

## Syngen Blood/Cell RNA Maxi Kit (24)

### Co potrzeba:

1. Probówki 50 ml do wirowania przy 5.000 rpm
2. 70% etanol
3. 96-98% etanol
4. B-merkapttoetanol
5. Opcjonalnie: roztwór DNazy I o stężeniu 2KU/ml w 1x buforze reakcyjnym (150mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris HCl, pH 7.5)
6. Do izolacji z bakterii: roztwór lizozymu (20 mg/ml lizozymu; 20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 2mM EDTA; 1,2% Triton)
7. Do izolacji z drożdży: bufor sorbitolowy do lizy enzymatycznej (20 mg/ml litykazy lub zymolazy; 1M sorbitolu, 100 mM EDTA; 0,1% β-merkapttoetanolu). Przygotuj bufor sorbitolowy tuż przed użyciem.

### Zanim zaczniesz:

1. Rozcieńcz bufor RLE – jest on najczęściej dostarczany jako 10x koncentrat, należy go rozcieńczyć wodą
2. Przygotuj porcję buforu RLK-BME – na każdy 1 ml potrzebnej objętości buforu RLK dodaj 10 ul B-merkapttoetanolu i zamieszaj, nie wolno dodawać B-ME od razu do całej butelki buforu RLK, o ile nie zostanie zużyta od razu
3. Przygotuj bufor RP2 poprzez dodanie 96-98% etanolu w ilości podanej na butelce

## **PROTOKÓŁ 1 – IZOLACJA Z LUDZKIEJ KRWI**

1. Pobierz świeżą ludzką krew na antykoagulant.
2. Dodaj 3-10 ml krwi do odpowiedniej wielkości probówki wirówkowej (falkonka 15 ml lub 50 ml, nie dostarczona).
3. Dodaj 5 objętości rozcieńczonego buforu RLE i spokojnie odwracaj probówkę (np. Dodaj 25 ml rozcieńczonego buforu RLE do 5 ml próbki krwi).
4. Inkubuj w temperaturze pokojowej przez 5 minut. Podczas inkubacji zworteksuj krótko 2 razy.
5. Wiruj przez 5 minut przy 500 x g, aby leukocyty stworzyły pelet. Wylej supernatant.
6. Dodaj 2 objętości rozcieńczonego buforu RLE do peletu i krótko worteksuj (zadbaj o to, aby pelet się rozpuścił).
7. Wiruj przez 5 minut przy 500 x g, aby leukocyty ponownie stworzyły pelet. Wylej supernatant.
8. Dodaj 12,5 ml buforu RLK-BME do peletu komórkowego i wortkesuj energicznie (zadbaj o to, aby pelet się rozpuścił). Inkubuj w temperaturze pokojowej przez 3 minuty, aż komórki całkowicie zlizują. W razie potrzeby przedłuż inkubację z mieszaniem.

9. Umieść Kolumienkę klarującą KL w czystej 50 ml probówce (falkonka 50 ml, nie dostarczona). Nanieś na Kolumienkę KL cały lizat i wiruj przy pełnej szybkości 3500-5000 rpm przez 5 minut.
10. Przenieś klarowny przesącz do czystej 50 ml probówki (falkonka 50 ml, nie dostarczona) i oszacuj jego objętość. Uważaj, aby nie naruszyć ewentualnie powstałego peletu.
11. Dodaj do przesączu 1 objętość 70% etanolu i wymieszaj poprzez worteksowanie.



12. Umieść Kolumnę R w czystej 50 ml probówce (falkonka 50 ml, nie dostarczona) i przenieś 14 ml próbki (wraz z ewentualnym precypitatem) na tę kolumnę. Wiruj przy pełnej szybkości 3500-5000 rpm przez 5 minut. Wylej przesącz, nie wyrzucaj probówki.

Jeśli objętość próbki była większa niż 14 ml, powtórz krok 12 aż do nałożenia całej próbki na kolumnę.

13. Dodaj 7ml Buforu RP1 w celu przemycia Kolumny R. Wiruj przy pełnej szybkości 3500-5000 rpm przez 2 minuty. Wylej przesącz, nie wyrzucaj probówki.
14. Opcjonalnie: Nałóż 1 ml roztworu DNazy I na centralny punkt membrany Kolumny R. Inkubuj na stole przez 10 min.
15. Dodaj 7ml Buforu RP1 w celu przemycia Kolumny R. Wiruj przy pełnej szybkości 3500-5000 rpm przez 2 minuty. Wylej przesącz, nie wyrzucaj probówki.
16. Przemyj Kolumnę R dwukrotnie poprzez dodanie 12,5 ml Buforu RP2 i wirowanie przy pełnej szybkości 3500-5000 rpm przez 2 minuty. Wylej przesącz, nie wyrzucaj probówki.
17. Wiruj przy maksymalnej szybkości 3500-5000 rpm przez 10 minut w celu osuszenia Kolumny R.
18. Umieść Kolumnę R w Probówce Elucyjnej (50 ml probówka, dostarczona).
19. Dodaj 500-1000 µl wody wolnej od RNaz na centralny punkt membrany Kolumny R i pozostaw Kolumnę przez 5 minut na stole. Upewnij się, że woda została nałożona na środek membrany i została zaabsorbowana całkowicie.
20. Wiruj przy pełnej szybkości przez 5 minut w celu elucji RNA.
21. Przechowuj RNA w -70°C.

