

## **Syngen miRNA Mini Kit**

Zestawy do izolacji miRNA z próbek:

- komórek
- tkanek świeżych
- tkanek mrożonych
- płynów ustrojowych

Opcjonalna izolacja wielkocząsteczkowego RNA

**Instrukcja dla użytkownika, w. 2015.09.1**

Dziękujemy za wybór zestawu serii Syngen RNA i okazane nam zaufanie. Seria Syngen RNA to wysokiej jakości zestawy odczynników do izolacji miRNA i innych niskocząsteczkowych RNA oraz całkowitego RNA z szerokiej gamy próbek, m.in. tkanek i komórek. 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 miRNA 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.

## Spis treści

Informacje wstępne	2
Ograniczenia	2
Zawartość zestawów	4
Przechowywanie	4
Sprzęt i odczynniki potrzebne do wykonania procedury, a niedostarczone z zestawem	4
Przygotowanie odczynników przed pierwszym użyciem	5
Materiał wyjściowy	6
Homogenizacja	7
Elucja RNA	8
Izolacja RNA wielkocząsteczkowego	9
Trawienie DNA na kolumnie	9
Ogólne wytyczne do pracy z RNA	10
Ogólne wytyczne dotyczące obsługi zestawów Syngen	12
Protokoły	
<b>Protokół 1: Izolacja miRNA z komórek</b>	<b>13</b>
<b>Protokół 2: Izolacja miRNA z tkanek</b>	<b>19</b>
<b>Protokół 3: Izolacja miRNA z płynów ustrojowych pozbawionych komórek</b>	<b>22</b>
<b>Protokół 3: Izolacja wielkocząsteczkowego RNA</b>	<b>22</b>
Samodzielne rozwiązywanie problemów	24
Przewodnik po zestawach serii Syngen®	28

## Zawartość zestawu

<b>Syngen miRNA Mini Kit</b>	<b>SY391210</b>
<b>Liczba izolacji</b>	<b>100</b>
Kolumnienki mR	200
Bufor lizujący mRL	25 ml
2M Octan sodu	2,5 ml
Bufor płuczący mRP – koncentrat	5 ml
Bufor elucyjny mRE	5,5 ml
Probówki do płukania 2 ml	200

## Przechowywanie

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

Przechowywanie kolumnienek mR w wyższej temperaturze jest zabronione.

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

Do wszystkich protokołów:

- Etanol (96-100%)
- Chloroform
- Fenol uwodniony
- Probówki 1.5 ml i 2.0 ml (eppendorfki)
- Statyw
- Sterylne końcówki do pipet z filtrem
- Pipety automatyczne nastawne
- Mikrowirówka 12.000-14.000 rpm
- Worteks
- Łaźnia wodna lub blok grzejny na 65°C
- Pokruszony lód (mokry, temperatura 0°C)
- Rękawiczki beztalkowe

Do izolacji miRNA z tkanek:

- Jednorazowa strzykawka z igłą grubości 0,9 (średnica wewnętrzna ok. 0,6 mm) o jak najmniejszej pojemności.
- Homogenizator H [Syngen, SY391098 lub SY391096] lub homogenizator elektryczny wykorzystujący jednorazowe elementy mające kontakt z próbką.

Do izolacji miRNA z hodowli komórkowej:

- Trypsyna lub skrobak (do komórek rosnących w monowarstwie)
- Medium hodowlane
- PBS lub płyn Hanksa, wolne od RNaz, Ca<sup>2+</sup> i Mg<sup>2+</sup>
- Przyrządy do liczenia komórek

Do izolacji miRNA z płynów ustrojowych niezawierających komórek:

- Większa ilość buforu mRL

Do izolacji wielkocząsteczkowego RNA:

- Roztwór DNazy I o stężeniu 0,5 U/ul
- Dodatkowa porcja buforu płuczącego mRP

## Przygotowanie odczynników przed pierwszym użyciem

### Bufor płuczący

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

<b>Syngen miRNA Mini Kit</b>	<b>SY391210</b>
Objętość etanolu, jaką należy dodać do koncentratu buforu płuczącego mRP	20 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

Zestaw Syngen miRNA Mini służy do izolacji miRNA oraz innych niskocząsteczkowych RNA mniejszych niż 200 nukleotydów z tkanek świeżych i mrożonych, hodowli komórkowych a także z płynów ustrojowych pozbawionych komórek. Wyizolowany miRNA 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.

