

Syngen Blood/Cell RNA Mini Kit

Syngen Tissue RNA Mini Kit

Zestawy do izolacji całkowitego RNA z próbek:

- krwi pełnej
- kożuszka leukocyтарnego
- komórek
- tkanek świeżych
- tkanek mrożonych
- bakterii
- drożdży
- grzybów
- oraz doczyszczania RNA

Instrukcja dla użytkownika, w. 2018.1

Spis treści

Informacje wstępne	3
Ograniczenia	3
Zawartość zestawów	4
Przechowywanie	4
Sprzęt i odczynniki potrzebne do wykonania procedury, a niedostarczone z zestawem	5
Przygotowanie odczynników przed pierwszym użyciem	6
Materiał wyjściowy i wydajność RNA	6
Homogenizacja	8
Ogólne wytyczne do pracy z RNA	9
Ogólne wytyczne dotyczące obsługi zestawów Syngen	11
Elucja RNA	11
Trawienie DNA na kolumnie	12

Protokoły

Protokół 1: Izolacja RNA z pełnej krwi lub kożuszka leukocytarnego (tylko Syngen Blood/Cell Mini)	13
Protokół 2: Izolacja RNA z hodowli komórkowych	16
Protokół 3: Izolacja RNA z tkanek świeżych	21
Protokół 4: Izolacja RNA z tkanek mrożonych	24
Protokół 5: Izolacja RNA z hodowli bakteryjnej	25
Protokół 6: Izolacja RNA z hodowli drożdży i grzybów	28
Protokół 7: Doczyszczanie RNA	31
Samodzielne rozwiązywanie problemów	34

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 Blood/Cell RNA Mini oraz Syngen Tissue RNA Mini. 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 zestawu

Syngen Blood/Cell RNA Mini Kit	SY301010	SY301011	SY301012
Liczba izolacji	50	100	300
Kolumnienki R	50	100	300
Kolumnienki klarujące KL	50	100	300
Bufor lizujący eryocyty RLE	120 ml	240 ml	3 x 240 ml
Bufor lizujący RLK	25 ml	45 ml	130 ml
Bufor płuczający RP1	30 ml	60 ml	170 ml
Bufor płuczający RP2 – koncentrat	15 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

Syngen Tissue RNA Mini Kit	SY321010	SY321011	SY321012
Liczba izolacji	50	100	300
Kolumnienki R	50	100	300
Kolumnienki klarujące KL	50	100	300
Homogenizator H	50	100	300
Bufor lizujący RLK	25 ml	45 ml	130 ml
Bufor płuczający RP1	30 ml	60 ml	170 ml
Bufor płuczający RP2 – koncentrat	15 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

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%)
- β -merkaptoetanol (B-ME)
- Probówki 1.5 ml i 2.0 ml (eppendorfki)
- Statyw
- Sterylne końcówki do pipet z filtrem
- Pipety automatyczne nastawne
- Mikrowirówka
- Worteks
- Pokruszony lód (mokry, temperatura 0°C)
- PBS wolny od RNaz (opcjonalnie)
- Roztwór DNazy I o stężeniu 0,5 U/ul (opcjonalnie)
- Rękawiczki beztalkowe

Do izolacji RNA z tkanek (wszystkie protokoły):

- Strzykawka z igłą grubości 0,9 (średnica wewnętrzna ok. 0,6 mm)
- Moździerz i ciekły azot (opcjonalnie)
- Homogenizator elektryczny (opcjonalnie)

Do izolacji RNA z hodowli komórkowej:

- Trypsyna lub skrobak (do komórek rosnących w monowarstwie)
- Medium hodowlane
- PBS
- Przyrządy do liczenia komórek

Do izolacji RNA z bakterii:

- roztwór lizozymu 20 mg/ml
w buforze 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2 mM EDTA, 1.2% Triton
- łaźnia wodna, blok grzejny lub termomikser na 37°C

Do izolacji RNA z drożdży:

- zymolaza lub lytikaza
- bufor z sorbitolem do drożdży (1M sorbitol, 100mM EDTA, 0,1% β -merkaptoetanol)
- łaźnia wodna, blok grzejny lub termomikser na 30°C

Do izolacji RNA z grzybów:

- zymolaza lub litykaza
- bufor z sorbitolem do grzybów (1,2M sorbitol, 10mM CaCl₂, 0,1M Tris=HCl pH 7,5, 35mM β-merkaptioetanol)
- łaźnia wodna, blok grzejny lub termomikser na 30°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. Informacja dotycząca wymaganej ilości etanolu, umieszczona jest na butelce z koncentratem. Po dodaniu etanolu należy zaznaczyć kwadrat na zakrętce.

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

Zestaw Syngen Tissue RNA Mini służy do izolacji całkowitego RNA z tkanek świeżych i mrożonych, hodowli komórkowych, bakterii i drożdży.

Zestaw Syngen Blood/Cell RNA Mini służy do izolacji całkowitego RNA z krwi, kożuszka leukocytnego, hodowli komórkowych, bakterii i drożdży.

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.

