

## **Syngen Plant & Wood RNA Mini & Maxi Kit**

Zestawy do izolacji całkowitego RNA z próbek:

- świeżych tkanek roślinnych
- mrożonych tkanek roślinnych
- tkanek roślinnych zdrewniałych (tylko Mini)
- komórek z hodowli w zawiesinie

**Instrukcja dla użytkownika, w. 2015.09.1**

## Spis treści

Informacje wstępne	3
Ograniczenia	3
Zawartość zestawów	4
Przechowywanie	5
Sprzęt i odczynniki potrzebne do wykonania procedury, a niedostarczone z zestawem	5
Przygotowanie odczynników przed pierwszym użyciem	6
Materiał wyjściowy i wydajność RNA	7
Homogenizacja	9
Ogólne wytyczne do pracy z RNA	10
Ogólne wytyczne dotyczące obsługi zestawów Syngen	12
Elucja RNA	13
Trawienie DNA na kolumieńce	13
Protokoły do zestawu Syngen Plant RNA Mini	
<b>Protokół 1: Izolacja RNA z tkanek roślinnych świeżych lub mrożonych</b>	<b>14</b>
<b>Protokół 2: Izolacja RNA z tkanek roślinnych świeżych lub mrożonych bogatych w lepkie metabolity, jak bielmo ziarna kukurydzy</b>	<b>18</b>
<b>Protokół 3: Izolacja RNA z hodowli komórek roślinnych w zawiesinie bogatych w lepkie metabolity, oraz typowych</b>	<b>20</b>
Protokoły do zestawu Syngen Wood RNA Mini	
<b>Protokół 4: Izolacja RNA z tkanek roślinnych zdrewniałych</b>	<b>22</b>
Protokoły do zestawu Syngen Plant RNA Maxi	
<b>Protokół 5: Izolacja RNA z tkanek roślinnych świeżych lub mrożonych</b>	<b>24</b>
<b>Protokół 6: Izolacja RNA z tkanek roślinnych świeżych lub mrożonych bogatych w lepkie metabolity, jak bielmo ziarna kukurydzy</b>	<b>28</b>
<b>Protokół 7: Izolacja RNA z hodowli komórek roślinnych w zawiesinie bogatych w lepkie metabolity, oraz typowych</b>	<b>30</b>
Określanie ilości i integralności wyizolowanego RNA	32
Pomiar stężenia wyizolowanego RNA	33
Samodzielne rozwiązywanie problemów	34
Przewodnik po zestawach serii Syngen®	36

Dziękujemy za wybór zestawu serii Syngen RNA i okazane nam zaufanie. Produkty serii Syngen RNA to wysokiej jakości zestawy odczynników do izolacji całkowitego RNA z szerokiej gamy próbek takich jak krew, tkanki, komórki i inne. Zastosowana technologia wykorzystuje technikę chromatografii na złożu krzemionkowym zamkniętym w membranie kolumnienki. Uzyskany materiał genetyczny odznacza się wysoką czystością, wymaganą do zastosowań między innymi w technikach real-time PCR i microarray.

Niniejsza instrukcja dla użytkownika zawiera szczegółowe wytyczne dotyczące stosowania zestawów Syngen Plant RNA Mini, Syngen Wood RNA Mini oraz Syngen Plant RNA Maxi. Rozdziały wstępne pomogą użytkownikowi przygotować się do wykonania procedur opisanych w dalszych rozdziałach. Zalecamy uważne przeczytanie całej instrukcji przed przystąpieniem do pracy.

Przy użyciu produktu powinna być zachowana uwaga i ostrożność. Zalecamy użytkownikom stosowanie się do zasad GLP (Dobrej Praktyki Laboratoryjnej). Między innymi należy stosować fartuch laboratoryjny, rękawiczki jednorazowe i okulary ochronne.

Aby uzyskać więcej informacji o substancjach niebezpiecznych, które mogą być zawarte w niektórych składnikach zestawów, prosimy przeczytać Karty Charakterystyki Substancji Niebezpiecznych (MSDS) dostępne u producenta.

W przypadku pytań pozostajemy do Państwa dyspozycji. Życzymy sukcesów w pracy z zestawami Syngen.

Zespół Syngen Biotech

## **Ograniczenia**

Zestawy serii Syngen RNA są przeznaczone wyłącznie do użytku laboratoryjnego. Nie będą uwzględniane żadne roszczenia wynikające z użycia zestawu do diagnozowania lub leczenia chorób.

## Zawartość zestawów

<b>Syngen Plant RNA Mini Kit</b>	<b>SY341010</b>	<b>SY341011</b>	<b>SY341012</b>
<b>Liczba izolacji</b>	<b>50</b>	<b>100</b>	<b>300</b>
Kolumny R	50	100	300
Kolumny klarujące KL	50	100	300
Bufor lizujący RLR	30 ml	60 ml	170 ml
Bufor lizujący RLK	30 ml	60 ml	170 ml
Bufor płuczający RP1	30 ml	60 ml	170 ml
Bufor płuczający RP2 – koncentrat	20 ml	35 ml	2 x 50 ml
Woda wolna od RNaz	6 ml	6 ml	2 x 8 ml
Probówki do elucji 1,5 ml	50	100	300
Probówki do płukania 2 ml	100	200	600

<b>Syngen Wood RNA Mini Kit</b>	<b>SY341030</b>	<b>SY341031</b>
<b>Liczba izolacji</b>	<b>50</b>	<b>100</b>
Kolumny R	50	100
Kolumny klarujące KL	50	100
Bufor lizujący RLR1	30 ml	60 ml
Bufor lizujący RLR2	4 ml	8 ml
Bufor płuczający RP1	30 ml	60 ml
Bufor płuczający RP2 – koncentrat	15 ml	35 ml
Woda wolna od RNaz	6 ml	6 ml
Probówki do płukania 2 ml	50	100

<b>Syngen Plant RNA Maxi Kit</b>	<b>SY341010</b>	<b>SY341011</b>
<b>Liczba izolacji</b>	<b>10</b>	<b>24</b>
Kolumny R	10	24
Kolumny klarujące KL	10	24
Bufor lizujący RLR	60 ml	150 ml
Bufor lizujący RLK	60 ml	150 ml
Bufor płuczający RP1	45 ml	120 ml
Bufor płuczający RP2 – koncentrat	12,5 ml	50 ml
Woda wolna od RNaz	6 ml	30 ml

## **Przechowywanie**

Kolumnienki R, a także wszystkie roztwory, powinny być przechowywane w temperaturze pokojowej (15-25°C), chyba że na butelce określono inaczej.

Przechowywanie kolumnienek R w wyższej temperaturze jest zabronione.

