DNAzy.

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

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

