

Instrukcja

Total RNA Mini Concentrator

Zestaw do izolacji całkowitego RNA.

numer katalogowy	wielkość
031-25C	25 izolacji
031-100C	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 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
Mrożony lub świeży pojedynczy okaz nicienia (Nemotoda, np. Canoraitidis, Anizakis)	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	mikrokolumna
pojemność złoża	10 µg RNA
wielkość próbek	<ul style="list-style-type: none"> • hodowla bakteryjna, drożdżowa: do 500 µl • krew: do 1 ml • tkanka roślinna, zwierzęca: do 10 mg • hodowla komórkowa: do 1 x 10⁵ • nicienie
objętość elucji	od 15 µl
roztwór elucyjny	woda jałowa

Skład

składnik	25 izolacji	100 izolacji	przechowywanie
Mikrokolumny	25 szt.	100 szt.	temp. pok.
Probówki 1,5 ml	25 szt.	100 szt.	temp. pok.
Probówki 2 ml	50 szt.	200 szt.	temp. pok.
A1 roztwór płuczący	50 ml	200 ml	temp. pok.
Fenozol	25 ml	100 ml	4 °C
Izopropanol	12,5 ml	30 ml	temp. pok.
Woda jałowa	8 ml	15 ml	temp. pok.

Dodatkowy sprzęt i odczynniki

Niezbędne

- Jałowe probówki 1,5 ml typu Eppendorf
- Chloroform
- 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 / drożdże

1. Odwirować **100-500 µl** świeżej nocnej hodowli bakteryjnej i usunąć supernatant.
2. Przejść do punktu 1. protokołu izolacji.

Hodowle komórkowe

1. Odwirować komórki w ilości **1 x 10⁵-5 x 10⁶** i usunąć supernatant.
2. Przejść do punktu 1. protokołu izolacji.

Tkanki roślinne / zwierzęce

1. Tkanki (**1-10 mg**) należy rozetrzeć w moździerzu z ciekłym azotem..
2. Przenieść sproszkowane tkanki do próbówki 1,5 ml typu Eppendorf (nie ma w zestawie).
3. Przejść do punktu 1. protokołu izolacji.

Krew świeża (nie mrożona)

1. Do **maksymalnie 1 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.

Mrożony lub świeży pojedynczy okaz nicienia (*Nemotoda*, np. *Canoraitidis*, *Anizakis*)

1. Umieścić pojedynczy okaz nicienia na sterylnej powierzchni (np. mała szalka Petriego) i pociąć sterylnym ostrzem na 3-4 kawałki. Przenieść cały materiał do próbówki 1,5 ml typu Eppendorf (nie ma w zestawie).
2. Przejść do punktu 1. protokołu izolacji.

Protokół izolacji RNA

1. Do przygotowanej próbki dodać po **800 µl fenozolu** i mieszać przez pipetowanie, aż do całkowitej lizy komórek.

Fenozol inaktywuje endogenne RNAzy. Próby zawieszane 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. **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).
Dodać po **250 µl izopropanolu**.

6. Dokładnie wymieszać i nanieść na mikrokolumnę. Zamknąć mikrokolumnę wieczkiem od probówki.

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

8. Przenieść mikrokolumnę do **nowej** probówki 2 ml (w zestawie).
Dodać po **700 µl** roztworu płuczającego **A1**. Zamknąć mikrokolumnę wieczkiem od probówki.

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

10. Wyjąć mikrokolumnę z probówki, wylać przesącz i ponownie umieścić w niej mikrokolumnę.
Dodać po **700 µl** roztworu płuczającego **A1**. Zamknąć mikrokolumnę wieczkiem od probówki.

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

12. Przenieść mikrokolumnę do **nowej** probówki 2 ml (w zestawie).
Dodać po **200 µl** roztworu płuczającego **A1**. Zamknąć mikrokolumnę wieczkiem od probówki.

13. Wirować przez **2 min** przy **12 000 RPM**.

14. Przenieść mikrokolumnę do **nowej** probówki 1,5 ml (w zestawie). Do złoża, znajdującego się na dnie mikrokolumny, dodać po **15-20 µl wody jałowej**. Zamknąć mikrokolumnę wieczkiem od probówki.
15. Próbkę pozostawić na **2 min** w **temp. pokojowej**. Wirować przez **1 min** przy **12 000 RPM**.
16. Mikrokolumnę usunąć, a oczyszczone RNA znajdujące się w probówce przechowywać w temp. -20 °C, -80 °C, do czasu dalszych analiz.

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

Doczyszczanie eluatu RNA (opcjonalnie)

Zestaw Total RNA Mini Concentrator 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:

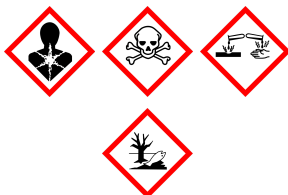
Zastosowanie DNAzy (nr kat. 1009-10, 1009-100)

1. Do **20 µl eluatu RNA** dodać po:
 - 0,2 µl DNAzy** (10 U/µl)
 - 2 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 jałowej.

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 sennaści 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 sennaści 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