Materiał wyjściowy	Maksymalna ilość na 1 izolację	Typowa wydajność RNA
Krew (z antykoagulantem)	200-300 ul (1000ul*)	1 ug (3 ug*)
Kożuszek leukocytarny	200-300 ul	5-20 ug
Tkanki świeże, mrożone	10-30 mg	10-100 ug
Komórki (hodowla)	1×10^7	20-100 ug
Bakterie (hodowla)	1×10^9 (1 ml log)	40-60
Drożdże (hodowla)	$1-5 \times 10^7$ (3 ml log)	20-100
Grzyby (hodowla)	5×10^7 komórek	n/a
RNA do doczyszczania	100 ug / 100 ul	n/a

Próbki o objętości mniejszej niż 200 ul powinny zostać dopełnione przy użyciu PBS do objętości 200 ul.

Próbki rozcieńczone, których objętość jest większa niż zalecana w danym protokole, ale nieprzekraczające maksymalnej ilości komórek na 1 izolację, można również wykorzystać w całości. W tym celu należy proporcjonalnie zwiększyć objętość pozostałych używanych buforów i reagentów we wszystkich krokach aż do etapu nakładania na kolumnę. Nakładanie na kolumnę lizatów o większej objętości należy wykonać w kilku porcjach, usuwając przesącz i nakładając kolejną porcję, aż do przesączenia przez kolumnę całej próbki. (*) Izolację z pełnej krwi można wykonać z próbki o objętości do 1 ml, jednak w tym celu należy odpowiednio powiększyć stosowane objętości buforu lizującego erytrocyty RLE.

Próbki pełnej krwi podczas pobierania powinny zostać zabezpieczone przed koagulacją. W tym celu należy zastosować antykoagulant – EDTA lub cytrynian. Heparyna jest również dozwolona, jednak nie zalecamy jej stosowania, gdyż nawet śladowe jej ilości po przedostaniu się do eluatu mogą stać się inhibitorem reakcji PCR.

Kożuszek leukocytarny to bogata w leukocyty frakcja krwi. Zastosowanie do izolacji 200 ul kożuszek leukocytarnego zamiast 300 ul pełnej krwi zwiększa około 10-krotnie wydajność izolacji RNA.

Tkanki świeże powinny być przekazane do izolacji natychmiast po pobraniu. W przeciwnym wypadku należy je zamrozić w -70°C . 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.

Nie posiadając wagi można określić ilość tkanki pobranej do izolacji na podstawie jej objętości. Prostopadłościan o wymiarach 2x2x3mm waży od 15 do 25 mg.

W przypadku tkanek o bardzo wysokiej zawartości RNA należy odpowiednio zmniejszyć ilość tkanki pobranej do izolacji. Jeśli nie jest znana zawartość RNA lub gęstość komórek w badanej tkance, zalecamy zmniejszenie ilości tkanki wziętej do izolacji o połowę względem tabeli.

Komórki z hodowli przygotowuje się do izolacji poprzez zebranie i przemycie w PBS. Komórki rosnące w zawieszynie należy odwirować. Komórki rosnące w monowarstwie należy zebrać przy pomocy trypsyny lub zeszkrobać z powierzchni i odwirować. Przygotowanie komórek do izolacji opisano szczegółowo w protokołach.

Ilość komórek rosnących w monowarstwie można określić na podstawie powierzchni hodowli. Należy przyjąć, że 1 cm² hodowli zawiera od 1x10⁵ do 1,5x10⁵ komórek.

Bakterie i drożdże z hodowli należy pobrać do izolacji w fazie wzrostu logarytmicznego. Przerośnięcie hodowli powoduje umieranie komórek i rozkład RNA. Niedorośnięta hodowla ma zbyt małą ilość komórek dla wydajnej izolacji. Można przyjąć, że 1 x 10⁹ bakterii w 1 ml hodowli daje OD600 na poziomie 0,5-1,0. 3 ml hodowla drożdży o OD600=10 zawiera 1-5 x 10⁹ komórek.

Homogenizacja

W procesie izolacji RNA z tkanek homogenizacja jest kluczowym etapem, mającym wyraźny wpływ na wydajność izolacji. Zestaw Syngen Tissue RNA Mini zawiera plastikowy homogenizator H do zastosowania w probówce 1,5 ml (eppendorfce) do próbek świeżych. Przy jego użyciu należy rozgnieść tkankę o ścianki i dno probówki. Ten sposób homogenizacji jest wystarczający dla

większości miękkich tkanek. Przed rozpoczęciem homogenizacji należy zwrócić uwagę na to, czy homogenizator ściśle pasuje do kształtu wnętrza probówek używanych przez użytkownika. Jeśli homogenizator nie sięga dna probówki (opiera się o ukośne ścianki ponad dnem) lub występuje luz pomiędzy ukośnymi ściankami probówki, a końcem homogenizatora (po oparciu końca o dno), należy użyć do homogenizacji dostarczonych probówek elucyjnych, a do elucji – zastosować własne probówki 1,5 ml.

W przypadku tkanek twardych lub włóknistych (jak skóra, ściana serca, ścięgna) można zastosować elektryczny homogenizator typu ostrzowego lub kulowego. W takim wypadku homogenizację wykonujemy w buforze RLK, lub gdy próbka pieni się – w buforze PBS (nie dostarczono).

Alternatywnie każdy rodzaj tkanki można homogenizować przez ucieranie w ciekłym azocie. Następnie dokładnie utarty drobny proszek pobiera się do izolacji.

