

fix RNA

Roztwór do przechowywania i ochrony przed degradacją próbek przeznaczonych do izolacji RNA

● kat. nr. E0280



<https://eurx.pl/e0280>

EURx Ltd. 80-297 Gdansk Poland
ul. Przyrodników 3, NIP 957-07-05-191
KRS 0000202039, www.eurx.com.pl
orders: email: orders@eurx.com.pl
tel. +48 58 524 06 97, fax +48 58 341 74 23





Spis treści

Uwagi wstępne.....	3
Izolacja RNA z zabezpieczonych próbek.....	4
Tkanki zwierzęce i roślinne	5
Hodowle komórkowe	6
Hodowle bakteryjne	6
Krew ludzka.....	7

Składniki zestawu	E0280-01	E0280-02	E0280-03	Warunki przechowywania
<i>fix</i> RNA	100 ml	200 ml	500 ml	15-25°C
Protokół	1	1	1	

Uwagi wstępne

UWAGA 1 • Przeznaczenie odczynnika. Roztwór *fix* RNA służy do przechowywania niewielkich ilości tkanek zwierzęcych, roślinnych, komórek bakteryjnych, hodowli komórkowych lub ludzkich leukocytów. Do zabezpieczenia i przechowywania krwi całkowitej zalecamy użycie zestawu Universal Blood RNA (E3594) i zawartego w nim buforu Lyse Blood. Komponenty buforu *fix* RNA zabezpieczają RNA przed degradacją umożliwiając długoterminowe przechowywanie próbki i efektywną izolację RNA w dowolnym czasie. Do zabezpieczenia w buforze *fix* RNA należy używać świeżych tkanek lub hodowli.

UWAGA 2 • Przechowywanie stabilizowanych próbek. Próbkę zawieszoną w roztworze *fix* RNA można przechowywać do 7 dni w temperaturze pokojowej lub do 4 tygodni w lodówce (4–8°C). Dłuższe przechowywanie zalecane jest w temperaturze -20°C lub -80°C. W tym celu należy pozostawić próbkę na około 8-12 godzin w temp. 4–8°C aby składniki buforu dokładnie wniknęły w preparat. Następnie umieścić próbkę w temp. -20°C lub wydobyć ją z roztworu (usunąć roztwór *fix* RNA) i umieścić w temp. -80°C.

UWAGA 3 • Maksymalna ilość użytego materiału. Ilość użytego materiału ogranicza jedynie objętość roztworu użytego do stabilizacji oraz objętość pojemników służących do przechowywania próbek. Należy kierować się zasadą używania 10 µl roztworu *fix* RNA na 1 mg tkanki lub ok. 10 objętości odczynnik na 1 objętość próbki. Należy też pamiętać o odpowiednim rozdrobieniu materiału (tkanki zwierzęce i roślinne) pozwalającym na swobodne i dokładne wniknięcie odczynnik w głąb preparatu.

UWAGA 4 • Przechowywanie komponentów zestawu. Po rozpakowaniu roztwór należy przechowywać w temperaturze pokojowej. W przypadku precypitacji komponentów, w celu rozpuszczenia osadu, bufor należy ogrzać do ok. 40°C a następnie po schłodzeniu do temperatury pokojowej można go użyć do zabezpieczenia preparatów.

UWAGA 5 • Dobra praktyka laboratoryjna. Roztwór należy przechowywać szczelnie zamknięty, aby uniknąć zmiany stężeń w wyniku parowania.

Isolacja RNA z zabezpieczonych próbek

Do izolacji RNA z preparatów zabezpieczonych roztworem fix RNA polecamy zestawy GeneMatrix naszej firmy, w szczególności **Universal RNA** (E3598), **Universal RNA/miRNA** (E3599), **Human Blood RNA** (E3596) oraz mieszaninę fenolu i soli chaotropowych RNA Extracol (E3700). Do zabezpieczania i izolacji RNA z krwi pełnej polecamy zestaw **Universal Blood RNA** (E3594).

Przed przystąpieniem do izolacji RNA roztwór fix RNA należy usunąć. W przypadku tkanek zwierzęcych lub roślinnych należy wyciągnąć je np. przy pomocy jałowej pincety z roztworu i umieścić przed homogenizacją w odpowiednim buforze z wybranego zestawu (bufor **RL** lub **LG** lub **Lyse ALL**) zgodnie z protokołem do danego zestawu. W przypadku bardzo rozdrobnionego materiału, komórek bakteryjnych, zwierzęcych lub leukocytów roztwór fix RNA należy usunąć przez wirowanie i zlanie z nad osadu komórkowego. Następnie osad należy zawiesić w buforze lizującym z wybranego zestawu zgodnie z protokołem izolacji RNA z wybranego zestawu.