## **Sprzęt i odczynniki potrzebne do wykonania procedury, a niedostarczone z zestawem**

Do wszystkich protokołów:

- Etanol (96-100%)
- Etanol 70%
- $\beta$ -merkптоetanol (B-ME)
- Statyw
- Sterylne końcówki do pipet z filtrem
- Pipety automatyczne nastawne
- Worteks
- Rękawiczki beztalkowe
- Moździerz
- Ciekły azot
- Homogenizator elektryczny (opcjonalnie)
- PBS wolny od RNaz (opcjonalnie)
- Roztwór DNazy I o stężeniu 0,5 U/ul w buforze o składzie 1M NaCl, 10mM MnCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris-HCl, pH 7.0 at 25°C (opcjonalnie)
- Pokruszony lód (opcjonalnie)

Do izolacji RNA z komórek w hodowli w zawieszynie:

- Probówki wirówkowe 1.5 lub 2.0 ml z wieczkiem (ependorfki)
- PBS wolny od RNaz
- Narzędzia do liczenia komórek

Do zestawu Syngen Plant RNA Mini:

- Probówki wirówkowe 1.5 lub 2.0 ml z wieczkiem (ependorfki)
- Mikrowirówka 10.000 x g (12.000-14.000 rpm)

Do zestawu Syngen Wood RNA Mini:

- Probówki wirówkowe 1.5 lub 2.0 ml z wieczkiem (eppendorfki)
- Mikrowirówka 10.000 x g (12.000-14.000 rpm) z chłodzeniem 5°C
- Łaźnia wodna, blok grzejny lub termomikser (zalecany) na 70°C

Do zestawu Syngen Plant RNA Maxi:

- Probówki wirówkowe 15 ml zakręcane (falkonki 15)
- Probówki wirówkowe 50 ml zakręcane (falkonki 50)
- Mikrowirówka 4500-6000 rpm z rotorem wychyłowym (zalecany) z chłodzeniem do 4°C
- Łaźnia wodna, blok grzejny lub termomikser (zalecany) na 70°C

## Przygotowanie odczynników przed pierwszym użyciem

Bufor płuczący

Bufor płuczący RP2 jest dostarczany jako koncentrat. Przed pierwszym użyciem dodaj do nich odpowiednią ilość etanolu (96-100%) i starannie wymieszaj. Poniższa tabela przedstawia sposób przygotowania buforów.

<b>Syngen Plant RNA Mini Kit</b>	<b>SY341010</b>	<b>SY341011</b>	<b>SY341012</b>
Liczba izolacji	50	100	300
Objętość etanolu, jaką należy dodać do koncentratu buforu płuczącego RP2	80 ml	140 ml	200 ml (do każdej butelki)

<b>Syngen Wood RNA Mini Kit</b>	<b>SY341030</b>	<b>SY341031</b>
Liczba izolacji	50	100
Objętość etanolu, jaką należy dodać do koncentratu buforu płuczącego RP2	60 ml	140 ml

<b>Syngen Plant RNA Maxi Kit</b>	<b>SY341010</b>	<b>SY341011</b>
Liczba izolacji	10	24
Objętość etanolu, jaką należy dodać do koncentratu buforu płuczącego RP2	50 ml	200 ml

Bufory po dodaniu etanolu powinny być szczelnie zamknięte i przechowywane w temperaturze pokojowej. Przed rozpoczęciem procedury zawsze wymieszaj rozpuszczone bufory przez obrócenie butelki kilka razy.

### **Materiał wyjściowy i wydajność RNA**

Zestawy Syngen Plant RNA Mini i Maxi służą do izolacji całkowitego RNA z tkanek roślinnych świeżych i mrożonych oraz hodowli komórek roślinnych. Zestawy Syngen Plant W RNA Mini służy do izolacji całkowitego RNA z tkanek roślinnych zdrewniałych.

Wyizolowany RNA ma wysoki stopień czystości, dzięki czemu może być użyty bezpośrednio do dalszych analiz, jak reakcje enzymatyczne z detekcją w czasie rzeczywistym, mikromacierze i inne procedury wymagające RNA wysokiej jakości.

Prawidłowe dobranie ilości materiału wyjściowego jest kluczem do wydajnej izolacji. Poniższa tabela określa zalecane maksymalne ilości poszczególnych rodzajów próbek oraz typowe wydajności RNA.

#### **Syngen Plant RNA Mini Kit / Syngen Wood RNA Mini Kit**

<b>Materiał wyjściowy</b>	<b>Maksymalna ilość na 1 izolację</b>	<b>Typowa wydajność RNA</b>
Świeże liście	100 mg	5-30 ug
Mrożone liście	100 mg	5-30 ug
Komórki w hodowli	$1 \times 10^7$	5-30 ug

#### **Syngen Plant RNA Maxi Kit**

<b>Materiał wyjściowy</b>	<b>Maksymalna ilość na 1 izolację</b>	<b>Typowa wydajność RNA</b>
Świeże liście	500-1000 mg	50-300 ug
Mrożone liście	500-1000 mg	50-300 ug
Komórki w hodowli	$5-10 \times 10^7$	50-300 ug

Do izolacji najlepiej nadają się młode liście i igły, gdyż mają one największy stosunek ilości komórek do wagi.

Tkanki świeże powinny być przekazane do izolacji natychmiast po pobraniu. W przeciwnym wypadku należy je zamrozić w ciekłym azocie i przechowywać w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Przy pomocy zestawów Syngen Plant RNA Mini i Maxi można izolować RNA z tkanek bogatych w lepkie drugorzędowe metabolity, jak np. bielmo ziarna kukurydzy. W takim przypadku zamiast buforu lizującego komórki RLK stosuje się bufor lizujący roślinny RLR.

Komórki hodowane w zawiesinie należy oczyścić z pozostałości pożywki przed przekazaniem do izolacji. W tym celu komórki płucze się w PBS wolnym od RNaz i separuje przez odwirowanie.

Nie należy przekraczać maksymalnej ilości na jedną izolację podanej w tabeli. Za duża zawartość komórek w próbce spowoduje niewydajną lizę, za duża zawartość RNA – przeładowanie kolumny. W obu sytuacjach wydajność izolacji znacząco spadnie. Jeśli nie dysponujemy wiedzą na temat zawartości RNA w używanym materiale startowym, zalecane jest zmniejszenie stosowanej ilości 2- lub 3-krotnie względem dozwolonej ilości maksymalnej.

Nie posiadając wagi można określić ilość tkanki pobranej do izolacji na podstawie powierzchni fragmentu liścia. Okrągły wycinek świeżego liścia o średnicy 1,5 cm waży od 25 do 75 mg. Wycinek świeżego liścia o wymiarach 4x4 cm waży od 230 do 700 mg.

Nie posiadając komory do liczenia komórek hodowanych w zawiesinie można określić ilość materiału pobranego do izolacji stosując wagę. W tym celu komórki należy odwirować i otrzymany pellet zważyć, jak świeżą tkankę.



## Homogenizacja

W procesie izolacji RNA z tkanek roślinnych homogenizacja jest kluczowym etapem, mającym wyraźny wpływ na wydajność izolacji.

Homogenizację należy wykonać poprzez ucieranie świeżej tkanki w ciekłym azocie na jednolity proszek. Następnie dokładnie utarty drobny proszek pobiera się do izolacji. Ten sposób homogenizacji jest wystarczający dla większości miękkich tkanek. Utarty proszek można także zamrozić.

Tkanki mrożone homogenizuje się bez rozmrażania poprzez ucieranie w ciekłym azocie. Alternatywnie można zastosować homogenizator elektryczny, jak opisano dalej.

Alternatywą dla ucierania w ciekłym azocie są homogenizatory elektryczne typu ostrzowego lub kulowego. W takim przypadku homogenizację należy wykonać zgodnie z zaleceniami producenta homogenizatora.

Przy pomocy homogenizatora ostrzowego najczęściej tkankę świeżą lub mrożoną homogenizuje się w ciekłym azocie, lub ewentualnie świeżą tkankę można homogenizować w pierwszym buforze lizującym przed dodaniem enzymu.