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

Drugi etap homogenizacji połączony z lizą chemiczną wykonuje się przepuszczając wielokrotnie wstępny homogenat przez strzykawkę z igłą 0,9 (średnica wewnętrzna ok. 0,6 mm).

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 wolne od RNaz, najlepiej firmowo zapakowane w jałowe pudełka.
2. Wszystkie tipsy muszą mieć filtr.
3. Worek z próbkami przecieramy RNase Away (do sucha) przed położeniem go na blacie. Nie wkładamy ręki do worka z próbkami. Wysypujemy kilka próbek na blat i chwytając za ich dół zamykamy je i ustawiamy w statywie.
4. Nie należy przenosić niczego (np. ręki z pipetą) nad otwartymi próbkami.
5. Nie wolno nachylać się nad otwartymi próbkami.

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 probówki 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).

Wszystkie wirowania 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.

Podczas obsługi zestawów Syngen zalecamy, aby ograniczać dotykanie membran 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 worteksowaniu lub mieszaniu zwirowywać probówki, aby usunąć krople ze spodu wieczek.

Elucja RNA

Typowa objętość elucji wynosi 50 μ l 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 50 ul. W niektórych przypadkach druga elucja pozwala na odzyskanie dodatkowych 40% RNA.

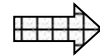
Wyizolowany RNA należy przechowywać zamrożony w temperaturze od -70 do -86°C. Dobrym rozwiązaniem jest rozporcjowanie izolatu przed zamrożeniem.

Trawienie DNA na kolumnie

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 kolumnie 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 kolumnie zaznaczono w protokołach kraciastą strzałką.



Protokół 1

Izolacja RNA z pełnej krwi lub kożuszka leukocyтарnego (tylko zestaw Syngen Blood/Cell RNA Mini)

Zanim zaczniesz

- Jeżeli pierwszy raz używasz zestawu Syngen Blood/Cell 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 precipitat, 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.
- 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 cały nie zostanie zużyty na raz.

Procedura

1. Do 2-ml eppendorfki (nie dostarczono) dodaj 200-300 ul pełnej krwi z antykoagulantem lub kożuszka leukocyтарnego.
Dodaj 5 objętości buforu lizującego erytrocyty RLE, zamknij i wymieszaj odwracając probówkę.
Inkubuj na lodzie przez 10 minut, mieszając na wortexie po 3. i po 6. minucie, aż do całkowitej lizy erytrocytów.

Próbki o objętości mniejszej niż 200 ul dopełnij przy użyciu PBS wolnego od RNaz (nie dostarczono) i wymieszaj.

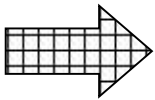
Do próbek krwi o objętości 300-1000 ul stosuj proporcjonalnie większą ilość buforu RLE.

2. Wiruj przez 1 minutę z prędkością 4500 rpm.
Usuń delikatnie supernatant, nie naruszając pelletu komórek.
3. Dodaj 600 ul buforu RLE, zamknij wieczko i zawieś komórki mieszając na wortexie.
Wiruj przez 1 minutę z prędkością 4500 rpm.
Usuń delikatnie supernatant, nie naruszając pelletu komórek.

4. Dodaj 350 ul przygotowanego buforu RLK-BME i zawieś komórki mieszając na wortexie a następnie zwortexuj energicznie. Inkubuj w temperaturze pokojowej przez 5 minut. Zwiruj probówki, aby usunąć krople z wieczka.
5. Umieść kolumnkę klarującą KL w probówce 2 ml. Przenieś zawartość probówki z kroku 4 na kolumnkę. Zamknij wieczko i wiruj przez 2 minuty z maksymalną prędkością. Usuń kolumnkę klarującą KL ze stałymi cząstkami lizatu.
6. 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. Nie wiruj.
7. Umieść kolumnkę R w probówce 2 ml do płukania. Przenieś całą zawartość probówek z kroku 6 na kolumnkę. Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością.

Jeśli objętość lizatu w punkcie 6 jest większa niż 700 ul, przenieś na kolumnę tylko 700 ul, zwiruj, usuń przesącz (nie wyrzucaj probówki) i powtarzaj, aż do nałożenia całego lizatu na kolumnę.

8. Przenieś kolumnkę do nowej probówki 2ml (nie dostarczono) i wyrzuć przesącz razem ze starą probówką. Dodaj do kolumnki 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 kolumnkę, dodaj na sam środek membrany 100 ul roztworu DNazy I, zamknij wieczko i inkubuj przez 15 minut w temperaturze pokojowej.

9. Dodaj do kolumnki 250 ul buforu RP1. Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością. Wylej przesącz, nie wyrzucaj probówki.
10. Dodaj do kolumnki 700 ul buforu RP2. Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością. Wylej przesącz, nie wyrzucaj probówki.

11. Dodaj do kolumnienki 700 μ l buforu RP2.
Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością.
Wylej przesącz, nie wyrzucaj probówki.
12. Wiruj przez 3 minuty z maksymalną prędkością, aby wysuszyć membranę i pozbyć się z kolumnienki resztek buforów zawierających etanol.

Upewnij się, że w rogu kolumnienki nie został żaden płyn.
Ewentualnie usuń go pipetą i powtórz wirowanie.