<b>Materiał wyjściowy</b>	<b>Maksymalna ilość na 1 izolację</b>
Tkanki świeże lub mrożone	10-25 mg
Komórki (hodowla)	1 x 10 <sup>6</sup>

Nie należy przekraczać maksymalnej ilości tkanki 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.

#### Płyny ustrojowe pozbawione komórek

Do izolacji można użyć surowicy, osocza, płynu mózgowo-rdzeniowego oraz innych płynów ustrojowych nieposiadających komórek. Stosując inną niż 200ul ilość próbki należy dostosować proporcjonalnie ilości używanego buforu mRL, octanu sodu, fenolu i chloroformu.

#### Tkanki

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

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. W przypadku tkanek ubogich w komórki można odpowiednio zwiększyć ilość materiału użytego do izolacji. Każdy z przypadków należy przetestować i stosować ilość materiału dającą najlepsze rezultaty.

#### Komórki

Komórki z hodowli przygotowuje się do izolacji poprzez zebranie i przemycie w PBS. Komórki rosnące w zawiesinie 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 cm<sup>2</sup> hodowli zawiera od 1x10<sup>5</sup> do 1,5x10<sup>5</sup> komórek. W każdym dołku płytki 6-dołkowej rośnie około 1x10<sup>6</sup> komórek.

## **Homogenizacja**

W procesie izolacji miRNA z tkanek homogenizacja jest kluczowym etapem, mającym wyraźny wpływ na wydajność izolacji, jednocześnie wprowadzającym najwięcej zagrożeń dla izolowanego materiału.

Do homogenizacji mogą posłużyć jednorazowe plastikowe homogenizatorki H [SY391098 z probówkami lub SY391096 bez probówek] do zastosowania w probówce 1,5 ml (eppendorfce). Przy ich użyciu należy rozgnieść tkankę o ścianki i dno próbki. Ten sposób homogenizacji jest wystarczający dla większości miękkich tkanek. Stosując własne próbki 1,5 ml należy przed rozpoczęciem homogenizacji zwrócić uwagę na to, czy homogenizator ściśle pasuje do kształtu wnętrza probówek. Jeśli homogenizator nie sięga dna próbki (opiera się o ukośne ścianki ponad dnem) lub występuje luz pomiędzy ukośnymi ściankami próbki, a końcem homogenizatora (po oparciu końca o dno), należy użyć do homogenizacji probówek od producenta homogenizatora H [SY391092].

W przypadku tkanek twardych lub włóknistych (jak skóra, ściana serca, ścięgna) można zastosować elektryczny homogenizator typu ostrzowego lub kulowego, koniecznie wykorzystującego jednorazowe elementy mające kontakt z próbką. W takim wypadku homogenizację wykonujemy w buforze mRL, a ewentualną pianę usuwamy przez wirowanie.

Ze względu na wyjątkowo dużą wrażliwość miRNA nie zalecamy ręcznego ucierania tkanki w moździerz z ciekłym azotem.



Drugi etap homogenizacji połączony z lizą chemiczną wykonuje się przepuszczając kilkakrotnie wstępny homogenat przez jednorazową strzykawkę z igłą 0,9 (średnica wewnętrzna ok. 0,6 mm) o jak najmniejszej pojemności.

### **Elucja miRNA**

Typowa objętość elucji wynosi 50 ul i jest wystarczająca dla zdecydowanej większości próbek. Elucję miRNA z kolumny należy wykonywać dostarczonym buforem mRE podgrzanym do 65°C.