Przy pomocy homogenizatora kulowego najczęściej świeżą lub mrożoną tkankę homogenizuje się po zamrożeniu w ciekłym azocie, zamiennie świeżą tkankę można homogenizować w pierwszym buforze lizującym przed dodaniem enzymu.

W żadnym wypadku nie zalecamy homogenizacji mrożonego materiału w buforze lizującym.

Stosując homogenizatory elektryczne należy rozdrobnić wstępnie tkankę przy pomocy nożyczek lub skalpela.

Po wykonaniu homogenizacji metodą inną niż ucieranie w ciekłym azocie, rozpocznij protokół od miejsca oznaczonego białą strzałką. ➡

Zestawy Syngen Plant RNA Mini i Maxi zawierają kolumny klarujące KL. Nie są to kolumny homogenizujące, a jedynie klarujące lizat. Nie zastępują one wydajnej homogenizacji próbki przed izolacją.

## Ogólne wytyczne do pracy z RNA

Zarówno kwas rybonukleinowy (RNA) jak i rybonukleazy (RNazy) są powszechne w środowisku. Jednak poza komórką lub w martwej komórce nie występują mechanizmy chroniące RNA przed RNazami, zatem RNA ulega bardzo szybkiej degradacji. Z tego względu w pracowni RNA konieczne jest rygorystyczne przestrzeganie kilku podstawowych zasad, które opisano poniżej.

Przygotowanie stanowiska pracy:

1. W pomieszczeniu nie powinno być upalnie, temperatura optymalna to 15-25 stopni C.
2. Nadmuch klimatyzacji nie powinien być skierowany w stronę stołów roboczych i nie może powodować uczucia podmuchu lub przeciągu.
3. Nad blatem nie powinny znajdować się żadne przedmioty, do których ktoś mógłby sięgać podczas naszej pracy, w tym kwiatki, półki, telefon itd.
4. Okna i drzwi należy pozamykać, pomieszczenie do pracy z RNA nie może być przechodnie.
5. Blat roboczy powinien być kompletnie zaopatrzony, tak aby wykonać całą procedurę bez wstawania od stołu i przenoszenia próbek.
6. Wszystkie blaty robocze i przedmioty (pipety, statywy itd.) należy umyć roztworem detergentu zawierającego SDS (np. Ludwik), następnie przetrzeć 70% EtOH oraz na koniec użyć środka do usuwania RNaz najlepiej w sprayu (np. RNase Away firmy Sigma Aldrich lub Invitrogen, RNaseZAP firmy Sigma Aldrich).

7. Wszystkie przedmioty do pracy z RNA powinny służyć wyłącznie do pracy z RNA i nie mogą być używane do innych celów. Dotyczy to w szczególności pipet, plastików i odczynników.

#### Ubranie:

1. Fartuch roboczy powinien być czysty, niedopuszczalne jest używanie fartucha noszonego uprzednio w zwierzętarni lub pożywkarni.
2. Pracujemy wyłącznie w rękawiczkach bezkalkowych, talk „zabija” RNA.
3. Włosy należy spiąć. Najlepiej stosować czepek ochronny.
4. Należy stosować okulary ochronne.

#### Praca:

1. Do pracy stosujemy wyłącznie jednorazowe plastikowe pojemniki wolne od RNaz, najlepiej firmowo zapakowane w jałowe pudełka.
2. Wszystkie tipsy muszą mieć filtr.
3. Worek z probówkami przecieramy RNase Away (do sucha) przed położeniem go na blacie. Nie wkładamy ręki do worka z probówkami. Wysypujemy kilka probówek na blat i chwytając za ich dół zamykamy je i ustawiamy w statywie.
4. Nie należy przenosić niczego (np. ręki z pipetą) nad otwartymi probówkami.
5. Nie wolno nachylać się nad otwartymi probówkami.
6. Nie dotykamy niczego, co nie jest wolne od RNaz, w tym również swojej twarzy, telefonu komórkowego itd. Jeśli musimy czegoś dotknąć, później należy zmienić rękawiczkę.
7. Zawsze przed otwarciem próbówki należy ją krótko zwirować w celu usunięcia kropli z wieczka.

## **Ogólne wytyczne dotyczące obsługi zestawów Syngen RNA**

Kolumienki Mini pasują do większości probówek wirówkowych o pojemności 1.5 ml lub 2 ml (tzw. eppendorfek).

Kolumienki Maxi pasują do większości probówek wirówkowych o pojemności 50 ml (tzw. falkonek 50).

Wszystkie wirowania w zestawach Mini wykonywane są z pełną prędkością (ok. 14.000 rpm lub 10.000 x g), aczkolwiek możliwe jest zastosowanie niższych prędkości (8000 rpm lub 6000 x g), gdy użytkownik nie posiada szybszej wirówki lub przeszkadza mu hałas – w takim przypadku należy proporcjonalnie wydłużyć wirowanie. Zaleca się jednak, aby przynajmniej wszystkie drugie kroki płukania, kroki dosuszania membrany oraz elucja odbywały się przy najwyższych obrotach wirówki. Wszystkie wirowania należy przeprowadzać w temperaturze pokojowej, chyba że w protokole zaznaczono inaczej.

Wirowania w zestawach Maxi wykonywane są z prędkością 4500-6000 rpm w temperaturze pokojowej. Zalecamy stosowanie rotora wychyłowego, a nie stałokątowego.

Podczas obsługi zestawów Syngen zalecamy, aby ograniczać dotykanie membrany w kolumienkach końcówką pipety, przed wirowaniem zamykać wieczka kolumienek i probówek, a z wirówki kolumienki wyjmować razem z probówkami – dopiero po ustawieniu w statywie można wyjąć kolumienkę z probówki. Ponadto, dla ograniczenia kontaminacji pomiędzy próbkami (cross-contamination), zalecamy aby utrzymywać w czystości rękawiczki ochronne, używać końcówek do pipet z filtrem i po każdym worteksovaniu lub mieszaniu zwirowywać probówki, aby usunąć krople ze spodu wieczek.

## Elucja RNA

Typowa objętość elucji w zestawach Mini wynosi 50 ul lub 1000 ul w zestawach Maxi i jest wystarczająca dla zdecydowanej większości próbek.

Elucję z kolumny należy wykonywać dostarczoną wodą wolną od RNaz. Ewentualnie można użyć własnej wody wolnej od RNaz o pH=7.5-9.0. Woda o innym pH może znacznie ograniczyć wydajność elucji lub nawet uniemożliwić ją. Zanieczyszczenie RNazami uniemożliwi analizę wyizolowanego materiału.


W przypadku materiału wyjściowego bardzo bogatego w RNA, można wykonać dwie elucje – każdą o objętości podanej dla pojedynczej elucji. W niektórych przypadkach druga elucja pozwala na odzyskanie dodatkowych 40% RNA.

Wyizolowany RNA należy przechowywać zamrożony w temperaturze od -70 do -86°C. Dobrym rozwiązaniem jest rozporcjowanie izolatu przed zamrożeniem.

## Trawienie DNA na kolumiencie

Zestawy serii Syngen RNA pozwalają na otrzymanie RNA o bardzo wysokiej czystości. Niemniej możliwe jest przedostanie się pewnej ilości DNA z próbki do izolatu.

W przypadku stosowania procedur wymagających RNA wolnego od DNA, zalecamy wykonanie trawienia DNA na kolumiencie przed etapem elucji. Taki sposób trawienia jest bardzo wygodny, nie wymaga dodatkowych etapów inaktywacji DNazy i zapobiega obecności enzymu w wyizolowanym RNA.