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

Objętość elucji i warunki inkubacji mogą być inne. Więcej na temat elucji znajdziesz w rozdziale „Elucja DNA”.

14. 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°C do -86°C .

Protokół 2

Izolacja RNA z hodowli komórkowych

Zanim zaczniesz

- Jeżeli pierwszy raz używasz zestawu Syngen Tissue RNA Mini Kit / Syngen Blood/Cell 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 precipitat, rozpuść go inkubując w 37°C przez kilka minut i mieszając.
- Doprowadź wszystkie buforu do temperatury pokojowej (15-25°C).
- Przygotuj lód i ewentualnie schłódź wirówkę do +10°C.
- 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 cały nie zostanie zużyty na raz.
- Do zebrania komórek rosnących na powierzchni przygotuj roztwór trypsyny lub skrobak oraz medium hodowlane. Można użyć medium zebranego z tej samej hodowli.
- Przygotuj narzędzie do liczenia komórek

Procedura dla komórek rosnących z zawiesinie:

1.1. Przenieś maksymalnie 1×10^7 komórek do probówki 1,5 ml (nie dostarczono). Trzymaj probówkę na lodzie.

Wiruj przez 5 minut z prędkością 300 x g w temperaturze +10°C.

Ostrożnie usuń cały supernatant, nie naruszając pelletu.

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

1.2. Dodaj 200 ul PBS wolnego od RNaz i zawieś komórki – można zastosować energiczne wortexowanie. Trzymaj probówkę na lodzie.

Wiruj przez 5 minut z prędkością 300 x g w temperaturze +10°C.

Ostrożnie usuń cały supernatant, nie naruszając pelletu.

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

- 1.3. Dodaj 350 μ l przygotowanego buforu RLK-BME i zawieś komórki mieszając na wortexie, a następnie zwortexuj energicznie. Inkubuj w temperaturze pokojowej przez 5 minut. Zwiruj probówki, aby usunąć krople z wieczka.

Procedura dla komórek rosnących na powierzchni – trypsyna

- 1.1. Usuń medium, przemyj używając PBS, usuń PBS.
- 1.2. Dodaj 0,10-0,25% roztwór trypsyny. Gdy komórki zaczną się odrywać, dolej medium, aby zatrzymać działanie trypsyny i zawieś komórki przez pipetowanie.
- 1.3. Przenieś maksymalnie 1×10^7 komórek do probówki 1,5 ml (nie dostarczono). Trzymaj probówkę na lodzie. Wiruj przez 5 minut z prędkością 300 x g w temperaturze +10°C. Ostrożnie usuń cały supernatant, nie naruszając pelletu.

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

- 1.4. Dodaj 200 μ l PBS wolnego od RNaz i zawieś komórki – można zastosować energiczne wortexowanie. Trzymaj probówkę na lodzie. Wiruj przez 5 minut z prędkością 300 x g w temperaturze +10°C. Ostrożnie usuń cały supernatant, nie naruszając pelletu.

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

- 1.5. Dodaj 350 μ l przygotowanego buforu RLK-BME i zawieś komórki mieszając na wortexie, a następnie zwortexuj energicznie. Inkubuj w temperaturze pokojowej przez 5 minut. Zwiruj probówki, aby usunąć krople z wieczka.

Procedura dla komórek rosnących na powierzchni – skrobak

- 1.1. Usuń część medium, zostaw ok. 1-2 mm warstwę na powierzchni komórek.
Zeskrob komórki z powierzchni, zawieś je w medium pipetując.
- 1.2. Przenieś maksymalnie 5×10^6 komórek do probówki 1,5 ml (nie dostarczono). Trzymaj probówkę na lodzie.
Wiruj przez 5 minut z prędkością 300 x g w temperaturze $+10^{\circ}\text{C}$.
Ostrożnie usuń cały supernatant, nie naruszając pelletu.

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

- 1.3. Dodaj 200 μl PBS wolnego od RNaz i zawieś komórki – można zastosować energiczne worteksowanie. Trzymaj probówkę na lodzie.
Wiruj przez 5 minut z prędkością 300 x g w temperaturze $+10^{\circ}\text{C}$.
Ostrożnie usuń cały supernatant, nie naruszając pelletu.

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

- 1.4. Dodaj 350 μl przygotowanego buforu RLK-BME i zawieś komórki mieszając na worteksie, a następnie zworteksuj energicznie.
Inkubuj w temperaturze pokojowej przez 5 minut.
Zwiruj probówki, aby usunąć krople z wieczka.

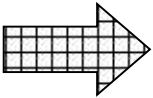
Ciąg dalszy procedur:

2. Umieść kolumnkę klarującą KL w probówce 2 ml.
Przenieś zawartość probówki z kroku 4 na kolumnkę.
Zamknij wieczko i wiruj przez 2 minuty z maksymalną prędkością.
Usuń kolumnkę klarującą KL ze stałymi cząstkami lizatu.

3. 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 worteksie.
Nie wiruj.
4. Umieść kolumnkę R w probówce 2 ml do płukania.
Przenieś całą zawartość probówek z kroku 6 na kolumnkę.
Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością.

