

Instrukcja

Micro RNA Concentrator

Zestaw do izolacji małowcząsteczkowego RNA. Procedura bez użycia chloroformu.

numer katalogowy	wielkość
035-25C	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 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
Surowica	4
Protokół izolacji małowzrostkowego RNA	5
Protokół odzyskiwania wielkowzrostkowego RNA	6
Informacje Bezpieczeństwa	7

Specyfikacja

format	mikrokolumnna
pojemność złoża	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 15 µl
roztwór elucyjny	woda ultraczysta

Skład

składnik	25 izolacji	przechowywanie
Minikolumny	25 szt.	15–25 °C
Mikrokolumny	25 szt.	15–25 °C
Probówki 2 ml	50 szt.	15–25 °C
Probówki 1,5 ml	25 szt.	15–25 °C
A1 roztwór płuczący	50 ml	15–25 °C
Fenozol Plus	12 ml	4 °C
Izopropanol	20 ml	15–25 °C
Woda ultraczysta	8 ml	15–25 °C

Dodatkowy sprzęt i odczynniki

Niezbędne

- Jałowe probówki 1,5 ml typu Eppendorf
- 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. Prześć do punktu 1. protokołu izolacji małowzasteczkowego RNA.

Hodowle komórkowe

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

Tkanki roślinne / zwierzęce

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

Surowica

1. Przenieść **100 µl** surowicy do próbówki 1,5 ml typu Eppendorf (nie ma w zestawie).
2. Prześć do punktu 1. protokołu izolacji małowzasteczkowego RNA.

Protokół izolacji małowzrostkowego 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**.

4. Próbkę intensywnie wortexować przez **15 s**. Następnie pozostawić na **3 min** w temp. **pokojowej**.

5. Wirować przez **10 min** przy **10 000-12 000 RPM**.

6. Ostrożnie pobrać supernatant (nie pobierać osadu) do **nowej** probówki 1,5 ml (nie ma w zestawie). Dodać po **150 µl izopropanolu**.

W przypadku izolacji z surowicy, dodać po **180 µl izopropanolu**.

7. Całość dokładnie wymieszać i nanieść na **minikolumnę**.

Minikolumna zatrzymuje wielkowzrostkowe RNA, natomiast małowzrostkowe RNA nie jest wiązane przez złożo. W celu odzyskania z minikolumny wielkowzrostkowego RNA należy przejść do protokołu odzyskiwania wielkowzrostkowego RNA (str. 6).

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

8. Usunąć **minikolumnę** z probówki. Do przesączu dodać po **400 µl izopropanolu**.

W przypadku izolacji z surowicy, dodać po **500 µl izopropanolu**.

9. Całość wymieszać przez pipetowanie. Nanieść po **600 µl** mieszaniny na **mikrokolumnę**. Zamknąć **mikrokolumnę** wieczkiem od probówki.

Uwaga: Na mikrokolumnę można nanieść jednorazowo do 600 µl mieszaniny.

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

11. Wyjąć **mikrokolumnę** z probówki, wylać przesącz i ponownie umieścić w niej **mikrokolumnę**. Nanieść pozostałą część mieszaniny. Zamknąć **mikrokolumnę** wieczkiem od probówki.

12. Wirować przez **1 min** przy **10 000-12 000 RPM**.
13. Przenieść **mikrokolumnę** do **nowej** probówki 2 ml (w zestawie).
Dodać po **300 µl** roztworu płuczącego **A1**. Zamknąć **mikrokolumnę** wieczkiem od probówki.
14. Wirować przez **1 min** przy **10 000-12 000 RPM**.
15. Dodać po **300 µl** roztworu płuczącego **A1**. Zamknąć **mikrokolumnę** wieczkiem od probówki.
16. Wirować przez **1 min** przy **10 000-12 000 RPM**.
17. Przenieść **mikrokolumnę** do **nowej** probówki 2 ml (w zestawie).
Dodać po **200 µl** roztworu płuczącego **A1**. Zamknąć **mikrokolumnę** wieczkiem od probówki.
18. Wirować przez **2 min** przy **10 000-12 000 RPM**.
19. Przenieść **mikrokolumnę** do **nowej** probówki 1,5 ml (w zestawie).
Do złoża, znajdującego się na dnie minikolumny, dodać **15-20 µl wody ultraczystej**.
Zamknąć **mikrokolumnę** wieczkiem od probówki.
20. Próbkę pozostawić na **3 min** w **temp. pokojowej**. Wirować przez **1 min** przy **10 000-12 000 RPM**.
21. Mikrokolumnę usunąć, a oczyszczone RNA znajdujące się w probówce przechowywać w **temp. -20 °C, -80 °C**, do czasu dalszych analiz.

Probówka elucyjna połączona jest z wieczkiem długim, elastycznym łącznikiem. Zamykając probówkę, po usunięciu kolumny, należy zwrócić uwagę, aby zamykanie wieczka rozpocząć od strony łącznika. Kliknięcie świadczy o prawidłowym zamknięciu probówki. Inny sposób zamykania może spowodować samoczynne otwieranie probówki.

Protokół odzyskiwania wielkocząsteczkowego RNA

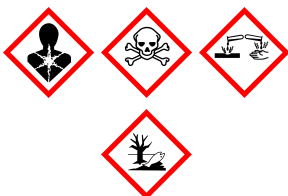
Roztwór płuczący A1, wodę jałową oraz probówki odbieralnikowe 1,5 ml i 2 ml należy zamówić dodatkowo.

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, wylać 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

Fenozol Plus



NIEBEZPIECZEŃSTWO

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.

A1 roztwór płuczący



NIEBEZPIECZEŃSTWO

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.

Izopropanol



NIEBEZPIECZEŃSTWO

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

