

GeneMATRIX FFPE RNA Purification Kit

Zestaw do izolacji RNA z tkanek utrwalonych w formalinie/parafinie (FFPE-formalin-fixed, paraffin-embedded).

● **kat. nr. E3593**

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
Wyposażenie i odczynniki dostarczane przez użytkownika	3
Protokół.....	4
Część I Usuwanie parafiny	4
Ksylen.....	4
Heptan i metanol.....	4
Część II Izolacja i oczyszczanie RNA.....	5
Przykładowe reakcje RT-PCR wykonane na bazie RNA wyizolowanego z tkanek utrwalonych w parafinie (FFPE)	7
Środki ostrożności.....	8

Składniki zestawu	25 izolacji E3593-01	100 izolacji E3593-02	Warunki przechowywania
Lyse ALL	6 ml	24 ml	15-25°C
RL	18 ml	72 ml	15-25°C
Proteinase K (20 mg/ml)	0.45 ml	1.8 ml	-20°C
Wash RNA	39 ml	156 ml	15-25°C
DNR II	0.6 ml	2.4 ml	2-8°C
RNase-free water	3.6 ml	15 ml	15-25°C
DNase I	0.06 ml	0.24 ml	-20°C
Homogenization Columns	25 szt.	2 x 50 szt.	2-8°C
RNA Binding Columns	25 szt.	2 x 50 szt.	2-8°C
Protokół	1	1	

Uwagi wstępne

UWAGA 1 • Przeznaczenie zestawu. Zestaw umożliwia izolację całkowitego RNA razem z małowzrostkowym RNA ze skrawków tkanek zabezpieczonych w parafinie (ang. FFPE – formalin-fixed, paraffin-embedded).

UWAGA 2 • Maksymalna ilość użytego materiału. Jedna minikolumna pozwala na oczyszczenie RNA z maksymalnie 2-4 skrawków o grubości 5-20 µm. Sumaryczna grubość skrawków nie powinna przekraczać 40 µm. Ilość RNA w końcowym izolacie zależy od rodzaju tkanki zabezpieczonej w FFPE. W celu uzyskania satysfakcjonujących wyników można przeprowadzić miareczkowanie optymalnej wielkości próbki do izolacji RNA. Ogólna pojemność minikolumny to 125 µg RNA. Maksymalna objętość płynu nanoszonego na minikolumny to 600 µl. Przetadowanie minikolumn zmniejsza wydajność i obniża jakość wyizolowanego materiału. Może również spowodować zapchanie się minikolumn.

UWAGA 3 • Przechowywanie składników zestawu. Po rozpakowaniu, DNazę I oraz Proteinazę K należy przechowywać w temperaturze -20°C, bufor DNR II należy przechowywać w temperaturze 2-8°C. Pozostałe komponenty należy przechowywać w temperaturze pokojowej.

UWAGA 4 • 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 śladów RNaz. Wszelkie roztwory z zestawu należy przechowywać szczelnie zamknięte, aby uniknąć zmiany stężeń w wyniku parowania.

Metoda archiwizacji tkanek w formaldehydzie/parafinie wpływa niekorzystnie na jakość kwasów nukleinowych. Cząsteczki DNA/RNA są zwykle usieciowane (ang. crosslink), zdegradowane i występują w mniejszych odcinkach niż w przypadku świeżej tkanki. Stąd też nie nadają się do zastosowań wymagających łańcuchów RNA pełnej długości. Poniższa procedura oczyszczania pozwala na izolację również krótkich odcinków RNA (poniżej 200 nt) oraz częściowe cofnięcie niekorzystnych zmian w kwasach nukleinowych spowodowanych przez formaldehyd.

Wypożyczenie i odczynniki dostarczane przez użytkownika

- Rozpuszczalnik organiczny potrzebny do usunięcia parafiny. W zależności od metody: ksilen lub heptan i metanol.
- Alkohol etylowy [96-100% v/v], mikrowirówka, rękawiczki, jałowe wolne od RNaz tipsy, jałowe wolne od RNaz próbówki 1.5-2 ml, worteks, blok grzejny pozwalający na inkubację próbki w temperaturze z zakresu 50-80°C, opcjonalnie sprzęt do homogenizacji tkanki.