Jeśli objętość lizatu w punkcie 6 jest większa niż 700 ul, przenieś na kolumnę tylko 700 ul, zwiń, usuń przesącz (nie wyrzucaj probówki) i powtarzaj, aż do nałożenia całego lizatu na kolumnę.

5. Przenieś kolumnkę do nowej probówki 2ml (nie dostarczono) i wyrzuć przesącz razem ze starą probówką.
Dodaj do kolumnki 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 kolumnkę, dodaj na sam środek membrany 100 ul roztworu DNazy I, zamknij wieczko i inkubuj przez 15 minut w temperaturze pokojowej.

6. Dodaj do kolumnki 250 ul buforu RP1.
Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością.
Wylej przesącz, nie wyrzucaj probówki.
7. Dodaj do kolumnki 700 ul buforu RP2.
Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością.
Wylej przesącz, nie wyrzucaj probówki.
8. Dodaj do kolumnki 700 ul buforu RP2.
Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością.
Wylej przesącz, nie wyrzucaj probówki.

9. Wiruj przez 3 minuty z maksymalną prędkością, aby wysuszyć membranę i pozbyć się z kolumnienki resztek buforów zawierających etanol.

Upewnij się, że w rogu kolumnienki nie został żaden płyn. Ewentualnie usuń go pipetą i powtórz wirowanie.

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

Objętość elucji i warunki inkubacji mogą być inne. Więcej na temat elucji znajdziesz w rozdziale „Elucja DNA”.

11. 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°C do -86°C .

Protokół 3

Izolacja RNA z tkanek świeżych

!!! Jeśli używasz zestawu **Syngen Blood/Cell RNA Mini**, izolację z tkanek świeżych wykonaj zgodnie z protokołem 4 „Izolacja RNA z tkanek mrożonych”, gdyż zestaw ten nie zawiera homogenizatorów.

Zanim zaczniesz

- Jeżeli pierwszy raz używasz zestawu Syngen Tissue 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 płuczający został przygotowany zgodnie z instrukcjami zawartymi w rozdziale „Przygotowanie odczynników przed pierwszym użyciem”.
- Jeżeli w którymś buforze wytrącił się precipitat, rozpuść go inkubując w 37°C przez kilka minut i mieszając.
- Doprowadź wszystkie bufony do temperatury pokojowej (15-25°C).
- Umieść próbki na lodzie.
- 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 cały nie zostanie zużyty na raz.
- Upewnij się, że twoje próbki 1,5 ml (ependorfki) pasują do homogenizatora H, ewentualnie zamień próbki na dostarczone.

Procedura

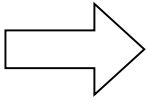
1. W eppendorfce (nie dostarczono) umieść 30 mg świeżej tkanki.

W przypadku tkanek bogatych w RNA lub o dużej gęstości komórek zastosuj połowę porcji.

2. Przy pomocy homogenizatora H rozgnieć tkankę wewnątrz próbki do uzyskania jednolitej masy.
Dodaj 350 ul buforu RLK-BME i kontynuuj ucieranie przy pomocy homogenizatora H.
Usuń homogenizator H pozostawiając cały homogenat w próbce.

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

3. Przy pomocy strzykawki z igłą 0,9 nabierz i wypuść homogenat 10 razy przez igłę, aż do jego zauważalnego ujednoczenia.



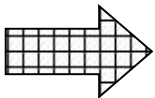
4. Umieść kolumnkę klarującą KL w probówce 2 ml.
Przenieś zawartość próbówki z kroku 4 na kolumnkę.
Zamknij wieczko i wiruj przez 2 minuty z maksymalną prędkością.
Usuń kolumnkę klarującą KL ze stałymi cząstkami lizatu.

5. Przenieś przesącz (sklarowany lizat) do nowej próbówki 1,5 ml lub 2,0 ml z wieczkiem (nie dostarczono).
Dodaj 1 objętość etanolu (70%), zamknij i zmieszaj na worteksie.
Nie wiruj.

6. Umieść kolumnkę R w probówce 2 ml do płukania.
Przenieś całą zawartość probówek z kroku 6 na kolumnkę.
Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością.

Jeśli objętość lizatu w punkcie 6 jest większa niż 700 ul, przenieś na kolumnę tylko 700 ul, zwiruj, usuń przesącz (nie wyrzucaj próbówki) i powtarzaj, aż do nałożenia całego lizatu na kolumnę.

7. Przenieś kolumnkę do nowej próbówki 2ml (nie dostarczono) i wyrzuc przesącz razem ze starą probówką.
Dodaj do kolumnki 250 ul buforu RP1.
Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością.
Wylej przesącz, nie wyrzucaj próbówki.



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

8. Dodaj do kolumnki 250 ul buforu RP1.
Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością.
Wylej przesącz, nie wyrzucaj próbówki.

9. Dodaj do kolumnki 700 ul buforu RP2.
Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością.
Wylej przesącz, nie wyrzucaj próbówki.

10. Dodaj do kolumnienki 700 μ l buforu RP2.
Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością.
Wylej przesącz, nie wyrzucaj probówki.

11. Wiruj przez 3 minuty z maksymalną prędkością, aby wysuszyć membranę i pozbyć się z kolumnienki resztek buforów zawierających etanol.

