

## GeneMATRIX Universal Blood RNA Purification Kit

Zestaw do izolacji całkowitego RNA z 0.2–1.5 ml krwi ludzkiej lub zwierzęcej

● kat. nr. E3594

EURx Ltd. 80-297 Gdansk Poland  
ul. Przyrodników 3, NIP 957-07-05-191  
KRS 0000202039, [www.eurx.com.pl](http://www.eurx.com.pl)  
orders: email: [orders@eurx.com.pl](mailto: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 .....	4
Protokół.....	5
<b>Dodatek 1: Oczyszczanie RNA z wykorzystaniem trawienia DNazą I na kolumnie .....</b>	<b>8</b>
<b>RNA wyizolowane zestawem oraz reakcje RT-PCR.....</b>	<b>9</b>
<b>Środki ostrożności.....</b>	<b>10</b>

Składniki zestawu	25 izolacji E3594-01	Warunki przechowywania
Lyse Blood	135 ml	15-25°C
RL	9 ml	15-25°C
RINSE P	90 ml	15-25°C
PSB	6 ml	15-25°C
Proteinase K (20 mg/ml)	0.75 ml	-20°C
Wash DN1	15 ml	15-25°C
Wash RBW	30 ml	15-25°C
DNR	1.5 ml	15-25°C
RNase-free water	3 ml	15-25°C
Homogenization Columns	25 szt.	2-8°C
RNA Binding Columns	25 szt.	2-8°C
Protokół	1	

## Uwagi wstępne

**UWAGA 1 • Przeznaczenie zestawu.** Zestaw przeznaczony jest do izolacji całkowitego RNA (powyżej 200 nt) z krwi ludzkiej lub zwierzęcej. Krew po pobraniu należy jak najszybciej wymieszać z buforem Lyse Blood. Możliwe jest pobranie krwi do próbki z EDTA i następnie (przed upływem 2 godzin) przelanie jej do próbek zawierających bufor Lyse Blood.

**UWAGA 2 • Przechowywanie próbek.** Możliwe jest przechowywanie próbek krwi w buforze Lyse Blood: 1 dobę w temperaturze pokojowej, kilka dni w lodówce lub kilka miesięcy w zamrażarce. Zaleca się przechowywać próbki krwi zawieszona w buforze Lyse Blood w zamrażarce. Po zamrożeniu bez dodatku buforu Lyse Blood krew nie nadaje się do izolacji RNA przy użyciu tego zestawu.

**UWAGA 3 • Maksymalna ilość użytego materiału.** Jedna minikolumna pozwala na oczyszczenie RNA z nie więcej niż 1.5 ml krwi (ludzkiej). Maksymalna pojemność minikolumny wiążącej RNA to 100 µg. Maksymalna objętość płynu nanoszonego na minikolumnę to 700 µl. Przeładowanie minikolumny zmniejsza wydajność i obniża jakość wyizolowanego materiału. Może również spowodować zapchanie się minikolumny.

**UWAGA 4 • β-Merkaptoetanol / DTT.** Aby wspomóc redukcję wiązań dwusiarczkowych i unieszkodliwić 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 (dodawac [1 M] roztwór DTT w wodzie wolnej od RNaz). DTT nie jest stabilny w buforze RL stąd nie należy przechowywać buforu 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<sup>-1</sup>) należy rozpuścić 1.54 g DTT w 10 ml wody wolnej od RNaz i przechowywać w małych porcjach do jednokrotnego użytku.

**UWAGA 5 • Przechowywanie składników zestawu.** Po rozpakowaniu, zestaw należy przechowywać w temperaturze pokojowej, za wyjątkiem minikolumn homogenizacyjnych i wiążących, które należy przechowywać w 2-8°C oraz Proteinyzy K, którą należy przechowywać w -20°C.

