

## Syngen Tissue RNA Mini Kit

### Protokół dodatkowy

### Izolacja RNA z kleszcza

#### Zawartość opakowania i warunki przechowywania

Syngen Tissue RNA Mini Kit	zestaw demo	SY321010	SY321011	SY321012
<b>Liczba izolacji</b>	<b>4</b>	<b>50</b>	<b>100</b>	<b>300</b>
Kolumienki R	4	50	100	300
Kolumienki klarujące KL	4	50	100	300
Probówki do elucji 1,5 ml	4	50	100	300
Homogenizator H	4	50	100	300
Bufor RLK	2 x 1,5 ml	25 ml	45 ml	130 ml
Bufor RP1	2 x 1,5 ml	30 ml	60 ml	170 ml
Bufor RP2	1,5 ml	15 ml	35 ml	2 x 50 ml
Probówki 2 ml	8	100	200	600
Woda wolna od RNaz	0,5 ml	6 ml	6 ml	2 x 8 ml

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

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

- Etanol (96-100%)
- Etanol (70%)
- Beta-merkaptoetanol (B-ME)
- PBS
- Probówki 1,5 ml i 2 ml (eppendorfki)
- Statyw
- Sterylne końcówki do pipet (najlepiej z filtrem)
- Pipety automatyczne nastawne
- Mikrowirówka
- Wortex
- Woda destylowana (czystości do PCR)

#### Przygotowanie odczynników przed pierwszym użyciem

##### Bufor płuczący

Bufor płuczący RP2 jest dostarczany jako koncentrat. Przed pierwszym użyciem dodaj do niego 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 zakrętcie.

Bufor RP2 po dodaniu etanolu powinien być szczelnie zamknięty i przechowywany w temperaturze pokojowej. Przed rozpoczęciem procedury zawsze wymieszaj rozpuszczone bufor przez obrócenie butelki kilka razy.

##### Materiał wyjściowy

Ilość materiału na 1 izolację: 1 kleszcz

#### Zanim zaczniesz

1. Upewnij się, że homogenizator H ściśle pasuje do kształtu wnętrza probówki 1,5 ml (eppendorfki, niedostarczona), którą posiadasz. 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.
2. Do buforu RP2 dodaj odpowiednią ilość 96-100% etanolu.
3. Jeżeli w którymś buforze wytrącił się precypitat, rozpuść go inkubując w 37°C przez kilka minut i mieszając.
4. Doprowadź wszystkie bufor do temperatury pokojowej (15-25°C).
5. 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.

#### PROTOKÓŁ IZOLACJA RNA Z KLESZCZA

1. Przy pomocy homogenizatora H rozgnieć kleszcza wewnątrz probówki.
2. Do probówki z kleszczem dodaj 200 ul PBS. Wygnieć kleszcza ponownie pozostawiając PBS w probówce.
3. Do probówki z homogenatem dodaj 350 ul buforu RLK-BME i kontynuuj ucieranie przy pomocy homogenizatora H pozostawiając cały homogenat w probówce. Wyciągnij homogenizator H z probówki.
4. OPCJA (wykonaj lub przejdź do następnego kroku): Umieść kolumienkę klarującą w probówce 2 ml. Przenieś zawartość probówki z kroku 1 na kolumienkę. Zamknij wieczko i wiruj przez 2 minuty z maksymalną prędkością. Usuń kolumienkę KL ze stałymi cząstkami lizatu.
5. Przenieś przesącz do nowej probówki 1,5 lub 2 ml z wieczkiem (nie dostarczone). Dodaj 1 objętość etanolu (70%), zamknij i zmieszaj na wortexie. Nie wiruj.
6. Umieść kolumienkę R w probówce 2 ml do płukania (dostarczone). Przenieś całą zawartość probówki z kroku 4 na kolumienkę. Zamknij wieczko.

Jeżeli objętość lizatu 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. Wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością (18.000 x g).
8. Przenieś kolumienkę do nowej probówki 2 ml (nie dostarczono). Wyrzuć przesącz razem ze starą probówką.
9. Dodaj do kolumienki 250 ul buforu RP1. Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością. Wylej przesącz, nie wyrzucaj probówki.
10. Powtórz krok 8.
11. Dodaj do kolumienki 700 ul buforu RP2. Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością. Wylej przesącz, nie wyrzucaj probówki.
12. Powtórz krok 10.
13. 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. Ewentualnie usuń go pipetą i powtórz wirowanie.
14. Przenieś kolumienkę do probówki elucyjnej 1,5 ml i wyrzuć starą probówkę z resztkami buforu płuczącego. Ostrożnie, nie dotykając membrany, dodaj na sam środek membrany 50 ul wody wolnej od RNaz. Zamknij wieczko i inkubuj przez 3 minuty w RT.
15. Wiruj przez 2 minuty w RT z maksymalną prędkością.
16. Ostrożnie wysuń kolumienkę i zamknij wieczko w probówce z wyizolowanym RNA. Wyizolowane RNA należy przechowywać w temperaturze od -70°C do -86°C.

**Producent**

Syngen Biotech Sp. z o.o. Sp. k.  
54-116 Wrocław, ul. Ostródzka 13  
tel. 71 349 70 13, 71 349 91 66, 71 349 61 67, faks 71 349 70 33  
kolumienki.pl, syngen.pl, info@syngen.pl