Upewnij się, że w rogu kolumnienki nie został żaden płyn.
Ewentualnie usuń go pipetą i powtórz wirowanie.

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

Objętość elucji i warunki inkubacji mogą być inne. Więcej na temat elucji znajdziesz w rozdziale „Elucja DNA”.

13. 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 ślepa (blank).

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

Protokół 4

Izolacja RNA z tkanek mrożonych


Zanim zaczniesz

- Jeżeli pierwszy raz używasz zestawu Syngen Tissue RNA Mini Kit / Syngen Blood/Cell 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 precipitat, rozpuść go inkubując w 37°C przez kilka minut i mieszając.
- Doprowadź wszystkie bufony do temperatury pokojowej (15-25°C).
- Umieść próbki na lodzie.
- 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 cały nie zostanie zużyty na raz.
- Przygotuj ciekły azot i móżdziej lub homogenizator elektryczny.

Procedura

1. Umieść 30 mg mrożonej tkanki w móżdziej z ciekłym azotem. Przy pomocy tłuczka rozetrzyj tkankę na drobny pył. Przesyp pył z ewentualnymi resztkami ciekłego azotu do probówki 1,5 ml (nie dostarczono). Pozwól na odparowanie pozostałości ciekłego azotu z probówki.

W przypadku tkanek bogatych w RNA lub o dużej gęstości komórek zastosuj połowę porcji. Homogenizację można wykonać inaczej. Więcej szczegółów znajdziesz w rozdziale „Homogenizacja”.

2. Dodaj 350 ul buforu RLK-BME. Przy pomocy strzykawki z igłą 0,9 nabierz i wypuść homogenat 10 razy przez igłę, aż do jego zauważalnego ujednoczenia.
3. Przejdź do Protokołu 3 „Izolacja RNA z tkanek świeżych”, zacznij od miejsca zaznaczonego białą strzałką. 

Protokół 5

Izolacja RNA z hodowli bakteryjnej

Zanim zaczniesz

- Jeżeli pierwszy raz używasz zestawu Syngen Tissue RNA Mini Kit lub Syngen Blood/Cell 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 precipitat, rozpuść go inkubując w 37°C przez kilka minut i mieszając.
- Doprowadź wszystkie buforu do temperatury pokojowej (15-25°C).
- Nastaw łaźnię wodną, blok grzewczy lub termomikser na 37°C.
- Określ liczbę komórek
- Przygotuj roztwór lizozymu 20 mg/ml w buforze 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2 mM EDTA, 1,2% Triton
- 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 cały nie zostanie zużyty na raz.

Procedura:

1. Do eppendorfki (nie dostarczono) dodaj 1 ml hodowli bakteryjnej (1×10^9 komórek).

Zamknij i zwirow przy maksymalnych obrotach przez 2 minuty.

Ostrożnie usuń supernatant nie naruszając pelletu komórek.

W niektórych przypadkach trzeba zastosować mechaniczną homogenizację z kulkami szklanymi.

2. Dodaj 100 ul roztworu lizozymu i zawieś pellet pipetą.
Zamknij i inkubuj przez 10 minut w 37°C.

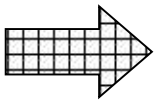
W przypadku bakterii G(+) możliwa będzie potrzeba przedłużenia inkubacji do 30 minut.

3. Dodaj 350 ul buforu RLK-BME, zamknij i wymieszaj na wortexie.
Inkubuj przez 5 minut w temperaturze pokojowej.

4. Zwiruj przy maksymalnych obrotach przez 2 minuty.
Ostrożnie przenieś pipetą supernatant do nowej probówki 1.5 ml (nie dostarczono), nie naruszając osadu.
Wyrzuć probówkę z osadem.
5. Dodaj do lizatu 1 objętość etanolu (70%), zmieszaj pipetą.
6. Umieść kolumnkę R w probówce 2 ml do płukania.
Przenieś całą zawartość probówek z kroku 6 na kolumnkę.
Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością.

Jeśli objętość lizatu w punkcie 6 jest większa niż 700 ul, przenieś na kolumnę tylko 700 ul, zwiruj, usuń przesącz (nie wyrzucaj probówki) i powtarzaj, aż do nałożenia całego lizatu na kolumnę.

7. Przenieś kolumnkę do nowej probówki 2ml (nie dostarczono) i wyrzuć przesącz razem ze starą probówką.
Dodaj do kolumnki 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 kolumnkę, dodaj na sam środek membrany 100 ul roztworu DNazy I, zamknij wieczko i inkubuj przez 15 minut w temperaturze pokojowej.

8. Dodaj do kolumnki 250 ul buforu RP1.
Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością.
Wylej przesącz, nie wyrzucaj probówki.
9. Dodaj do kolumnki 700 ul buforu RP2.
Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością.
Wylej przesącz, nie wyrzucaj probówki.
10. Dodaj do kolumnki 700 ul buforu RP2.
Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością.
Wylej przesącz, nie wyrzucaj probówki.

11. Wiruj przez 3 minuty z maksymalną prędkością, aby wysuszyć membranę i pozbyć się z kolumnienki resztek buforów zawierających etanol.

Upewnij się, że w rogu kolumnienki nie został żaden płyn. Ewentualnie usuń go pipetą i powtórz wirowanie.