Protokół

Część I Usuwanie parafiny

Pierwszym etapem obróbki tkanek archiwizowanych za pomocą formaldehydu/parafiny jest rozpuszczenie i usunięcie parafiny. Na potrzeby poniższego protokołu zaadaptowano dwie metody spośród kilku funkcjonujących w laboratoriach. W przypadku postępowania się inną metodą usuwania parafiny należy doprowadzić do suchego osadu tkanki pozbawionego śladów rozpuszczalników organicznych i przejść do części II protokołu.

Ksylene

1. Dodać 1 ml ksylenu do próbki. Worteksować przez 15 sekund. Wirować próbkę z maksymalną prędkością przez 2 minuty.
2. Ostrożnie i dokładnie zebrać pipetą supernatantu znad osadu i wylać.
3. Dodać 1 ml 96-100% alkoholu etylowego do próbki. Dokładnie wymieszać przez odwracanie. Wirować próbkę z maksymalną prędkością przez 2 minuty.
4. Ostrożnie i dokładnie zebrać pipetą supernatantu znad osadu i wylać.
5. Próbkę pozostawić w temperaturze pokojowej (15-25°C) lub inkubować w 37°C przez około 10 minut w celu całkowitego odparowania alkoholu.
6. Przejść do części II protokołu.

Heptan i metanol

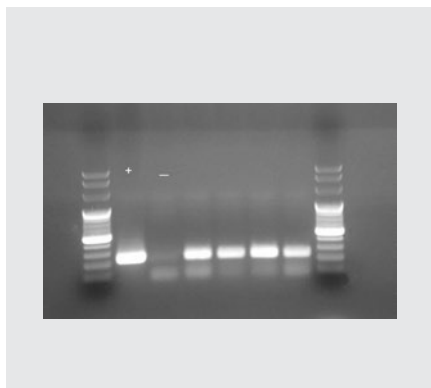
1. Dodać 0.5 ml heptanu do próbki. Worteksować przez 15 sekund. Pozostawić na 10 min w temperaturze pokojowej (15-25°C).
2. Dodać 25 µl metanolu. Worteksować przez 15 sekund.
3. Wirować przez 10 min z prędkością 10 000 x g.
4. Ostrożnie i dokładnie zebrać pipetą supernatantu znad osadu i wylać.
5. Próbkę pozostawić w temperaturze pokojowej (15-25°C) przez około 5 min do całkowitego wysuszenia.
6. Przejść do części II protokołu.

Część II Izolacja i oczyszczanie RNA

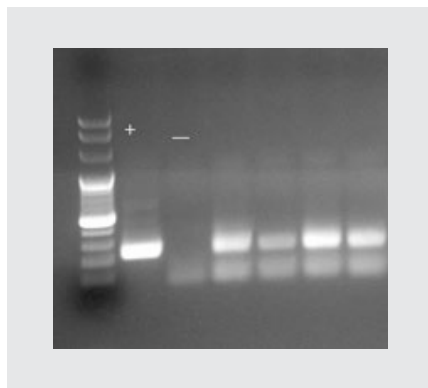
1. Suchy pellet tkanki zawiesić w 200 µl roztworu **Lyse ALL**. Dokładnie wymieszać przez worteksowanie.
 - o W przypadku posiadania odpowiedniego sprzętu można na tym etapie rozdrobnić mechanicznie tkankę. Podnosi to wydajność izolacji jednak nie jest to niezbędne do kontynuowania procesu oczyszczania RNA.
2. Dodać 15 µl **Proteinazy K**, wymieszać dokładnie przez pipetowanie lub worteksowanie.
 - o W zależności od rodzaju utrwalonej tkanki trawienie Proteinazą K może nie być całkowite, niemniej nawet częściowe jest wystarczające do uzyskania zadowalającej wydajności izolacji RNA.
 - o W trakcie inkubacji, w celu podniesienia wydajności trawienia, próbkę można kilkakrotnie wymieszać przez odwracanie próbówki.
3. Inkubować próbkę przez 20 minut w temperaturze 56°C.
4. Następnie próbkę inkubować 15 min w temperaturze 80°C.
 - o W przypadku korzystania z jednego bloku grzejnego, do czasu uzyskania temp. 80°C pozostawić próbkę w temp. pokojowej. Kontynuować inkubację dopiero po uzyskaniu temp. 80°C.
 - o Ogrzewanie próbki w temp. 80°C pozwala na częściowe cofnięcie modyfikacji kwasów nukleinowych dokonanych przez formaldehyd. Znacznie zwiększa efektywność oczyszczonego RNA jako matrycy w zastosowaniach typu RT-PCR.
5. Schłodzić próbkę na lodzie przez 2 min a następnie wirować z maksymalną prędkością przez 2 minuty.
6. Ostrożnie przenieść 200 µl supernatantu do nowej, RNase-free, próbówki 1.5-2 ml typu Eppendorf i dodać 300 µl buforu **RL**. Dokładnie wymieszać przez pipetowanie. Następnie dodać 600 µl 96-100% alkoholu etylowego i ponownie wymieszać.
7. Przenieść 600 µl mieszaniny do **minikolumny homogenizacyjnej (fioletowej)** umieszczonej w 2 ml próbówce odbierającej. Wirować przez 1 min z maksymalną prędkością. Wylać przesącz.
8. Przenieść pozostałość mieszaniny do tej samej **minikolumny homogenizacyjnej** umieszczonej w 2 ml próbówce odbierającej. Wirować przez 1 min z maksymalną prędkością.
9. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i umieścić minikolumnę z powrotem w próbówce odbierającej.