**UWAGA 6 • Trawienie DNazą I.** Poniższa procedura efektywnie eliminuje całość DNA w przypadku użycia do izolacji maksymalnie 1.0 ml krwi ludzkiej. W związku z tym w przypadku niektórych zastosowań RNA szczególnie wrażliwych na minimalne ilości DNA i izolowaniu RNA z większych objętości krwi, proponujemy oczyszczanie zgodnie z Dodatkiem 1 (strona 8) wykorzystującym trawienie preparatu DNazą I (w trakcie izolacji na minikolumnie).

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



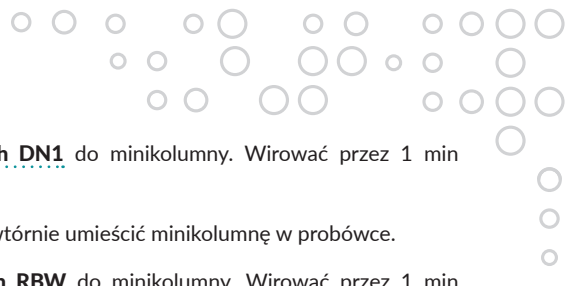
## Wyposażenie i odczynniki dostarczane przez użytkownika

- $\beta$ -merkaptoetanol (14.3 M,  $\beta$ -ME) lub [1 M] Dithiothreitol (DTT) w wodzie wolnej od RNaz, etanol 96-100%, mikrowirówka, rękawiczki, jałowe wolne od RNaz tipsy, jałowe wolne od RNaz probówki 1.5-2 ml. Jeżeli początkowa objętość krwi przekracza 500  $\mu$ l – odpowiedniej wielkości, jałowe wolne od RNaz probówki do lizy krwi.

# Protokół

1. Do świeżo pobranej krwi dodać 3 objętości buforu **Lyse Blood**. Wymieszać przez odwracanie próbówki.
  - o Na przykład, do 300 µl krwi dodać 900 µl buforu Lyse Blood.
  - o Można pobierać krew do próbek z EDTA. Następnie do roztworu krwi należy dodać odpowiednią ilość buforu Lyse Blood.
  - o W przypadku mrożenia krwi z buforem Lyse Blood po wymieszaniu z buforem, przed zamrożeniem pozostawić na ok. 30 min w temperaturze pokojowej.
  - o W przypadku krwi ludzkiej maksymalna jej objętość to 1.5 ml. Nie należy używać mniej niż 200 µl krwi. Przykładowo przy użyciu tego zestawu z 500 µl krwi zdrowego człowieka otrzymujemy ok. 2 µg RNA. W przypadku krwi zwierzęcej z reguły nie należy przekraczać objętości 1 ml krwi użytej do izolacji. W razie konieczności użycia do izolacji większej objętości krwi dopuszcza się naniesienie na jedną kolumnkę wiążącą lizaty z maksymalnie dwóch kolumn homogenizacyjnych (w dwóch porcjach) na etapie punktu 13 protokołu (po dodaniu etanolu).
  - o W przypadku użycia do izolacji większej objętości krwi niż 500 µl można podzielić krew na części, wymieszać w odpowiedniej ilości buforu Lyse Blood. Po odwirowaniu zawiesić pellety w odpowiedniej objętości roztworu RINSE P na etapie punktu 4 protokołu. Takie podejście pozwala na przeprowadzenie izolacji w próbkach 2 ml i przy użyciu mikrowirówki, nie jest wówczas konieczne posiadanie większych próbek i wirówki z większym rotorem. Np. 800 µl krwi podzielić na dwie porcje po 400 µl, umieścić je w dwóch próbkach 2 ml, dodać do każdej porcji 1.2 ml buforu Lyse Blood. Po odwirowaniu jeden pellet zawiesić w 800 µl roztworu RINSE P oraz drugi pellet zawiesić w 800 µl roztworu RINSE P. Po odwirowaniu oba pellety zawiesić w sumarycznej objętości 200 µl roztworu PSB i postępować dalej zgodnie z protokołem od punktu 7.
  - o Nie używać krwi mrożonej bez dodatku buforu Lyse Blood.
2. Pozostawić w temperaturze pokojowej na minimum 15 min w celu lizy komórek i precipitacji RNA. Wymieszać kilka razy.
  - o W przypadku krwi zamrożonej w buforze Lyse Blood próbki pozostawić w temperaturze pokojowej do rozmrożenia. Nie ogrzewać. W czasie rozmrażania kilkakrotnie wymieszać przez odwracanie próbówki. Po rozmrożeniu pozostawić próbki na 15-30 min w temperaturze pokojowej.
  - o Próbki zawieszane w buforze Lyse Blood przechowywane w lodówce przed izolacją pozostawić na ok. 30 min w temperaturze pokojowej. Przed wirowaniem wymieszać kilkakrotnie przez odwracanie próbówki.
3. Wirować próbkę przez 8 min w temperaturze pokojowej z prędkością 1 500 x g. Wylać supernatant. Ostrożnie i dokładnie zebrać pipetą resztkę supernatantu znad osadu.