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

Objętość elucji i warunki inkubacji mogą być inne. Więcej na temat elucji znajdziesz w rozdziale „Elucja DNA”.

13. 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 kolumnience.

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

Izolacja RNA z hodowli drożdży i grzybów

Zanim zaczniesz

- Jeżeli pierwszy raz używasz zestawu Syngen Tissue RNA Mini Kit lub Syngen Blood/Cell 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 precipitat, rozpuść go inkubując w 37°C przez kilka minut i mieszając.
- Doprowadź wszystkie bufony do temperatury pokojowej (15-25°C).
- Nastaw łaźnię wodną, blok grzejny lub termomikser na 30°C.
- Przygotuj roztwór zymolazy lub litykazy
- Przygotuj bufor z sorbitolem do drożdży lub do grzybów (sporządź na świeżo)
- Przygotuj potrzebną porcję buforu RLK-BME używając 10 ul B-ME na każdy 1 ml buforu RLK. Nie wolno dodawać B-ME do całej
- Przygotuj próbówki wirówkowe większe niż 3 ml lub po 2 próbówki 2.0 ml na każdą próbkę

Procedura dla drożdży:

- 1.1. W większej próbówce wirówkowej (nie dostarczono) umieść 3 ml hodowli drożdży w logarytmicznej fazie wzrostu (OD600=10). Zamknij i wiruj przez 10 minut z prędkością 5000 x g (ok. 7500 rpm).
Usuń supernatant przy pomocy pipety nie naruszając pelletu.
- 1.2. Zawieś komórki w 600 ul buforu z sorbitolem do drożdży.
Dodaj 200U zymolazy lub litykazy.
Inkubuj przez 30 minut w temperaturze 30°C.
- 1.3. Wiruj przez 10 minut z prędkością 5000 x g (ok. 7500 rpm).
Usuń supernatant przy pomocy pipety nie naruszając pelletu.

Procedura dla grzybów:

- 1.1. W eppendorfke (nie dostarczono) umieść 5×10^7 komórek grzybów.
Zamknij i wiruj przez 10 minut z prędkością 5000 x g (ok. 7500 rpm).
Usuń supernatant przy pomocy pipety nie naruszając pelletu.

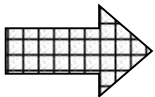
- 1.2. Zawieś pellet w 600 ul buforu z sorbitolem do grzybów.
Dodaj 200U zymolazy lub litykazy.
Inkubuj przez 30 minut w temperaturze 30°C.
- 1.3. Wiruj przez 10 minut z prędkością 2000 x g.
Usuń supernatant przy pomocy pipety nie naruszając pelletu.

Ciąg dalszy procedur:

2. Dodaj 350 ul buforu RLK-BME, zamknij i wymieszaj na wortexie.
Inkubuj przez 5 minut w temperaturze pokojowej.
3. Zwiruj przy maksymalnych obrotach przez 2 minuty.
Ostrożnie przenieś pipetą supernatant do nowej probówki 1.5 ml (nie dostarczono), nie naruszając osadu.
Wyrzuć probówkę z osadem.
4. Dodaj do lizatu 1 objętość etanolu (70%), zmieszaj pipetą.
5. Umieść kolumnkę R w probówce 2 ml do płukania.
Przenieś całą zawartość probówek z kroku 6 na kolumnkę.
Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością.

Jeśli objętość lizatu w punkcie 6 jest większa niż 700 ul, przenieś na kolumnę tylko 700 ul, zwiruj, 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.
Dodaj do kolumnki 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 kolumnkę, dodaj na sam środek membrany 100 ul roztworu DNazy I, zamknij wieczko i inkubuj przez 15 minut w temperaturze pokojowej.

7. Dodaj do kolumnki 250 ul buforu RP1.
Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością.
Wylej przesącz, nie wyrzucaj probówki.

8. Dodaj do kolumnienki 700 μ l buforu RP2.
Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością.
Wylej przesącz, nie wyrzucaj probówki.
9. Dodaj do kolumnienki 700 μ l 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 kolumnienki resztek buforów zawierających etanol.

Upewnij się, że w rogu kolumnienki nie został żaden płyn.
Ewentualnie usuń go pipetą i powtórz wirowanie.

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

Objętość elucji i warunki inkubacji mogą być inne. Więcej na temat elucji znajdziesz w rozdziale „Elucja DNA”.

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°C do -86°C .

Protokół 7

Doczyszczanie RNA

Protokół służy do doczyszczania RNA w roztworach, np. RNA wyizolowanego innymi metodami, w tym trizolem. Przy pomocy zestawu można też zagęścić posiadany roztwór RNA (zdolność wiązania w matrycy to 100 ug RNA, typowa objętość pojedynczej elucji to 50 ul).

Zanim zaczniesz

- Jeżeli pierwszy raz używasz zestawu Syngen Tissue RNA Mini Kit lub Syngen Blood/Cell 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 precipitat, rozpuść go inkubując w 37°C przez kilka minut i mieszając.
- Doprowadź wszystkie bufony do temperatury pokojowej (15-25°C).
- Umieść próbki na lodzie.
- 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 cały nie zostanie zużyty na raz.

