EURx® MOLECULAR BIOLOGY PRODUCTS

Wersja zestawu 1.4
Czerwiec 2022

Universal RNA Clean-Up Kit

Uniwersalny zestaw do trawienia DNA w izolatach RNA

kat. nr E3589

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

Spis treści

Uwagi wstępne 3

Wyposażenie i odczynniki dostarczane przez użytkownika 3

Protokół 4

Część I Czynności wstępne 4

Część II Oczyszczanie RNA/miRNA 5

Środki ostrożności 6

Składniki zestawu	25 izolacji E3589-01	100 izolacji E3589-02	Warunki przechowywania
DNR II	1.5 ml	6 ml	2-8°C
DNase I (5 U / 1 µl)	275 U	4 x 275 U	-20°C
DNase I buffer	100 µl	300 µl	15-25°C
RL	12 ml	48 ml	15-25°C
Wash RNA	27 ml	108 ml	15-25°C
RNase-free water	3 ml	12 ml	15-25°C
RNA Binding Columns	25 szt.	2 x 50 szt	2-8°C
Protokół	1	1	

Uwagi wstępne

UWAGA 1 · Przeznaczenie zestawu. Zestaw przeznaczony jest do doczyszczania całkowitego RNA (powyżej 200 nt) lub RNA/miRNA różnego pochodzenia (tkanki zwierzęce, roślinne, bakterie, drożdże, hodowle komórkowe oraz krew) z pozostałości DNA z wykorzystaniem trawienia DNase I w roztworze. Zestaw eliminuje także zanieczyszczenia po reakcjach enzymatycznych. Roztwór RNA po trawieniu oczyszczany jest na minikolumnach.

UWAGA 2 · Maksymalna ilość użytego materiału. Maksymalna pojemność minikolumny wiążącej RNA to 100 µg. Maksymalna objętość płynu nanoszonego na minikolumnę to 600 µl. Przeładowanie minikolumny zmniejsza wydajność i obniża jakość wyizolowanego materiału. Może również spowodować zapchanie się minikolumny.

UWAGA 3 · Przechowywanie składników zestawu. Po rozpakowaniu, zestaw należy przechowywać w temperaturze pokojowej, za wyjątkiem minikolumn wiążących oraz buforu DNR II, które należy przechowywać w 2-8°C. Liofilizowany enzym DNase I jak i rozpuszczony należy przechowywać w -20C.

UWAGA 4 · β-Merkaptoetanol / DTT. Aby wspomóc redukcję wiązań dwusiarczkowych i zdezaktywować ewentualnie obecne RNazy należy dodać odczynnik redukujący taki jak β-merkaptoetanol (β-ME) lub dithiothreitol (DTT). Przed użyciem buforu RL do 1 ml dodać 10 µl β-merkaptoetanolu (β-ME, 14.3M). Po dodaniu β-ME bufor RL jest stabilny przez 1 miesiąc. Alternatywą jest dodanie do 1 ml buforu RL 10 µl DTT (dodawać 1 M roztwór DTT). DTT nie jest stabilny w buforze RL , stąd nie należy przechowywać buforów po zmieszaniu. 1M roztwór DTT powinien być przechowywany w -20°C w małych porcjach aby zapobiec częstemu rozmrażaniu. Aby przygotować 1 M roztwór DTT (MW = 154,25 g mol-1) należy rozpuścić 1.54 g DTT w 10 ml wody wolnej od RNaz i przechowywać w małych porcjach do jednokrotnego użytku.

UWAGA 5 · Trawienie DNase I należy wykonać z użyciem buforu DNR II dołączonego do zestawu. Nie należy używać innych buforów.

UWAGA 6 · Przed rozpoczęciem izolacji DNase I należy rozpuścić w roztworze DNase I buffer zgodnie z instrukcją **Część I Czynności wstępne** pkt 1.