Trawienie DNazą na kolumiencie zaznaczono w protokołach kraciastą strzałką. 

## **Protokół 1** **do zestawu Syngen Plant RNA Mini**

### **Izolacja RNA z tkanek roślinnych świeżych lub mrożonych**

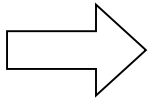
Zanim zaczniesz

- Jeżeli pierwszy raz używasz zestawu Syngen Plant RNA Mini Kit, najpierw przeczytaj wszystkie rozdziały poprzedzające protokoły.
- Upewnij się, że przygotowałeś wszystkie potrzebne odczynniki i sprzęty opisane w rozdziale „Sprzęt i odczynniki potrzebne do wykonania procedury, a niedostarczone z zestawem”.
- Upewnij się, że bufor płuczący został przygotowany zgodnie z instrukcjami zawartymi w rozdziale „Przygotowanie odczynników przed pierwszym użyciem”.
- Jeżeli w którymś buforze wytrącił się precypitat, rozpuść go inkubując w 37°C przez kilka minut i mieszając.
- Doprowadź wszystkie bufony do temperatury pokojowej (15-25°C).
- Dokładnie wymieszaj próbki i umieść je na lodzie (opcjonalnie).
- Przygotuj potrzebną porcję buforu RLK-BME używając 10 ul B-ME na każdy 1 ml buforu RLK. Nie wolno dodawać B-ME do całej butelki buforu RLK, o ile cała nie zostanie zużyta na raz.

## Procedura

1. Umieść odmierzoną ilość (maksymalnie 100 mg) świeżej lub mrożonej tkanki roślinnej w moździerzu z ciekłym azotem.  
Przy pomocy tłuczka rozetrzyj tkankę na drobny pył.  
Przesyp pył z ewentualnymi resztkami ciekłego azotu do probówki 1,5 ml lub 2,0 ml z wieczkiem (nie dostarczono).  
Pozwól na odparowanie pozostałości ciekłego azotu z probówki.

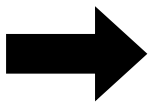
Homogenizację można wykonać inaczej. Więcej szczegółów znajdziesz w rozdziale „Homogenizacja”.



2. Dodaj 500 ul przygotowanego buforu RLK-BME i zawieś proszek mieszając na wortexie, a następnie zwortexuj energicznie.  
Inkubuj w temperaturze pokojowej przez 5 minut.  
Zwiruj probówki, aby usunąć krople z wieczka.

3. Umieść kolumnkę klarującą KL w probówce 2 ml.  
Przenieś zawartość probówki z kroku 2 na kolumnkę.  
Zamknij wieczko i wiruj przez 2 minuty z maksymalną prędkością.  
Usuń kolumnkę klarującą KL ze stałymi cząstkami lizatu.

4. Przenieś przesącz (sklarowany lizat) do nowej probówki 1,5 ml lub 2,0 ml z wieczkiem (nie dostarczono).  
Dodaj 1 objętość etanolu (70%), zamknij i zmieszaj na wortexie.  
Zwiruj probówki, aby usunąć krople z wieczka.

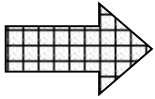


5. Umieść kolumnkę R w probówce 2 ml do płukania.  
Przenieś całą zawartość probówek z kroku 4 na kolumnkę.  
Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością.

Jeśli objętość lizatu w punkcie 4 jest większa niż 700 ul, przenieś na kolumnę tylko 700 ul, wiruj, usuń przesącz (nie wyrzucaj probówki) i powtarzaj, aż do nałożenia całego lizatu na kolumnę.

6. Przenieś kolumnkę do nowej probówki 2ml (nie dostarczono) i wyrzuć przesącz razem ze starą probówką.

Otwórz kolumienkę, dodaj 250 ul buforu RP1.  
Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością.  
Wylej przesącz, nie wyrzucaj probówki.



Jeśli wymagane jest RNA wolne od DNA, otwórz kolumienkę, dodaj na sam środek membrany 80-100 ul roztworu DNazy I, zamknij wieczko i inkubuj przez 15 minut w temperaturze pokojowej.

7. Otwórz kolumienkę i dodaj 250 ul buforu RP1.  
Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością.  
Wylej przesącz, nie wyrzucaj probówki.
8. Otwórz kolumienkę i dodaj 750 ul buforu RP2.  
Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością.  
Wylej przesącz, nie wyrzucaj probówki.
9. Otwórz kolumienkę i dodaj 750 ul buforu RP2.  
Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością.  
Wylej przesącz, nie wyrzucaj probówki.
10. Wiruj przez 3 minuty z maksymalną prędkością, aby wysuszyć membranę i pozbyć się z kolumienki resztek buforów zawierających etanol.

Upewnij się, że w rogu kolumienki nie został żaden płyn.

11. Przenieś kolumienkę do probówki elucyjnej 1,5 ml i wyrzuć starą probówkę z resztkami buforu płuczającego.  
Otwórz kolumienkę. Ostrożnie, nie dotykając membrany, dodaj na sam środek membrany 50 ul wody wolnej od RNaz.  
Zamknij wieczko i inkubuj przez 1-3 minuty w temperaturze pokojowej, aż bufor wsiąknie w membranę.  
Wiruj przez 2 minuty w temperaturze pokojowej z maksymalną prędkością.



12. Ostrożnie wysuń kolumnienkę i zamknij wieczko w probówce z wyizolowanym RNA.

Nie wyrzucaj kolumnienki do czasu określenia stężenia wyizolowanego RNA. Jak w przypadku każdej metody chromatograficznej, niewłaściwe pH wody użytej do elucji może wyraźnie zmniejszyć wydajność elucji, a nawet uniemożliwić ją, powodując pozostanie całego RNA na kolumnie.

Przy pomiarze stężenia RNA metodami spektrofotometrycznymi, stosuj wodę użytą do elucji jako próbę ślepą (blank).

Wyizolowany RNA należy rozporcjować i przechowywać w temperaturze od  $-70^{\circ}\text{C}$  do  $-86^{\circ}\text{C}$ .

## **Protokół 2**

### **do zestawu Syngen Plant RNA Mini**

#### **Izolacja RNA z tkanek roślinnych świeżych lub mrożonych bogatych w lepkie metabolity, jak bielmo ziarna kukurydzy**


Zanim zaczniesz

- Jeżeli pierwszy raz używasz zestawu Syngen Plant RNA Mini Kit, najpierw przeczytaj wszystkie rozdziały poprzedzające protokoły.
- Upewnij się, że przygotowałeś wszystkie potrzebne odczynniki i sprzęty opisane w rozdziale „Sprzęt i odczynniki potrzebne do wykonania procedury, a niedostarczone z zestawem”.
- Upewnij się, że bufor płuczący został przygotowany zgodnie z instrukcjami zawartymi w rozdziale „Przygotowanie odczynników przed pierwszym użyciem”.
- Jeżeli w którymś buforze wytrącił się precypitat, rozpuść go inkubując w 37°C przez kilka minut i mieszając.
- Doprowadź wszystkie bufony do temperatury pokojowej (15-25°C).
- Dokładnie wymieszaj próbki i umieść je na lodzie (opcjonalnie).
- Przygotuj potrzebną porcję buforu RLR-BME używając 10 ul B-ME na każdy 1 ml buforu RLR. Nie wolno dodawać B-ME do całej butelki buforu RLR, o ile cały nie zostanie zużyty na raz.