10. Dodać 400 µl buforu płuczącego **Wash RNA** do minikolumny i wirować przez 2 min z maksymalną prędkością.
 - Podczas wyjmowania minikolumny zwrócić szczególną uwagę aby nie zanieczyścić próbki buforem płuczącym. Jeżeli dół kolumnki nie jest całkowicie suchy, wyłączyć przesącz, umieścić minikolumnę w probówce i ponownie wirować przez 1 min.
11. Wyjąć minikolumnę i umieścić w nowej probówce typu Eppendorf 1.5-2 ml. Dodać 80 µl wody RNase-free centralnie na membranę.
12. Wirować przez 1 minutę z maksymalną prędkością.
 - Uwaga! Nie usuwać przesączu.
13. Usunąć **minikolumnę homogenizacyjną**. Do przesączu dodać 20 µl buforu **DNRII**. Wymieszać przez pipetowanie a następnie dodać 2 µl DNazy I. Delikatnie wymieszać.
 - DNaza I jest wrażliwa i łatwo ulega denaturacji fizycznej. Nie należy mieszać jej zbyt mocno.
14. Pozostawić w temperaturze pokojowej (15-25°C) przez 15 min.
 - Trawienie DNazą I w roztworze efektywnie eliminuje DNA.
15. Po upływie 15 min dodać 200 µl buforu **RL**, dokładnie wymieszać oraz dodać 360 µl 96-100% alkoholu etylowego i ponownie wymieszać.
16. Ostrożnie przenieść mieszaninę (razem z osadem jeżeli powstał) do **minikolumny wiążącej RNA (żółte)** umieszczonej w 2 ml probówce odbierającej. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
17. Wyjąć minikolumnę, wyłączyć przesącz i powtórnie umieścić minikolumnę w probówce.
18. Dodać 600 µl buforu płuczącego **Wash RNA** do minikolumny. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
19. Wyjąć minikolumnę, wyłączyć przesącz i powtórnie umieścić minikolumnę w probówce.
20. 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, wyłączyć przesącz, umieścić minikolumnę w probówce i ponownie wirować przez 1 min.
21. Minikolumnę umieścić w nowej probówce typu Eppendorf 1.5-2 ml. Dodać 30 µl wody RNase-free centralnie na membranę.
22. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
23. Usunąć minikolumnę, zamknąć probówkę. RNA jest gotowe do dalszych analiz/manipulacji, może być przechowywane w 2-8°C lub zamrożone w -20°C.

Przykładowe reakcje RT-PCR wykonane na bazie RNA wyizolowanego z tkanek utrwalonych w parafinie (FFPE)



RT-PCR wykonany przy użyciu OneStep RT-PCR kit (EURx kat. nr E0803). Gen GAPDH -240bp. Użyto 4 μ l (100 ng) RNA wyizolowanego ze skrawków parafinowych fragmentu kostnego z guzem szpiczaka (4 różne próbki). Wzorzec wielkości Perfect™100 bp (EURx). Kontrola (+) RNA z leukocytów ludzkich.