UWAGA 7 · Dobra praktyka laboratoryjna. Dla otrzymania RNA o wysokiej czystości istotne jest dokładne stosowanie się do zaleceń protokołu. Czynności należy wykonać możliwie szybko. Wszystkie kroki należy przeprowadzić w temperaturze pokojowej. Należy uważać, aby w trakcie wykonywania czynności związanych z protokołem nie wprowadzić śladowych ilości RNaz. Wszelkie roztwory z zestawu do oczyszczania RNA należy przechowywać szczelnie zamknięte, aby uniknąć zmiany stężeń w wyniku parowania.

Wyposażenie i odczynniki dostarczane przez użytkownika

- Alkohol etylowy [96-100% v/v], β-merkaptoetanol (14.3 M, β-ME) lub 1 M dithiothreitol (DTT) w wodzie wolnej od RNaz, mikrowirówka, rękawiczki, jałowe wolne od RNaz tipsy, jałowe wolne od RNaz probówki 1.5-2 ml.

Protokół

Część I Czynności wstępne

1. Rozpuścić liofilizat **DNase I** poprzez dodanie buforu (**DNase I** buffer) aby uzyskać stężenie 5U / µl.

   - *Do zestawu na 25 izolacji (EE3589-01) dołączono 275 U DNase I, które należy rozpuścić w 55 µl buforu DNase I buffer.*

   - *Do zestawu na 100 izolacji (EE3589-02) dołączono 4 probówki z 275 U DNase I każda. Do każdej probówki dodać po 55 µl DNase I buffer w celu rozpuszczenia enzymu.*

   - *Enzym DNase I jest wrażliwy na uszkodzenia mechaniczne i łatwo ulega denaturacji fizycznej. Nie należy mieszać zbyt intensywnie.*

   - *Do probówki z liofilizatem DNase I dodać DNase I buffer, odczekać 3 min i delikatnie wymieszać przez pipetowanie. Po użyciu przechowywać enzym w temp. -20°C.*

2. Próbki doprowadzić do temperatury pokojowej.

   - *Wszystkie wirowania należy wykonywać w temperaturze pokojowej.*

3. Upewnić się, że do buforu **RL** został dodany β-merkaptoetanol (patrz Uwaga 4 strona 3)

Część II Oczyszczanie RNA/miRNA

1. Do 80 µl RNA/miRNA dodać 20 µl buforu **DNR II**. Wymieszać przez pipetowanie a następnie dodać 2 µl **DNase I**. Delikatnie wymieszać.

   - *Objętość RNA/miRNA można zwiększyć (lub zmniejszyć) stosując proporcję 4 części RNA do 1 części DNR II. Na 100 µl otrzymanej mieszaniny dodać 2 µl DNase I.*

2. Pozostawić w temperaturze pokojowej (15-25°C) przez 20 min.

   - *Trawienie DNase I w roztworze efektywnie eliminuje DNA.*

3. Po upływie 20 min dodać 3 objętości buforu **RL** do 1 objętości roztworu RNA (RNA z buforem **DNR II** i **DNase I**) oraz 1.2 objętości **96% alkoholu etylowego** i wymieszać.

   - *Np. do 100 µl roztworu RNA dodać 300 µl buforu RL oraz 480 µl alkoholu etylowego.*

4. Ostrożnie przenieść 600 µl mieszaniny (razem z osadem jeżeli powstał) do **minikolumny wiążącej RNA** umieszczonej w 2 ml probówce odbierającej. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.

5. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i powtórnie umieścić minikolumnę w probówce.

6. Przenieść pozostałość mieszaniny do minikolumny i wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.

7. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i powtórnie umieścić minikolumnę w probówce.

8. Dodać 600 µl buforu płuczącego **Wash RNA** do minikolumny. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.

9. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i powtórnie umieścić minikolumnę w probówce.