Ewentualną elucję wielkocząsteczkowego RNA z pierwszej kolumny można wykonać buforem mRE lub wodą wolną 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.

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


### **Izolacja wielkocząsteczkowego RNA**

Zestawy Syngen miRNA Mini pozwalają na otrzymanie miRNA oraz wielkocząsteczkowego RNA w dwóch osobnych probówkach. W tym celu zastosowano selektywne wiązanie różnych wielkości RNA na dwóch osobnych kolumnach w środowisku o różnym stężeniu etanolu. Przed właściwą izolacją miRNA lizat nakładany jest na pierwszą kolumnę, na której następuje wiązanie wielkocząsteczkowego RNA i DNA. Następnie na drugiej kolumnie następuje wiązanie miRNA i niskocząsteczkowych RNA mniejszych niż 200 nt.

Aby wyizolować wielkocząsteczkowy RNA należy przeprowadzić kroki płukania oraz elucji także z pierwszej kolumny. Procedura została opisana w dodatkowym protokole. Odtworzenie naturalnego stosunku miRNA/RNA następuje po połączeniu w całości obu izolatów.

## Trawienie DNA na kolumnie

W przypadku izolacji wielkocząsteczkowego RNA z pierwszej kolumny 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. 

## 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. Błat 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 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 próbki 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, o ile w protokole nie podano inaczej, 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.

## Protokół 1

### Izolacja miRNA z komórek

Zanim zaczniesz

- Jeżeli pierwszy raz używasz zestawu Syngen miRNA 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).
- Przygotuj lód i ewentualnie schłódź wirówkę do +10°C.
- Podgrzej bufor elucyjny mRE do temperatury 65°C.
- 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. Przenieś maksymalnie  $1 \times 10^6$  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.

2. Dodaj 200  $\mu\text{l}$  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.

3. Do pelletu komórek dodaj 200  $\mu\text{l}$  Buforu mRL i zamieszaj pipetując lub energicznie zworteksuj.  
Inkubuj w temperaturze pokojowej przez 10 minut
4. Dodaj 20  $\mu\text{l}$  dostarczonego 2M Octanu sodu, zamieszaj pipetując.
5. Dodaj 180  $\mu\text{l}$  uwodnionego fenolu i 40  $\mu\text{l}$  chloroformu.  
Zamknij i worteksuj energicznie przez 2 minuty.  
Ostrożnie uchyl wieczko probówki, aby wyrównać ciśnienia i ponownie je zamknij.
6. Wiruj przez 3 minuty z prędkością 12.000 rpm.
7. Przejdź do dalszej części Protokołu, zacznij od miejsca oznaczonego białą strzałką. 

## Procedura dla komórek rosnących na powierzchni – trypsyna

1. Usuń medium, przemyj powierzchnię PBS bez  $Mg^{2+}$  i  $Ca^{2+}$  lub płynem Hanksa bez  $Mg^{2+}$  i  $Ca^{2+}$ , usuń płyn.
2. Dodaj 0,10-0,25% roztwór trypsyny.  
Gdy komórki zaczną się odrywać, dolej medium, aby zatrzymać działanie trypsyny i zawieś komórki przez pipetowanie.
3. Przenieś maksymalnie  $1 \times 10^6$  komórek do probówki 1,5 ml (nie dostarczono). Trzymaj probówkę na lodzie.  
Wiruj przez 5 minut z prędkością 300 x g w temperaturze  $+10^{\circ}C$ .  
Ostrożnie usuń cały supernatant, nie naruszając pelletu.

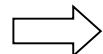
Uwaga: Pellet komórek może być niewidoczny lub tworzyć nalot na ukośnej ścianie wewnątrz probówki.

4. Dodaj 200 ul PBS lub płynu Hanksa i zawieś komórki – można zastosować energiczne worteksowanie. Trzymaj probówkę na lodzie.  
Wiruj przez 5 minut z prędkością 300 x g w temperaturze  $+10^{\circ}C$ .  
Ostrożnie usuń cały supernatant, nie naruszając pelletu.