## Procedura

1. Umieść odmierzoną ilość (maksymalnie 100 mg) świeżej lub mrożonej tkanki roślinnej w moździerz z ciekłym azotem.  
Przy pomocy tłuczka rozetrzyj tkankę na drobny pył.  
Przesyp pył z ewentualnymi resztami ciekłego azotu do probówki 1,5 ml lub 2,0 ml z wieczkiem (nie dostarczono).  
Pozwól na odparowanie pozostałości ciekłego azotu z probówki.

Homogenizację można wykonać inaczej. Więcej szczegółów znajdziesz w rozdziale „Homogenizacja”.

2. Dodaj 500  $\mu$ l przygotowanego buforu RLR-BME i zawieś proszek mieszając na wortexie, a następnie zwortexuj energicznie.  
Inkubuj w temperaturze pokojowej przez 5 minut.  
Zwiruj probówki, aby usunąć krople z wieczka.
3. Umieść kolumnkę klarującą KL w probówce 2 ml.  
Przenieś zawartość probówki z kroku 2 na kolumnkę.  
Zamknij wieczko i wiruj przez 2 minuty z maksymalną prędkością.  
Usuń kolumnkę klarującą KL ze stałymi cząstkami lizatu.
4. Przenieś przesącz (sklarowany lizat) do nowej probówki 1,5 ml lub 2,0 ml z wieczkiem (nie dostarczono).  
Dodaj 1 objętość etanolu (70%), zamknij i zmieszaj na wortexie.
5. Przejdź do protokołu 1 „**Izolacja RNA z tkanek roślinnych świeżych lub mrożonych**”, do miejsca oznaczonego czarną strzałką. 

### **Protokół 3**

#### **do zestawu Syngen Plant RNA Mini**

#### **Izolacja RNA z hodowli komórek roślinnych w zawiesinie bogatych w lepkie metabolity oraz typowych**

Zanim zaczniesz

- Jeżeli pierwszy raz używasz zestawu Syngen Plant RNA Mini Kit, najpierw przeczytaj wszystkie rozdziały poprzedzające protokoły.
- Zapoznaj się z protokołem 1 (dla komórek bogatych w lepkie metabolity, jak bielmo ziarna kukurydzy) lub protokołem 2 (dla typowych komórek), w tym z rozdziałem wstępnym „Zanim zaczniesz”
- Przygotuj lód (opcjonalnie) i ewentualnie schłodź wirówkę do +10°C (opcjonalnie).
- Przygotuj potrzebną porcję buforu RLR-BME (dla komórek bogatych w lepkie metabolity, jak bielmo ziarna kukurydzy) lub RLK-BME (dla typowych tkanek), używając 10 ul B-ME na każdy 1 ml buforu RLK. Nie wolno dodawać B-ME do całej butelki buforu RLK, o ile cały nie zostanie zużyty na raz.
- Przygotuj narzędzie do liczenia komórek

## Procedura

1. Przenieś maksymalnie  $1 \times 10^7$  komórek do probówki wirówkowej 1,5 lub 2,0 ml (nie dostarczono).  
Wiruj przez 5 minut z prędkością 300 x g w temperaturze +10°C (schłodzenie opcjonalne).  
Ostrożnie usuń cały supernatant, nie naruszając pelletu.

Uwaga: Pellet komórek może być niewidoczny lub tworzyć nalot na ukośnej ścianie wewnątrz probówki.

2. Dodaj 0,5-1,0 ml PBS wolnego od RNaz i zawieś komórki – można zastosować energiczne worteksowanie.  
Wiruj przez 5 minut z prędkością 300 x g w temperaturze +10°C (schłodzenie opcjonalne).  
Ostrożnie usuń cały supernatant, nie naruszając pelletu.

Uwaga: Pellet komórek może być niewidoczny lub tworzyć nalot na ukośnej ścianie wewnątrz probówki.

3. Umieść probówki na lodzie (opcjonalnie).
4. Przejdź do Protokołu 1 „**Izolacja RNA z tkanek roślinnych świeżych lub mrożonych**” (dla większości komórek) lub do Protokołu 2 „**Izolacja RNA z tkanek roślinnych świeżych lub mrożonych bogatych w lepkie metabolity, jak bielmo ziarna kukurydzy**” (dla komórek bogatych w lepkie metabolity, jak bielmo ziarna kukurydzy). Zaczynij od początku.

## **Protokół 4** **do zestawu Syngen Wood RNA Mini**

### **Izolacja RNA z tkanek roślinnych zdrewniałych**

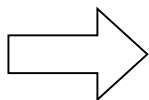
Zanim zaczniesz

- Jeżeli pierwszy raz używasz zestawu Syngen Plant RNA W Mini Kit, najpierw przeczytaj wszystkie rozdziały poprzedzające protokoły.
- Upewnij się, że przygotowałeś wszystkie potrzebne odczynniki i sprzęty opisane w rozdziale „Sprzęt i odczynniki potrzebne do wykonania procedury, a niedostarczone z zestawem”.
- Upewnij się, że bufor płuczący został przygotowany zgodnie z instrukcjami zawartymi w rozdziale „Przygotowanie odczynników przed pierwszym użyciem”.
- Jeżeli w którymś buforze wytrącił się precypitat, rozpuść go inkubując w 37°C przez kilka minut i mieszając.
- Doprowadź wszystkie bufony do temperatury pokojowej (15-25°C).
- Dokładnie wymieszaj próbki i umieść je na lodzie (opcjonalnie).
- Nastaw blok grzejny, łaźnię wodną lub termomikser na 70°C.
- Przygotuj potrzebną porcję buforu RLR1-BME używając 10 ul B-ME na każdy 1 ml buforu RLR1. Nie wolno dodawać B-ME do całej butelki buforu RLR1, o ile cały nie zostanie zużyty na raz.

## Procedura

1. Umieść odmierzoną ilość (maksymalnie 100 mg) świeżej lub mrożonej tkanki roślinnej w moździercu z ciekłym azotem.  
Przy pomocy tłuczka rozetrzyj tkankę na drobny pył.  
Przesyp pył z ewentualnymi resztami ciekłego azotu do probówki 1,5 ml lub 2,0 ml z wieczkiem (nie dostarczono).  
Pozwól na odparowanie pozostałości ciekłego azotu z probówki.

Homogenizację można wykonać inaczej. Więcej szczegółów znajdziesz w rozdziale „Homogenizacja”.



2. Dodaj 500  $\mu$ l przygotowanego buforu RLR1-BME i zawieś proszek mieszając na wortexie, a następnie zwortexuj energicznie.  
Zwiruj probówki, aby usunąć krople z wieczka.
3. Dodaj 50  $\mu$ l buforu RLR2 i zmieszaj na wortexie.  
Inkubuj w temperaturze 70°C przez 10 minut mieszając co 3 minuty. Zamiast bloku/łażni i mieszania co 3 minuty można zastosować termomikser.  
Wiruj przez 5 minut z prędkością 12000 rpm w temperaturze 5°C.
4. Ostrożnie, nie naruszając osadu, przenieś sklarowany lizat do nowej probówki 1,5 ml lub 2,0 ml z wieczkiem (nie dostarczono).  
Dodaj 0,9 objętości etanolu (96-100%), zamknij i zmieszaj.
5. Przejdź do protokołu 1 „**Izolacja RNA z tkanek roślinnych świeżych lub mrożonych**” do miejsca oznaczonego czarna strzałką.