- *W razie problemów z odwirowaniem osadu związanych ze zwiększoną gęstością roztworu fix RNA bezpośrednio przed wirowaniem i izolacją próbkę należy rozcieńczyć wodą wolną od RNaz (E0210). W większości przypadków wystarcza rozcieńczenie 2:1 (dwie objętości roztworu fix RNA i jedna objętość wody).*

Tkanki zwierzęce i roślinne

1. Świeżą tkankę należy rozdrobnić możliwie dokładnie na drobne fragmenty nie większe niż 0.5 cm.
 - o Rozdrobnienie tkanek ma na celu umożliwienie szybkiej i dokładnej penetracji komórek tkanki przez komponenty buforu. Im dokładniejsze rozdrobnienie tkanki tym szybsze wniknięcie składników i lepsze zabezpieczenie RNA przed degradacją.
 - o W przypadku roślin mających twardą tkankę lub dodatkowe bariery chroniące je przed otoczeniem (gruba skóra, woskowe powłoki itp.) działanie roztworu może być niezadowalające.
2. Umieścić rozdrobioną tkankę w odpowiedniej ilości roztworu **fix RNA**. Przechowywać zgodnie z zaleceniami umieszczonymi w uwagach wstępnych (Uwaga 2 strona 3).
 - o Używać 10 µl roztworu **fix RNA** na 1 mg tkanki lub ok. 10 objętości odczynnikowej na 1 objętość próbki.
3. W razie potrzeby izolacji RNA roztwór **fix RNA** należy usunąć:
4. Preparat można wyciągnąć przy pomocy jałowej pincety z roztworu i umieścić przed homogenizacją w odpowiednim buforze z wybranego zestawu (bufor **RL**, **LG**, **DRP** lub **Lyse ALL**) zgodnie z protokołem do danego zestawu (patrz Izolacja RNA z zabezpieczonych próbek strona 4).
5. W razie bardzo rozdrobnionego materiału, bezpośrednio przed izolacją, należy dodać jedną część wody wolnej od RNaz do dwóch części roztworu **fix RNA** i zwirować przez 2 minuty z prędkością 10 000 x g. Ostrożnie zlać supernatant, zebrać dokładnie pipetą resztki roztworu a osad zawiesić w odpowiednim buforze z wybranego zestawu do izolacji RNA.
6. Ewentualnie można przesączyć roztwór z zawieszoną tkanką przez minifilterek a następnie zebrać lub sputkać odpowiednim buforem zgromadzony materiał.

Hodowle komórkowe

1. Zwirować hodowlę komórek przez 2 min z prędkością 5 000 x g. Ostrożnie wybrać supernatant znad osadu.
2. Osad zawiesić w odpowiedniej ilości roztworu **fix RNA**. Przechowywać zgodnie z zaleceniami umieszczonymi w uwagach wstępnych (Uwaga 2 strona 3).
 - o Używać ok. 10 objętości odczynnik na 1 objętość próbki (osadu).
 - o W przypadku późniejszej izolacji RNA przy użyciu zestawów kolumnkowych należy pamiętać, że nie należy przekraczać ilości 1×10^7 komórek na jeden prep. Wystarczającą ilość RNA do większości zastosowań uzyskuje się z $0.5 - 1 \times 10^6$ komórek na jeden prep.
3. W razie potrzeby izolacji RNA roztwór **fix RNA** należy usunąć przez wirowanie i zlanie supernatantu. Roztwór **fix RNA** rozcieńczyć wodą wolną od RNaz w stosunku 2:1 (dwie objętości roztworu **fix RNA** i jedna objętość wody). Następnie komórki wirować 3 min. z prędkością 10 000 x g. Ostrożnie i dokładnie zebrać supernatant. Osad zawiesić w odpowiednim buforze z wybranego zestawu (bufor **RL** lub **DRP**) zgodnie z protokołem do danego zestawu (patrz Izolacja RNA z zabezpieczonych próbek strona 4).