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

5. Do pelletu komórek dodaj 200 ul Buforu mRL i zamieszaj pipetując lub energicznie zworteksuj.  
Inkubuj w temperaturze pokojowej przez 10 minut
6. Dodaj 20 ul dostarczonego 2M Octanu sodu, zamieszaj pipetując.
7. Dodaj 180 ul uwodnionego fenolu i 40 ul chloroformu.  
Zamknij i worteksuj energicznie przez 2 minuty.  
Ostrożnie uchyl wieczko probówki, aby wyrównać ciśnienia i ponownie je zamknij.  
Wiruj przez 3 minuty z prędkością 12.000 rpm.

Przejdź do dalszej części Protokołu, zacznij od miejsca oznaczonego białą strzałką.

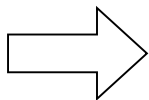


## Procedura dla komórek rosnących na powierzchni – skrobak

1. Usuń część medium, zostaw ok. 1-2 mm warstwę na powierzchni komórek.  
Zeskrob komórki z powierzchni, zawieś je w medium pipetując.
2. Przenieś maksymalnie  $1 \times 10^6$  komórek do probówki 1,5 ml (nie dostarczono). Trzymaj probówkę na lodzie.  
Wiruj przez 5 minut z prędkością 300 x g w temperaturze +10°C.  
Ostrożnie usuń cały supernatant, nie naruszając pelletu.  
Uwaga: Pellet komórek może być niewidoczny lub tworzyć nalot na ukośnej ścianie wewnątrz probówki.
3. Dodaj 200 ul PBS lub płynu Hanksa i zawieś komórki – można zastosować energiczne worteksowanie. 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.
4. Do pelletu komórek dodaj 200 ul Buforu mRL i zamieszaj pipetując lub energicznie zworteksuj.  
Inkubuj w temperaturze pokojowej przez 10 minut
5. Dodaj 20 ul dostarczonego 2M Octanu sodu, zamieszaj pipetując.
6. Dodaj 180 ul uwodnionego fenolu i 40 ul chloroformu.  
Zamknij i worteksuj energicznie przez 2 minuty.  
Ostrożnie uchyl wieczko probówki, aby wyrównać ciśnienia i ponownie je zamknij.  
Wiruj przez 3 minuty z prędkością 12.000 rpm.
7. Przejdź do dalszej części Protokołu, zacznij od miejsca oznaczonego białą strzałką. 




Procedura



8. Przenieś 200 ul górnej fazy do nowej probówki 1,5 ml lub 2,0 ml z wieczkiem (nie dostarczono).  
Dodaj 110 ul etanolu 96-100%, zamknij i zmieszaj na wortexsie.  
Nie wiruj.

9. Umieść kolumnienkę mR w probówce 2 ml.  
Przenieś całą zawartość probówki z kroku 8 na kolumnienkę.  
Zamknij i inkubuj przez 1 minutę w temperaturze pokojowej.  
Wiruj przez 30 sekund z maksymalną prędkością.  
Zachowaj przesącz i sprawdź jego objętość.

Jeśli planujesz równoczesną izolację wielkocząsteczkowego RNA, przenieś kolumnienkę mR do nowej probówki i przejdź do protokołu „Izolacja wielkocząsteczkowego RNA” do miejsca oznaczonego czarną strzałką. 

10. Do 300 ul przesączu dodaj 350 ul etanolu 96-100%, zamknij i zmieszaj na wortexsie. Nie wiruj.

11. Umieść nową kolumnienkę mR w nowej probówce 2 ml.  
Przenieś całą zawartość probówki z kroku 10 na kolumnienkę.  
Inkubuj przez 1 minutę w temperaturze pokojowej.  
Wiruj przez 30 sekund z maksymalną prędkością.  
Wylej przesącz, nie wyrzucaj probówki.