## **Protokół 5** **do zestawu Syngen Plant RNA Maxi**

### **Izolacja RNA z tkanek roślinnych świeżych lub mrożonych**

Zanim zaczniesz

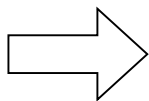
- Jeżeli pierwszy raz używasz zestawu Syngen Plant RNA Maxi Kit, najpierw przeczytaj wszystkie rozdziały poprzedzające protokoły.
- Upewnij się, że przygotowałeś wszystkie potrzebne odczynniki i sprzęty opisane w rozdziale „Sprzęt i odczynniki potrzebne do wykonania procedury, a niedostarczone z zestawem”.
- Upewnij się, że bufor płuczący został przygotowany zgodnie z instrukcjami zawartymi w rozdziale „Przygotowanie odczynników przed pierwszym użyciem”.
- Jeżeli w którymś buforze wytrącił się precypitat, rozpuść go inkubując w 37°C przez kilka minut i mieszając.
- Doprowadź wszystkie bufony do temperatury pokojowej (15-25°C).
- Dokładnie wymieszaj próbki i umieść je na lodzie (opcjonalnie).
- Przygotuj potrzebną porcję buforu RLK-BME używając 10 ul B-ME na każdy 1 ml buforu RLK. Nie wolno dodawać B-ME do całej butelki buforu RLK, o ile cała nie zostanie zużyta na raz.



## Procedura

1. Umieść odmierzoną ilość (500 do maksymalnie 1000 mg) świeżej lub mrożonej tkanki roślinnej w moździerzu z ciekłym azotem. Przy pomocy tłuczka rozetrzyj tkankę na drobny pył. Przesyp pył z ewentualnymi resztami ciekłego azotu do probówki 50 ml z wieczkiem, tzw. falkonki 50 (nie dostarczono). Pozwól na odparowanie pozostałości ciekłego azotu z probówki.

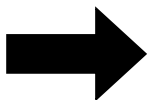
Homogenizację można wykonać inaczej. Więcej szczegółów znajdziesz w rozdziale „Homogenizacja”.



2. Dodaj 5 ml przygotowanego buforu RLK-BME i zawieś proszek mieszając na wortexie, a następnie zwortexuj energicznie. Inkubuj w temperaturze 70°C przez 10 minut mieszając co 3 minuty. Zamiast łaźni/bloku i mieszania co 3 minuty można zastosować termomikser. Zwiruj probówki, aby usunąć krople z wieczka.

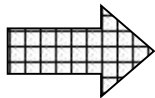
3. Umieść kolumnę klarującą KL w probówce 50 ml (falkonce 50). Przenieś zawartość probówki z kroku 2 na kolumnę. Zamknij wieczko i wiruj przez 5 minut z prędkością 4500-6000 rpm w temperaturze 4°C. Usuń kolumnę klarującą KL ze stałymi cząstkami lizatu.

4. Przenieś przesącz (sklarowany lizat) do nowej probówki 50 ml z wieczkiem (nie dostarczono). Nie trzeba zmieniać probówki, jeśli poprzednia była z wieczkiem. Dodaj 1 objętość etanolu (70%), zamknij i zmieszaj na wortexie impulsowo przez 5 sekund. Zwiruj probówki, aby usunąć krople z wieczka.



5. Umieść kolumnę R w probówce 50 ml do płukania. Przenieś całą zawartość probówek z kroku 4 na kolumnę. Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z prędkością 4500-6000 rpm.

6. Przenieś kolumnę do nowej probówki 50 ml (nie dostarczono) i wyrzucić przesącz razem ze starą probówką.  
Otwórz kolumnę, dodaj 2,5 ml buforu RP1.  
Zamknij wieczko i wiruj przez 2 minuty z prędkością 4500-6000 rpm.  
Wylej przesącz, nie wyrzucaj probówki.



Jeśli wymagane jest RNA wolne od DNA, otwórz kolumnę, dodaj na sam środek membrany 800 ul roztworu DNazy I, zamknij wieczko i inkubuj przez 15 minut w temperaturze pokojowej.

7. Otwórz kolumnę, dodaj 2,5 ml buforu RP1.  
Zamknij wieczko i wiruj przez 2 minuty z prędkością 4500-6000 rpm.  
Wylej przesącz, nie wyrzucaj probówki.
8. Otwórz kolumnę i dodaj 5 ml buforu RP2.  
Zamknij wieczko i wiruj przez 2 minuty z prędkością 4500-6000 rpm.  
Wylej przesącz, nie wyrzucaj probówki.
9. Otwórz kolumnę i dodaj 5 ml buforu RP2.  
Zamknij wieczko i wiruj przez 2 minuty z prędkością 4500-6000 rpm.  
Wylej przesącz, nie wyrzucaj probówki.
10. Wiruj przez 10 minut z maksymalną prędkością, aby wysuszyć membranę i pozbyć się z kolumny resztek buforów zawierających etanol.

Upewnij się, że w rogu kolumny nie został żaden płyn.

11. Przenieś kolumnę do nowej probówki elucyjnej 50 ml i wyrzucić starą probówkę z resztkami buforu płuczającego.  
Otwórz kolumnę. Ostrożnie, nie dotykając membrany, dodaj na sam środek membrany 1000 ul wody wolnej od RNaz.

Zamknij wieczko i inkubuj przez 5 minut w temperaturze pokojowej, aż bufor wsiąknie w membranę.

Wiruj przez 5 minut w temperaturze pokojowej z prędkością 4500-6000 rpm.

12. Ostrożnie wysuń kolumnę i zamknij wieczko w probówce z wyizolowanym RNA.

Nie wyrzucaj kolumny do czasu określenia stężenia wyizolowanego RNA. Jak w przypadku każdej metody chromatograficznej, niewłaściwe pH wody użytej do elucji może wyraźnie zmniejszyć wydajność elucji, a nawet uniemożliwić ją, powodując pozostanie całego RNA na kolumnie.

Przy pomiarze stężenia RNA metodami spektrofotometrycznymi, stosuj wodę użytą do elucji jako próbę ślepą (blank).

Wyizolowany RNA należy rozporcjować i przechowywać w temperaturze od -70°C do -86°C.

## **Protokół 6** **do zestawu Syngen Plant RNA Maxi**

### **Izolacja RNA z tkanek roślinnych świeżych lub mrożonych bogatych w lepkie metabolity, jak bielmo ziarna kukurydzy**

Zanim zaczniesz

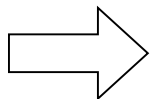
- Jeżeli pierwszy raz używasz zestawu Syngen Plant RNA Maxi Kit, najpierw przeczytaj wszystkie rozdziały poprzedzające protokoły.
- Upewnij się, że przygotowałeś wszystkie potrzebne odczynniki i sprzęty opisane w rozdziale „Sprzęt i odczynniki potrzebne do wykonania procedury, a niedostarczone z zestawem”.
- Upewnij się, że bufor płuczący został przygotowany zgodnie z instrukcjami zawartymi w rozdziale „Przygotowanie odczynników przed pierwszym użyciem”.
- Jeżeli w którymś buforze wytrącił się precypitat, rozpuść go inkubując w 37°C przez kilka minut i mieszając.
- Doprowadź wszystkie bufony do temperatury pokojowej (15-25°C).
- Dokładnie wymieszaj próbki i umieść je na lodzie (opcjonalnie).
- Przygotuj potrzebną porcję buforu RLR-BME używając 10 ul B-ME na każdy 1 ml buforu RLR. Nie wolno dodawać B-ME do całej butelki buforu RLR, o ile cały nie zostanie zużyty na raz.