RT-PCR wykonany przy użyciu OneStep RT-PCR kit (EURx kat. nr E0803). Gen GAPDH -240bp. Użyto 4.5 μ l (120 ng) RNA wyizolowanego ze skrawków parafinowych fragmentu guza piersi (4 różne próbki). Wzorzec wielkości Perfect™100 bp (EURx). Kontrola (+) RNA z leukocytów ludzkich.

Środki ostrożności

Lyse ALL



Uwaga

H319 Działa drażniąco na oczy.

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.

Proteinase K



Niebezpieczeństwo

H334 Może powodować objawy alergii lub astmy lub trudności w oddychaniu w następstwie wdychania.

P261 Unikać wdychania par/ rozpylonej cieczy.

P304+P340 W przypadku dostania się do dróg oddechowych: wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić mu warunki do swobodnego oddychania.

P342+P311 W przypadku wystąpienia objawów ze strony układu oddechowego: skontaktować się z ośrodkiem zatruc/ lekarzem.

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 zatruc/ 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.

**DOBÓR ZESTAWU
W ZALEŻNOŚCI OD RODZAJU
IZOLOWANEGO MATERIAŁU**

EUR _X [®] MOLECULAR BIOLOGY PRODUCTS				IZOLACJA RNA					
				E3700	E3594	E3596	E3598	E3599	E3593
				RNA EXTRA ^{COL} ™	UNIVERSAL BLOOD RNA	HUMAN BLOOD RNA	UNIVERSAL RNA	UNIVERSAL RNA/miRNA	FFPE RNA Purification Kit
				IZOLACJE					
				25 100	25	25	25 100	25 100	25 100
RNA	RNA POWYŻEJ 200 nt	TKANKI ZWIERZĘCE					●	●	
		TKANKI ROŚLINNE					●	●	
		BAKTERIE					●		
		DROŻDŻE					●		
		HODOWLE KOMÓRKOWE					●	●	
		KREW LUDZKA	ŚWIEŻA	●	●	●	●		
			MROŻONA ¹		●				
		KREW ZWIERZĘCA	ŚWIEŻA	●	●				
			MROŻONA ¹		●				
	miRNA LUB CAŁKOWITE RNA	TKANKI ZWIERZĘCE		●				●	
		TKANKI PARAFINA / FORMALINA							●
		TKANKI ROŚLINNE		●				●	
		HODOWLE KOMÓRKOWE		●				●	
		BAKTERIE		●					
		DROŻDŻE		●					
		KREW/LEUKOCYTY		●					
		OCZYSZCZANIE PO REAKCJACH ENZYMATYCZNYCH							●
	TRAWIENIE DNazą I NA KOLUMIENCIE					●		●	

Wszystkie zestawy zawierają bufory WASH w formie gotowej do bezpośredniego użytku

1. Mrożone w buforze Lyse Blood (występuje w zestawie).
2. Mieszanina fenolu i soli chaotropowych przeznaczona do izolacji całkowitego RNA.

DOBÓR ZESTAWU
W ZALEŻNOŚCI OD RODZAJU
IZOLOWANEGO MATERIAŁU

PRZEWODNIK PO ZESTAWACH DO IZOLACJI KWASÓW NUKLEINOWYCH															
E3600	E3605	E3610	E3615	E3620	E3625	E3630	E3635	E3640	E3645	E3650	E3655	E3660	E3665	E3670	E3675
MICELLULA DNA ¹	TISSUE & BACTERIAL DNA	TISSUE DNA	SWAB-EXTRACT DNA	STOOL DNA	SOIL DNA	SHORT DNA CLEAN-UP	QUICK BL-OD DNA	PLASMID MINIPREP DNA	AGROBACTERIUM PLASMID DNA	PLANT & FUNGI DNA	PCR / DNA CLEAN-UP	FOOD EXTRACT DNA	CELL CULTURE DNA	BONE DNA	BASIC DNA
DOSTĘPNA ILOŚĆ IZOLACJI															
50 150	25 100	50 150	50 150	25 100	50 150	25 100	50 150	25 100	50 150	25 100	50 150	25 100	50 150	25 100	50 150
DNA	GENOMOWE	BAKTERIE	●	●											●
		DROŻDŻE	●	●											
		HODOWLE KOMÓRKOWE				●								●	●
		ROŚLINY						●							
		GRZYBY						●							
		ROŚLINY BOGATE W POLISACHARYDY ¹						●							
		KREW							●						
		GLEBA												●	
		KĄŁ													●
		WYMAZY													●
		TKANKI ZWIERZĘCE													●
		TKANKI PARAFINA / FORMALINA													●
		OGONY GRYZONI													●
		WŁOSY													●
		OWADY													●
		MOCZ													●
		KOŚCI					●								
		ŚLADY BIOLOGICZNE			●										
		ŻYWNOŚĆ				●									
	PLAZMIDOWE	BAKTERIE				●				●	●				
		DROŻDŻE			●										
	IZOLACJA Z AGAROZY			●		●									
	OCZYSZCZANIE PO PCR I REAKCJACH ENZYMATYCZNYCH		●			●					●			●	