12. Otwórz kolumnienkę, dodaj 200 ul buforu mRP.  
Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością.

13. Wylej przesącz, nie wyrzucaj probówki.  
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.

14. Przenieś kolumnkę 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 podgrzanego do 65°C Buforu mRE.  
Zamknij wieczko i inkubuj przez 3 minuty w temperaturze pokojowej, aż bufor wsiąknie w membranę.  
Wiruj przez 1 minutę w temperaturze pokojowej z maksymalną prędkością.
  
15. Ostrożnie wysuń kolumnkę i zamknij wieczko w probówce z wyizolowanym miRNA.

Nie wyrzucaj kolumnki do czasu sprawdzenia wyizolowanego miRNA. Jak w przypadku każdej metody chromatograficznej, niewłaściwe warunki elucji (np. pH) mogą wyraźnie zmniejszyć wydajność elucji, a nawet uniemożliwić ją, powodując pozostanie całego RNA na kolumnie.

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

## Protokół 2

### Izolacja miRNA z tkanek

#### Zanim zaczniesz

- Jeżeli pierwszy raz używasz zestawu Syngen miRNA 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).
- Przygotuj lód z wodą i umieść próbki na lodzie.
- Podgrzej bufor elucyjny mRE do temperatury 65°C.
- Przygotuj homogenizator: jednorazowe homogenizatory H, ciekły azot i moździerz lub homogenizator elektryczny. Upewnij się, że twoje probówki 1,5 ml (eppendorfki) pasują do homogenizatora H, ewentualnie zamień probówki na odpowiednie.

## Procedura

1. W eppendorfce (nie dostarczono) umieść 10-25 mg świeżej tkanki.

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

2. Przy pomocy homogenizatora H [SY391098] rozgnieć tkankę wewnątrz probówki do uzyskania jednolitej masy.  
Dodaj 200 ul buforu mRL i kontynuuj ucieranie przy pomocy homogenizatora H.  
Usuń homogenizator H pozostawiając cały homogenat w probówce.

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

3. Przy pomocy jednorazowej strzykawki z igłą nabierz i wypuść homogenat 10 razy przez igłę, aż do jego zauważalnego ujednoczenia.
4. Dodaj 20 ul dostarczonego 2M Octanu sodu, zamieszaj pipetując.
5. Dodaj 180 ul uwodnionego fenolu i 40 ul chloroformu.  
Zamknij i worteksuj energicznie przez 2 minuty.  
Ostrożnie uchył wieczko probówki, aby wyrównać ciśnienia i ponownie je zamknij.
6. Wiruj przez 3 minuty z prędkością 12.000 rpm.
7. Przejdź do Protokołu 1 „Izolacja miRNA z komórek”, zacznij od miejsca zaznaczonego białą strzałką.



## Protokół 3

### Izolacja miRNA z płynów ustrojowych

#### Zanim zaczniesz

- Jeżeli pierwszy raz używasz zestawu Syngen miRNA 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).
- Przygotuj lód z wodą i umieść próbki na lodzie.
- Podgrzej bufor elucyjny mRE do temperatury 65°C.

## Procedura

1. Do eppendorfki (nie dostarczono) dodaj do 200 ul płynów ustrojowych.

W przypadku zastosowania innej ilości próbki należy proporcjonalnie dostosować ilość odczynników stosowanych w krokach od 2 do 5 włącznie.

2. Dodaj 200 ul buforu mRL, zamknij i energicznie wymieszaj.
3. Inkubuj przez 10 minut w temperaturze pokojowej
4. Dodaj 50 ul dostarczonego 2M Octanu sodu, zamieszaj pipetując.
5. Dodaj 450 ul uwodnionego fenolu i 200 ul chloroformu.  
Zamknij i worteksuj energicznie przez 2 minuty.  
Ostrożnie uchyl wieczko probówki, aby wyrównać ciśnienia i ponownie je zamknij.
6. Wiruj przez 3 minuty z prędkością 12.000 rpm.
7. Przejdź do Protokołu 1 „Izolacja miRNA z komórek”, zacznij od miejsca zaznaczonego białą strzałką.