Procedura

1. Umieść odmierzoną ilość (500 do maksymalnie 1000 mg) świeżej lub mrożonej tkanki roślinnej w moździerzu z ciekłym azotem.

Przy pomocy tłuczka rozetrzyj tkankę na drobny pył.  
Przesyp pył z ewentualnymi resztkami ciekłego azotu do probówki 50 ml z wieczkiem, tzw. falkonki 50 (nie dostarczono).  
Pozwól na odparowanie pozostałości ciekłego azotu z probówki.

Homogenizację można wykonać inaczej. Więcej szczegółów znajdziesz w rozdziale „Homogenizacja”.



2. Dodaj 5 ml przygotowanego buforu RLR-BME i zawieś proszek mieszając na wortexie, a następnie zwortexuj energicznie.  
Inkubuj w temperaturze 70°C przez 10 minut mieszając co 3 minuty. Zamiast łaźni/bloku i mieszania co 3 minuty można zastosować termomikser.  
Zwiruj probówki, aby usunąć krople z wieczka.
3. Umieść kolumnę klarującą KL w probówce 50 ml (falkonce 50).  
Przenieś zawartość probówki z kroku 7 na kolumienkę.  
Zamknij wieczko i wiruj przez 5 minut z prędkością 4500-6000 rpm w temperaturze 4°C.  
Usuń kolumnę klarującą KL ze stałymi cząstkami lizatu.
4. Przenieś przesącz (sklarowany lizat) do nowej probówki 50 ml z wieczkiem (nie dostarczono). Nie trzeba zmieniać probówki, jeśli poprzednia była z wieczkiem.  
Dodaj 1 objętość etanolu (70%), zamknij i zmieszaj na wortexie impulsowo przez 5 sekund.
5. Przejdź do protokołu 5 „**Izolacja RNA z tkanek roślinnych świeżych lub mrożonych**”, do miejsca oznaczonego czarną strzałką. 

## **Protokół 7** **do zestawu Syngen Plant RNA Maxi**

### **Izolacja RNA z hodowli komórek roślinnych w zawiesinie bogatych w lepkie metabolity oraz typowych**

Zanim zaczniesz

- Jeżeli pierwszy raz używasz zestawu Syngen Plant RNA Maxi Kit, najpierw przeczytaj wszystkie rozdziały poprzedzające protokoły.
- Zapoznaj się z protokołem 6 (dla komórek bogatych w lepkie metabolity, jak bielmo ziarna kukurydzy) lub protokołem 5 (dla typowych komórek), w tym z rozdziałem wstępnym „Zanim zaczniesz”
- Przygotuj potrzebną porcję buforu RLR-BME (dla komórek bogatych w lepkie metabolity, jak bielmo ziarna kukurydzy) lub RLK-BME (dla typowych tkanek), używając 10 ul B-ME na każdy 1 ml buforu RLK lub RLR. Nie wolno dodawać B-ME do całej butelki buforu RLK lub RLR, o ile cały nie zostanie zużyty na raz.
- Przygotuj narzędzie do liczenia komórek

## Procedura

1. Przenieś maksymalnie  $5-10 \times 10^7$  komórek do probówki (nie dostarczono).

Wiruj przez 5-10 minut z prędkością 300 x g w temperaturze +10°C (schłodzenie opcjonalne).

Ostrożnie usuń cały supernatant, nie naruszając pelletu.

Uwaga: Pellet komórek może być niewidoczny lub tworzyć nalot na ukośnej ścianie wewnątrz probówki.

2. Dodaj 5 ml PBS wolnego od RNaz i zawieś komórki – można zastosować energiczne wortexowanie.

Wiruj przez 5-10 minut z prędkością 300 x g w temperaturze +10°C (schłodzenie opcjonalne).

Ostrożnie usuń cały supernatant, nie naruszając pelletu.

Uwaga: Pellet komórek może być niewidoczny lub tworzyć nalot na ukośnej ścianie wewnątrz probówki.

3. Umieść probówki na lodzie (opcjonalnie).

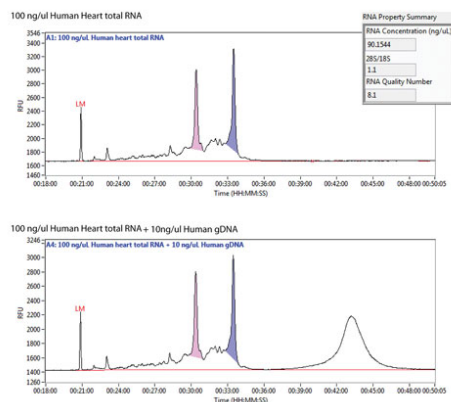
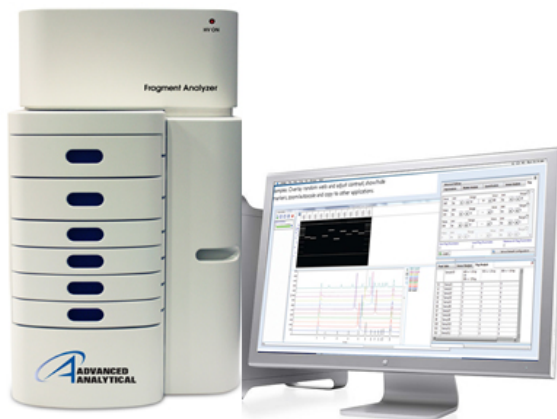
4. Przejdź do Protokołu 5 „**Izolacja RNA z tkanek roślinnych świeżych lub mrożonych**” (dla większości komórek) lub do Protokołu 6 „**Izolacja RNA z tkanek roślinnych świeżych lub mrożonych bogatych w lepkie metabolity, jak bielmo ziarna kukurydzy**” (dla komórek bogatych w lepkie metabolity, jak bielmo ziarna kukurydzy), zacznij od początku.

## Określenie ilości i integralności wyizolowanego RNA

Do określenia ilości i integralności wyizolowanego RNA proponujemy automatyczną elektroforezę kapilarną Fragment Analyzer firmy AATI.

Fragment Analyzer wykorzystuje gotowe żele wstawiane do aparatu po prostu w Falcon'ce 50ml i automatycznie nanosi próbki na żel. Teraz nie trzeba już przygotowywać żelu poliakryloamidowego, nanosić na niego próbek, wybarwiać bromkiem, dokumentować obrazu i analizować wyników w specjalnych programach.

- Fragment Analyzer wykonuje pełną analizę DNA i RNA.
- Fragment Analyzer analizuje do 288 prób jednocześnie bez ingerencji operatora
- Fragment Analyzer umożliwia dokładanie próbek podczas pracy
- Fragment Analyzer zużywa mniej niż 0,1 ul próbki
- Fragment Analyzer jest bardzo czuły – limit detekcji 50 pg/ul RNA. Uzyskujemy wiarygodne wyniki przy niskich stężeniach.
- Fragment Analyzer ma wysoką rozdzielczość nawet 2 pz
- Fragment Analyzer automatycznie analizuje wyniki, oznacza długość fragmentów, stężenie i integralność RNA







## Pomiar stężenia wyizolowanego RNA

Do określenia stężenia wyizolowanego RNA polecamy nowoczesny spektrofotometr mikrolitrowy NANO, wykonujący pomiar w próbce o objętości zaledwie 2  $\mu$ l.