Hodowle bakteryjne

1. Zwirować hodowlę bakteryjną przez 2 min z prędkością 10 000 x g. Ostrożnie wybrać supernatant znad osadu.
2. Osad zawiesić w odpowiedniej ilości roztworu **fix RNA**. Przechowywać zgodnie z zaleceniami umieszczonymi w uwagach wstępnych (Uwaga 2 strona 3).
 - o Używać ok. 10 objętości odczynnik na 1 objętość próbki (osadu).
 - o W przypadku późniejszej izolacji RNA przy użyciu zestawów kolumnkowych należy pamiętać, że nie należy przekraczać ilości 1×10^9 komórek bakterii na jeden prep.
3. W razie potrzeby izolacji RNA roztwór **fix RNA** należy usunąć przez wirowanie i zlanie supernatantu. Komórki wirować 3 min. z prędkością 10 000 x g. Następnie osad zawiesić w odpowiednim buforze z wybranego zestawu (bufor **RL** lub **Lyse ALL**) zgodnie z protokołem do danego zestawu (patrz Izolacja RNA z zabezpieczonych próbek strona 3).
 - o W razie problemów z odwirowaniem komórek związanych ze zwiększoną gęstością roztworu **fix RNA** należy zwiększyć prędkość wirowania lub bezpośrednio przed wirowaniem i izolacją rozcieńczyć go wodą wolną od RNaz (E0210). W większości przypadków wystarcza rozcieńczenie 2:1 (dwie objętości roztworu **fix RNA** i jedna objętość wody).

Krew ludzka

1. Komponentami krwi, które można zabezpieczyć używając roztworu **fix RNA** są leukocyty. Izolację RNA z leukocytów świeżych bądź zabezpieczonych odczynnikami **fix RNA** można przeprowadzić za pomocą zestawu GeneMatrix **Human Blood RNA Purification Kit** (E3596). Zawiera on również komponenty pozwalające na lizę erytrocytów i oddzielenie leukocytów.
2. Do świeżej krwi dodać 4 objętości buforu **Lyse RBC**. Wymieszać przez odwracanie probówki.
 - o Na przykład, do 300 μ l krwi dodać 1200 μ l buforu Lyse RBC.
 - o Bufor Lyse RBC jest częścią zestawu GeneMatrix Human Blood RNA Purification Kit (E3596). Jest on w postaci 5x stężonej i należy go rozcieńczyć.
 - o Nie używać krwi mrożonej.
3. Pozostawić w 4°C na 10 minut w celu lizy erytrocytów. Wymieszać dwa razy.
4. Wirować próbkę przez 10 min w 4°C z prędkością 400 x g. Wylać supernatant.
 - o Ostrożnie zebrać pipetą nad osadu resztkę supernatantu.
5. Pellet zawiesić w buforze **Lyse RBC** (użyć 2 objętości **Lyse RBC** na 1 objętość krwi użytą do izolacji). Wymieszać przez worteksowanie.
 - o Na przykład, jeżeli do izolacji użyto 300 μ l krwi dodać 600 μ l buforu Lyse RBC.
6. Wirować próbkę przez 10 min w 4°C z prędkością 400 x g. Wylać supernatant.
 - o Ostrożnie zebrać pipetą nad osadu resztkę supernatantu.
7. Osad zawiesić w odpowiedniej ilości roztworu **fix RNA**. Przechowywać zgodnie z zaleceniami umieszczonymi w uwagach wstępnych (Uwaga 2 strona 3).
 - o Używać ok. 10 objętości odczynników na 1 objętość próbki (osadu).
 - o W przypadku późniejszej izolacji RNA przy użyciu zestawów w skali miniprep należy pamiętać, że na jeden prep można użyć leukocyty wyizolowane maksymalnie z 1.5 ml krwi.
8. W razie potrzeby izolacji RNA roztwór **fix RNA** należy usunąć: Roztwór **fix RNA** rozcieńczyć wodą wolną od RNaz w stosunku 2:1 (dwie objętości roztworu **fix RNA** i jedna objętość wody). Następnie próbkę wirować 3 min z prędkością 10 000 x g. Ostrożnie i dokładnie zebrać supernatant. Używając do izolacji RNA zestawu GeneMatrix **Human Blood RNA Purification Kit** (E3596) kontynuować procedurę od kroku 7 strona 5, GeneMatrix **Universal RNA Purification Kit** E3598 od kroku 6 strona 14 (zawiesić osad leukocytów w buforze **RL**).

EURx Ltd. 80-297 Gdansk Poland
ul. Przyrodnikow 3, NIP 957-07-05-191
KRS 0000202039, www.eurx.com.pl
orders: email: orders@eurx.com.pl
tel. +48 58 524 06 97, fax +48 58 341 74 23