4. Pellet zawiesić w roztworze płuczącym **RINSE P** (użyć 2 objętości **RINSE P** na 1 objętość krwi użytą do izolacji). Wymieszać dokładnie przez worteksowanie bądź pipetowanie.
  - o Na przykład, jeżeli do izolacji użyto 300 µl krwi osad zawiesić w 600 µl roztworu RINSE P.
  - o W niektórych przypadkach osad może nie rozpuścić się całkowicie. Ważne aby odczepił się od dna probówki i rozdrobnił na możliwie małe cząstki.
5. Wirować próbkę przez 8 min w temperaturze pokojowej z prędkością 1 500 x g. Wylać supernatant. Ostrożnie i dokładnie zebrać pipetą resztkę supernatantu znad osadu.
6. Pellet zawiesić w 200 µl roztworu **PSB**. Dokładnie wymieszać przez pipetowanie.
  - o Osad nie rozpuści się całkowicie. Ważne aby rozbił się na drobne części. Znacznie ułatwi to rozpuszczenie osadu w kolejnym kroku za pomocą buforu RL.
7. Dodać 300 µl buforu **RL**. Dokładnie wymieszać przez pipetowanie do rozpuszczenia zawieszonoego osadu.
  - o Upewnić się czy do buforu RL został dodany β-ME lub DTT (Uwaga 4 strona 3).
  - o Zawieszony w buforze PSB w punkcie 6 osad po dodaniu buforu RL dokładnie pipetować do całkowitego rozpuszczenia. Jeżeli mimo wszystko pozostaną drobne cząstki osadu należy dokładnie je rozpuścić po trawieniu Proteinazą K (kolejny punkt protokołu) przez pipetowanie roztworu.
8. Dodać 25 µl **Proteinazy K**, wymieszać dokładnie przez pipetowanie.
9. Inkubować 10-15 min w 50°C.
10. Po trawieniu dokładnie wymieszać próbkę przez pipetowanie rozpuszczając ewentualne pozostałości. Dodać 80 µl 96-100% alkoholu etylowego. Ponownie dokładnie wymieszać.
11. Przenieść próbkę do **minikolumny homogenizacyjnej** umieszczonej w 2 ml probówce odbierającej. Wirować przez 2 min z maksymalną prędkością.
  - o Wirowanie przez minikolumnę homogenizacyjną filtruje lizat oraz eliminuje ślady DNA.
12. Dodać 190 µl 96-100% alkoholu etylowego do przesączu (flow-through). Wymieszać dokładnie przez pipetowanie. Nie wirować.
  - o Po dodaniu etanolu może strącić się osad.
13. Przenieść mieszaninę (razem z osadem jeżeli powstał) do **minikolumny wiążącej** umieszczonej w probówce odbierającej. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g. Wylać przesącz.
  - o Podczas wyjmowania minikolumny zwrócić szczególną uwagę aby nie zanieczyścić próbki przesączem. Jeżeli minikolumna nie jest całkowicie sucha, wylać przesącz, umieścić ją w probówce i ponownie wirować przez 1 min.