- tylko 2  $\mu$ l, tylko 2 sekundy,  
pomiar stężenia bezpośrednio w kropli
- wbudowany komputer i drukarka wyników,  
szybka obsługa bez dodatkowego komputera
- automatyczne obliczanie stężenia i czystości,  
odczyt absorbancji przy 230nm, 260nm i 280 nm
- od 2 do 2000 ng/ $\mu$ l w 1 kropli,  
szeroki zakres pomiaru bez potrzeby rozcieńczania
- wysoka powtarzalność pomiarów,  
SD<5ng/ $\mu$ l (2-100 ng/ $\mu$ l), CV<5% (100-2000 ng/ $\mu$ l)
- opatentowana technologia,  
US 6.628.382 B2, US 6.809.826 B2
- automatyczna pamięć wyników,  
urządzenie przechowuje wyniki eksperymentów
- transfer wyników do komputera,  
łatwa i wygodna archiwizacja danych



## Samodzielne rozwiązywanie problemów

Za niska czystość A260/A280

Nieprawidłowa wartość A230

Przyczyna	Rozwiązanie
Zanieczyszczenia wprowadzone przez użytkownika	Stosuj się do wskazówek w rozdziałach „Ogólne wytyczne dotyczące obsługi zestawów Syngen DNA” (3 akapit – nakładaj bufor i próbki do wnętrza kolumny, nie zanieczyszczając brzegu kolumny) oraz „Ogólne wytyczne do pracy z RNA”
Niewydajna liza z powodu niewystarczającej homogenizacji tkanki	Zwróć uwagę na etap homogenizacji tkanki. Przeczytaj zalecenia w rozdziale „Homogenizacja”
Niewydajna liza z powodu za dużej ilości komórek w próbce	Powtórz izolację. Zmniejsz ilość próbki do zalecanej porcji
Niewydajna liza z powodu niewystarczających warunków inkubacji	Powtórz izolację. Wydłuż dwukrotnie inkubację z buforem RLK-BME/RLR-BMR/RLK1-BME
Niewydajna liza z powodu dużej zawartości lepkich metabolitów	Powtórz izolację stosując protokół do roślin zawierających lepkie metabolity
Nie dodano etanolu do próbki przed nałożeniem na kolumnę lub zastosowano etanol o złym stężeniu	Powtórz izolację, nie pomijaj żadnego kroku, upewnij się, że używasz etanolu o stężeniu określonym w protokole
Nie dodano etanolu do buforu płuczącego przed pierwszym użyciem lub zastosowano etanol o złym stężeniu	Powtórz izolację, przygotuj prawidłowo bufor, upewnij się, że używasz etanolu o stężeniu określonym w protokole
Duża zawartość DNA w izolacie z powodu pominięcia trawienia DNazą	Powtórz izolację, wykonaj trawienie DNA na kolumnie

Mała lub zerowa wydajność izolacji

Przyczyna	Rozwiązanie
Zanieczyszczenie RNazami spowodowało rozłożenie RNA	Powtórz izolację, przeczytaj rozdział „Ogólne wytyczne do pracy z RNA”
Mało komórek w próbce	Powtórz izolację, użyj więcej próbki, nie przekraczaj dozwolonej ilości
Niewydajna liza z powodu niewystarczającej homogenizacji tkanki	Zwróć uwagę na etap homogenizacji tkanki. Przeczytaj zalecenia w rozdziale „Homogenizacja”
Niewydajna liza z powodu za dużej ilości komórek w próbce	Powtórz izolację. Zmniejsz ilość próbki do zalecanej porcji
Niewydajna liza z powodu niewystarczających warunków inkubacji	Powtórz izolację. Wydłuż dwukrotnie inkubację z buforem RLK-BME/RLR-BMR/RLK1-BME
Niewydajna liza z powodu dużej zawartości lepkich metabolitów	Powtórz izolację stosując protokół do roślin zawierających lepkie metabolity
Nie dodano etanolu do próbki przed nałożeniem na kolumnę lub zastosowano etanol o złym stężeniu	Powtórz izolację, nie pomijaj żadnego kroku, upewnij się, że używasz etanolu o stężeniu określonym w protokole

Nie dodano etanolu do bufora płuczącego przed pierwszym użyciem lub zastosowano etanol o złym stężeniu	Powtórz izolację, przygotuj prawidłowo bufor, upewnij się, że używasz etanolu o stężeniu określonym w protokole
Niewydajna elucja wodą o za niskim pH (niższe niż 7.5-9.0)	Wykonaj elucję ponownie wodą dostarczoną z zestawem lub wodą o odpowiednim pH (przeczytaj rozdział „Elucja RNA”)
Niewydajna elucja – woda nie wsiąkła w membranę	Powtórz elucję - upewnij się, że nanosisz wodę na sam środek membrany - pozwól wodzie wsiąknąć w membranę - inkubuj 5 minut przed wirowaniem
Niewydajna elucja w powodu przedziurawienia membrany	Powtórz izolację

Materiał po izolacji jest zdegradowany

Przyczyna	Rozwiązanie
Próbka jest stara lub źle przechowywana	Powtórz izolację na nowej próbce, izoluj RNA z próbek świeżych lub prawidłowo przechowywanych
Zanieczyszczenie RNazami spowodowało rozłożenie RNA	Powtórz izolację, przeczytaj rozdział „Ogólne wytyczne do pracy z RNA”

Zielone zabarwienie membrany/eluat

Przyczyna	Rozwiązanie
Naturalne zjawisko przy izolacji z roślin	Powtórz izolację. Zwiększ ilość myć buforami myjącymi RP1 i RP2 z 2x + 2x na 4x + 4x

Kolumnienka zatkała się

Przyczyna	Rozwiązanie
Próbka jest zbyt gęsta lub lepka	Powtórz izolację z mniejszej ilości próbki. Spróbuj zastosować protokoły do tkanek zawierających lepkie metabolity.
Elementy stałe w lizacie	Usuń z lizatu elementy stałe np. przez odwirowanie, użyj nowej kolumnienki
Zbyt mała prędkość wirowania	Powtórz wirowanie z maksymalną prędkością
Niewydajna liza z powodu niewystarczającej homogenizacji tkanki	Zwróć uwagę na etap homogenizacji tkanki. Przeczytaj zalecenia w rozdziale „Homogenizacja”
Niewydajna liza z powodu za dużej ilości komórek w próbce	Powtórz izolację. Zmniejsz ilość próbki do zalecanej porcji
Niewydajna liza z powodu niewystarczających warunków inkubacji	Powtórz izolację. Wydłuż dwukrotnie inkubację z buforem RLK-BME/RLR-BMR/RLK1-BME
Niewydajna liza z powodu dużej zawartości lepkich metabolitów	Powtórz izolację stosując protokół do roślin zawierających lepkie metabolity



[facebook.com/SyngenBiotech](https://facebook.com/SyngenBiotech)

Syngen Biotech Sp. z o.o. Sp. k.

54-116 Wrocław, ul. Ostródzka 13

[kolumienki.pl](http://kolumienki.pl), [syngen.pl](http://syngen.pl), [info@syngen.pl](mailto:info@syngen.pl)

tel. +48 71 349 70 13, +48 349 91 66, +48 71 349 91 67, faks +48 71 349 70 33