10. Dodać 300 µl buforu płuczącego **Wash RNA** do minikolumny. Wirować przez 2 min z prędkością 11 000 x g.

    - *Podczas wyjmowania minikolumny zwrócić szczególną uwagę, aby nie zanieczyścić próbki buforem płuczącym. Jeżeli membrana nie jest całkowicie sucha, wylać przesącz, umieścić minikolumnę w probówce i ponownie wirować przez 1 min.*

11. Minikolumnę umieścić w nowej probówce typu Eppendorf 1.5-2 ml. Dodać 40-100 µl wody RNase-free centralnie na membranę.

12. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.

13. Usunąć minikolumnę, zamknąć probówkę. RNA jest gotowe do dalszych analiz/manipulacji, może być w 2-8°C lub zamrożone w -20°C (należy unikać wielokrotnego zamrażania i rozmrażania RNA).

Środki ostrożności

RL

Uwaga

H302+H332 Działa szkodliwie po połknięciu lub w następstwie wdychania.
H412 Działa szkodliwie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki.
P261 Unikać wdychania par/ rozpylonej cieczy.
P273 Unikać uwolnienia do środowiska.
P301+P312 W przypadku połknięcia: w przypadku złego samopoczucia skontaktować się z ośrodkiem zatruć/lekarzem.
P304+P340 W przypadku dostania się do dróg oddechowych: wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić mu warunki do swobodnego oddychania.
EUH032 W kontakcie z kwasami uwalnia bardzo toksyczne gazy.

Wash RNA

Niebezpieczeństwo

H225 Wysoce łatwopalna ciecz i pary.
H319 Działa drażniąco na oczy.
P210 Przechowywać z dala od źródeł ciepła, gorących powierzchni, źródeł iskrzenia, otwartego ognia i innych źródeł zapłonu. Nie palić.
P280 Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy.
P305+P351+P338 W przypadku dostania się do oczu: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.
P337+P313 W przypadku utrzymywania się działania drażniącego na oczy: zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.
P403+P235 Przechowywać w dobrze wentylowanym miejscu. Przechowywać w chłodnym miejscu.

Universal RNA Clean-Up Kit jest przeznaczony do oczyszczenia izolatów RNA pochodzących z dowolnych źródeł z zanieczyszczenia DNA.

Zestaw Universal RNA Clean-Up Kit ma zastosowanie w technikach wymagających wykorzystania próbek RNA wolnych od DNA. Trawienie DNA w roztworze jest dużo wydajniejsze niż na membranie kolumienki podczas standardowej procedury izolacji RNA. RNA oczyszczane z wykorzystaniem kolumienek krzemionkowych jak i przy użyciu mieszaniny fenol/chloroform jest przeważnie zanieczyszczone genomowym DNA. Jakość RNA istotnie wpływa na takie metody jak ekspresja genów (RT-qPCR) czy RNAseq. W pierwszym kroku do próbki RNA dodawany jest enzym DNase I i specjalny bufor dzięki którym trawiony jest w roztworze DNA. W trakcie oczyszczania RNA próbka zawieszana jest w buforze denaturującym, który inaktywuje RNazy. Następnie próbka jest wirowana w mini-kolumienkach o specjalnej konstrukcji, które dodatkowo dooczyszczają preparat usuwając fragmenty DNA. Dodanie specjalnego buforu oraz etanolu wytwarza warunki do selektywnego wiązania RNA do membrany. Podczas krótkiego wirowania następuje wiązanie RNA do membrany, natomiast niezwiązane zanieczyszczenia pozostają w wycieku z kolumny. Ich śladowe pozostałości na membranie są skutecznie usuwane w trakcie dwóch etapów płukania. Elucję oczyszczonego RNA wykonuje się wodą destylowaną, wolną od RNaz. Maksymalna wydajność procesu to ok. 100 µg RNA. Oczyszczane są kwasy nukleinowe o długości od 25 nt (miRNA). Oczyszczony preparat RNA nadaje się do bezpośredniego użytku. Nie wymaga dalszej precypitacji etanolem.

EURx®
MOLECULAR
BIOLOGY
PRODUCTS

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