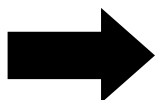


## Protokół 4

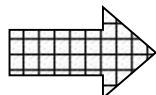
### Izolacja wielkocząsteczkowego RNA

Zanim zaczniesz

- Jeżeli pierwszy raz używasz zestawu Syngen miRNA Mini Kit, najpierw przeczytaj wszystkie rozdziały poprzedzające protokoły.
- Przygotuj dodatkowa porcję buforu mRP i roztwór DNazy I.
- Jeżeli izolujesz RNA z komórek, przeczytaj i wykonaj Protokół 1 „Izolacja miRNA z komórek” do miejsca oznaczonego czarną strzałką, a następnie wykonaj poniższą procedurę.
- Jeżeli izolujesz RNA z tkanek, przeczytaj i wykonaj Protokół 2 „Izolacja miRNA z tkanek” do miejsca oznaczonego czarną strzałką, a następnie wykonaj poniższą procedurę.



Procedura

1. Umieść kolumnienkę w nowej probówce 2 ml (nie dostarczono).  
Otwórz i dodaj 200 ul buforu mRP.  
Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością.  
Wylej przesącz, nie wyrzucaj probówki.
2. Zalecana opcja – trawienie DNazą na kolumnie:  
 Otwórz kolumnienkę, dodaj na sam środek membrany 100 ul roztworu DNazy I, zamknij wieczko i inkubuj przez 15 minut w temperaturze pokojowej.  
Wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością.  
Wylej przesącz, nie wyrzucaj probówki.

3. Otwórz kolumnienkę i dodaj 200  $\mu$ l buforu mRP.  
Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością.  
Wylej przesącz, nie wyrzucaj probówki.
4. 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.
5. Przenieś kolumnienkę do probówki elucyjnej 1,5 ml i wyrzuć starą probówkę z resztkami buforu płuczącego.  
Ostrożnie, nie dotykając membrany, dodaj na sam środek membrany 50  $\mu$ l Buforu mRE lub wody wolnej od RNaz o pH=7.5-9.0.  
Zamknij wieczko i inkubuj przez 3 minuty w temperaturze pokojowej, aż bufor wsiąknie w membranę.  
Wiruj przez 1 minutę w temperaturze pokojowej z maksymalną prędkością.
6. 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  $-86^{\circ}\text{C}$ .



### Samodzielne rozwiązywanie problemów

Fazy wodna i organiczna nie rozdzielają się

Przyczyna	Rozwiązanie
Nie dolano chloroformu lub dodano chloroform z alkoholem izoamylowym	Sprawdź, czy dolano czysty chloroform
Niedostatecznie wymieszano po dolaniu chloroformu	Zwróć uwagę na energiczne wytrząsanie z chloroformem
Zanieczyszczenia w materiale startowym	Zadbaj o brak jakichkolwiek dodatków w materiale startowym

Kolumnienka zatkała się

Przyczyna	Rozwiązanie
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 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 mRL

Za niska czystość A260/A280 wielkocząsteczkowego RNA

Przyczyna	Rozwiązanie
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 mRL
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
Duża zawartość DNA w izolacie z powodu pominięcia trawienia DNazą	Powtórz izolację, wykonaj trawienie DNA na kolumnie

#### miRNA zanieczyszczone wielkocząsteczkowym RNA

Przyczyna	Rozwiązanie
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
Dodano etanol do próbki w niewłaściwym stosunku	Zwróć uwagę, czy próbka przed dodaniem etanolu ma założoną objętość (200 ul i 300 ul) i ewentualnie skoryguj ilość dodawanego etanolu. Po pierwszym dodaniu końcowe stężenie etanolu w próbce powinno wynosić 35%, po drugim dodaniu – 70%.

#### 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 mRL
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

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
Warunki utrwalania tkanki w formalinie i parafinie zniszczyły RNA w próbce	Nic nie da się zrobić
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 mRL
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



[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