Wszystkie zestawy zawierają bufor WASH w formie gotowej do bezpośredniego użytku

1. Dodatkowo wymagany bufor Lyse CT (E0324)
2. Zestaw do tworzenia emulsji i oczyszczania DNA.

○ **GeneMATRIX FFPE RNA Purification Kit jest przeznaczony do szybkiej izolacji całkowitego komórkowego RNA wzbogaconego o małowzrostkowe RNA o długości poniżej 200 nukleotydów z tkanek utrwalonych w parafinie.**

Na pierwszym etapie izolacji usunięta zostaje parafina a następnie po płukaniu i precypitacji etanolem próbka poddawana jest lizie i trawieniu Proteinazą K. Następnie lizat jest wirowany w mini-kolumnkach o specjalnej konstrukcji, które wiążą kwasy nukleinowe, usuwają zanieczyszczenia oraz przygotowują próbkę do trawienia DNazą I, która to na kolejnym etapie efektywnie eliminuje DNA. W dalszej kolejności dodanie etanolu wytwarza warunki do selektywnego wiązania RNA do membrany GeneMATRIX. Podczas krótkiego wirowania następuje wiązanie RNA do membrany

kolumniek wiążących RNA, 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 redestylowaną, wolną od RNaz. Specjalne kolumnki zawierające membrany o podniesionej wydajności wiązania pozwalają na zredukowanie objętości elucji i zwiększenie stężenia RNA. Maksymalna wydajność procesu to ok. 100 µg całkowitego RNA. Oczyszczony preparat RNA nadaje się do bezpośredniego użytku. Nie wymaga dalszej precypitacji etanolem.

○ **GeneMATRIX to syntetyczne membrany nowej generacji wiążące DNA i RNA, wykorzystujące selektywne właściwości wiązania kwasów nukleinowych przez kompozytowy SiO_2 . W celu osiągnięcia wysokiej wydajności i czystości otrzymanych kwasów nukleinowych, opracowano wyspecjalizowane bufor wiążący i płuczający, projektowane pod kątem optymalnego wykorzystania właściwości nowych membran.**

Zastosowanie gotowych do użycia membran, umieszczonych w kolumnkach wirowniczych (ang. Spin-format) w połączeniu ze specjalną konstrukcją naszych mikrokolumn, istotnie poprawia jakość uzyskanego preparatu DNA lub RNA. Celem monitorowania kompletnego wymieszania roztworów oraz ułatwienia procedury izolacji DNA, część roztworów wyznakowano barwnikami.

W efekcie przekazujemy w Państwa ręce zestawy składające się z nowych złożeń i buforów reakcyjnych, których użycie gwarantuje szybkie, proste, bezpieczne i jednocześnie wydajne otrzymanie ultraczystych

kwasów nukleinowych. Uzyskane DNA lub RNA nadaje się bezpośrednio do zastosowań w technikach biologii molekularnej, m.in.: trawienia enzymami restrykcyjnymi, defosforylacji/fosforylacji, ligacji, badań oddziaływania białko-DNA, sekwencjonowania, blottingu, translacji *in vitro*, otrzymywania cDNA, hybrydyzacji. Dodatkową zaletą zestawów jest powtarzalność właściwości zarówno membran jak i buforów wiążących, ponieważ przygotowanie komponentów odbywa się w EURx sp. z o.o.



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