## **PROTOKÓŁ 2 – IZOLACJA Z KOMÓREK ZWIERZĘCYCH**

1. Zbierz  $5 \times 10^8$  komórek rosnących w zawiesinie poprzez wirowanie przy 300 x g przez 5 minut. Wylej supernatant.  
Komórki rosnące w monowarstwie zbierz trypsyną i przepłucz w PBS, zwirowuj przy 300 x g przez 5 minut, wylej supernatant.
2. Dodaj 14 ml Buforu RLK-BME do peletu komórkowego i wortkesuj energicznie (zadbaj o to, aby pelet się rozpuścił). Inkubuj w temperaturze pokojowej przez 5 minut, aż komórki całkowicie zlizują. W razie potrzeby przedłuż inkubację z mieszaniem.
3. Umieść Kolumienkę klarującą KL w czystej 50 ml probówce (falkonka 50 ml, nie dostarczona). Nanieś na Kolumienkę KL cały lizat i wiruj przy pełnej szybkości 3500-5000 rpm przez 5 minut.
4. Przenieś klarowny przesącz do czystej 50 ml próbówki (falkonka 50 ml, nie dostarczona) i oszacuj jego objętość. Uważaj, aby nie naruszyć ewentualnie powstałego peletu.
5. Dodaj do przesączu 1 objętość 70% etanolu i wymieszaj poprzez worteksowanie.
6. Przejdź do protokołu 1 do miejsca oznaczonego strzałką.

## **PROTOKÓŁ 3 – IZOLACJA RNA Z BAKTERII**

1. Przenieś do  $5 \times 10^{10}$  komórek bakteryjnych do próbówki wirówkowej (nie dostarczona). Wiruj przy 3,000 x g przez 5 minut i odrzuć supernatant.
2. Zawieś pelet w 1 ml roztworu lizozymu (nie dostarczony) i inkubuj w 37°C przez 10 minut.
3. Dodaj 14 ml Buforu RLK-BME do peletu komórkowego i wortkesuj energicznie (zadbaj o to, aby pelet się rozpuścił). Inkubuj w temperaturze pokojowej przez 5 minut, aż komórki całkowicie zlizują. W razie potrzeby przedłuż inkubację z mieszaniem.
4. Wiruj przy maksymalnej szybkości przez 5 minut aby osadzić niestrawione pozostałości. Pobierz klarowny supernatant do nowej 50 ml próbówki (nie dostarczona).
5. Dodaj do przesączu 1 objętość 70% etanolu i wymieszaj poprzez worteksowanie.
6. Przejdź do protokołu 1 do miejsca oznaczonego strzałką.

#### **PROTOKÓŁ 4 – IZOLACJA RNA Z DROŻDŻY**

1. Przenieś do  $5 \times 10^9$  komórek drożdży do 50 ml probówki wirówkowej (nie dostarczona). Wiruj przy  $500 \times g$  w  $4^\circ\text{C}$  przez 5 minut i odrzuć supernatant.
2. Zawieś pelet w 2,5 ml buforu sorbitolowego (nie dostarczony). Inkubuj w  $30^\circ\text{C}$  przez 30 minut.
3. Wiruj przy  $500 \times g$  w temperaturze pokojowej przez 5 minut i odrzuć supernatant.
4. Dodaj 14 ml Buforu RLK-BME do peletu komórkowego i wortkesuj energicznie (zadbaj o to, aby pelet się rozpuścił). Inkubuj w temperaturze pokojowej przez 5 minut, aż komórki całkowicie zlizują. W razie potrzeby przedłuż inkubację z mieszaniem.
5. Wiruj przy maksymalnej szybkości przez 5 minut aby osadzić niestrawione pozostałości. Pobierz klarowny supernatant do nowej 50 ml probówki (nie dostarczona).
6. Dodaj do przesącza 1 objętość 70% etanolu i wymieszaj poprzez worteksowanie.
7. Przejdź do protokołu 1 do miejsca oznaczonego strzałką.