Procedura

1. Do eppendorfki (nie dostarczono) dodaj 100 ul roztworu RNA. Dodaj 350 ul buforu RLK-BME i wymieszaj na worteksie. Inkubuj w temperaturze pokojowej przez 5 minut.

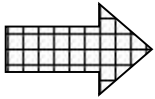
W przypadku mniejszej objętości RNA, dopełnij je wodą do 100 ul.

W przypadku większej objętości RNA, odpowiednio powiększ objętość buforu RLK-BME i etanolu 70%.

2. Zwiruj próbki, aby usunąć krople z wieczka. Dodaj 1 objętość etanolu (70%), zamknij i zmieszaj na worteksie.
3. Umieść kolumnkę R w próbce 2 ml do płukania. Przenieś całą zawartość próbek z kroku 6 na kolumnkę. Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością.

Jeśli objętość lizatu w punkcie 6 jest większa niż 700 ul, przenieś na kolumnę tylko 700 ul, zwiruj, usuń przesącz (nie wyrzucaj próbek) i powtarzaj, aż do nałożenia całego lizatu na kolumnę.

4. Przenieś kolumnkę do nowej probówki 2ml (nie dostarczono) i wyrzuć przesącz razem ze starą probówką.
Dodaj do kolumnki 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 kolumnkę, dodaj na sam środek membrany 100 ul roztworu DNazy I, zamknij wieczko i inkubuj przez 15 minut w temperaturze pokojowej.

5. Dodaj do kolumnki 250 ul buforu RP1.
Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością.
Wylej przesącz, nie wyrzucaj probówki.
6. Dodaj do kolumnki 700 ul buforu RP2.
Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością.
Wylej przesącz, nie wyrzucaj probówki.
7. Dodaj do kolumnki 700 ul buforu RP2.
Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością.
Wylej przesącz, nie wyrzucaj probówki.
8. Wiruj przez 3 minuty z maksymalną prędkością, aby wysuszyć membranę i pozbyć się z kolumnki resztek buforów zawierających etanol.

Upewnij się, że w rogu kolumnki nie został żaden płyn.
Ewentualnie usuń go pipetą i powtórz wirowanie.

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

Wiruj przez 2 minuty w temperaturze pokojowej z maksymalną prędkością.

Objętość elucji i warunki inkubacji mogą być inne. Więcej na temat elucji znajdziesz w rozdziale „Elucja DNA”.

10. Ostrożnie wysuń kolumnkę i zamknij wieczko w probówce z wyizolowanym RNA.

Nie wyrzucaj kolumnki 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 ślełą (blank).

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

Samodzielne rozwiązywanie problemów

Za niska czystość A260/A280

Przyczyna	Rozwiązanie
Zanieczyszczenia wprowadzone przez użytkownika	Stosuj się do wskazówek w rozdziałach „Ogólne wytyczne dotyczące obsługi zestawów Syngen DNA” (3 akapit – nakładaj bufory 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 za grubej igły w strzykawce	- Powtórz izolację. Użyj odpowiedniej igły - Powtórz izolację. Przedłuż trawienie
Niewydajna liza z powodu niewystarczających warunków inkubacji	Powtórz izolację. Wydłuż dwukrotnie inkubację z buforem RLK-BME
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 podanym w procedurze
Nie dodano etanolu do buforu płuczącego przed pierwszym użyciem lub zastosowano etanol o złym stężeniu	Powtórz izolację, przygotuj prawidłowo bufory, upewnij się, że używasz etanolu o stężeniu podanym w procedurze
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
Niewydajna liza z powodu za grubej igły w strzykawce	- Powtórz izolację. Użyj odpowiedniej igły - Powtórz izolację. Przedłuż trawienie
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 podanym w procedurze
Nie dodano etanolu do buforu płuczącego przed pierwszym użyciem lub zastosowano etanol o złym stężeniu	Powtórz izolację, przygotuj prawidłowo bufory, upewnij się, że używasz etanolu o stężeniu podanym w procedurze
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”

Brązowy osad na membranie w kolumnie

Przyczyna	Rozwiązanie
Niewydajna liza z powodu za dużej ilości komórek w próbce	Powtórz izolację. Zmniejsz ilość próbki do zalecanej porcji
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
Niewydajna liza z powodu za grubej igły w strzykawce	- Powtórz izolację. Użyj odpowiedniej igły - Powtórz izolację. Przedłuż trawienie
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 podanym w procedurze
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 podanym w procedurze

Kolumnienka zatkała się

Przyczyna	Rozwiązanie
Skrzep w próbce	Powtórz izolację z nowej próbki. Pobierając krew stosuj się do wskazówek z rozdziału „Materiał wyjściowy i wydajność RNA”, zastosuj antykoagulant
Próbka jest zbyt gęsta lub lepka	Powtórz izolację z mniejszej ilości próbki
Elementy stałe w lizacie	Usuń z lizatu elementy stałe np. przez odwirowanie, użyj nowej kolumnienki
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
Niewydajna liza z powodu za grubej igły w strzykawce	- Powtórz izolację. Użyj odpowiedniej igły - Powtórz izolację. Przedłuż trawienie



facebook.com/SyngenBiotech

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

54-116 Wrocław, ul. Ostródzka 13

kolumienki.pl, syngen.pl, info@syngen.pl

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