- 
14. Dodać 500  $\mu$ l buforu płuczącego **Wash DN1** do minikolumny. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
  15. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i powtórnie umieścić minikolumnę w próbówce.
  16. Dodać 600  $\mu$ l buforu płuczącego **Wash RBW** do minikolumny. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
  17. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i powtórnie umieścić minikolumnę w próbówce. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g w celu usunięcia resztek buforu płuczącego.
  18. Minikolumnę umieścić w nowej próbówce typu Eppendorf 1.5-2 ml. Dodać 40-60  $\mu$ l **RNase-free water** centralnie na membranę.
  19. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
  20. Usunąć minikolumnę, zamknąć probówkę. RNA jest gotowe do dalszych analiz/manipulacji, może być przechowywane w 2-8°C lub zamrożone w -20°C (należy unikać wielokrotnego zamrażania i rozmrażania RNA).

## Dodatek 1: Oczyszczanie RNA z wykorzystaniem trawienia DNazą I na kolumnie

**UWAGA 1** • Poniższą procedurę wykonać po kroku z Wash DN1 w standardowym protokole.

**UWAGA 2** • Trawienie DNazą I należy wykonać z użyciem buforu DNR dołączonego do zestawu. Nie należy używać innych buforów.

**UWAGA 3** • DNaza I nie jest dołączona do zestawu.

**UWAGA 4** • Przygotować roztwór DNazy I przed rozpoczęciem izolacji. Dodać 1-2 U (Kunitz) DNazy I do 50 µl buforu DNR. Nie dodawać więcej niż 2 µl roztworu DNazy I. Stałą DNazę I zawiesić w buforze o składzie: 50 mM Tris-octan pH 7.5, 10 mM CaCl<sub>2</sub> i 50% v/v glicerol w stężeniu 1-2 U/µl (Kunitz).

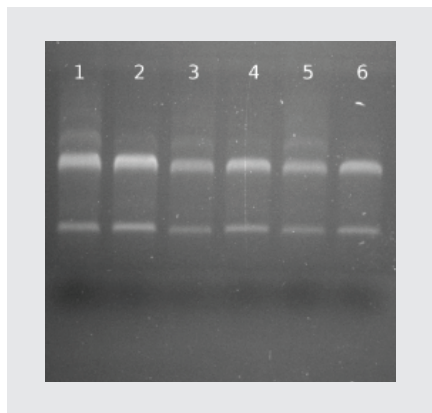
**UWAGA 5** • DNaza I jest wrażliwa i łatwo ulega denaturacji fizycznej. Nie należy mieszać jej zbyt mocno.

**UWAGA 6** • Używać tylko DNazy I wolnej od RNaz.

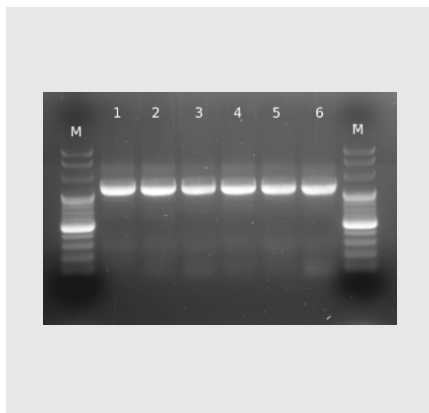
1. Po wykonaniu **Wash DN1** i odwirowaniu, wyjąć minikolumnę, wyłączyć przesącz i ponownie umieścić minikolumnę w próbówce.
2. Dodać 50 µl buforu **DNR** (z dodaną DNazą I) centralnie na membranę i pozostawić w temperaturze pokojowej na 10 min. Nie wirować.
  - o *Upewnić się czy do buforu DNR została dodana DNaza I (patrz Uwaga 4 powyżej).*
3. Dodać 400 µl buforu **Wash RBW** do minikolumny. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
4. Wyjąć minikolumnę, wyłączyć przesącz i ponownie umieścić minikolumnę w próbówce.
5. Kontynuować standardowy protokół od kroku **Wash RBW** (punkt 16 protokołu).



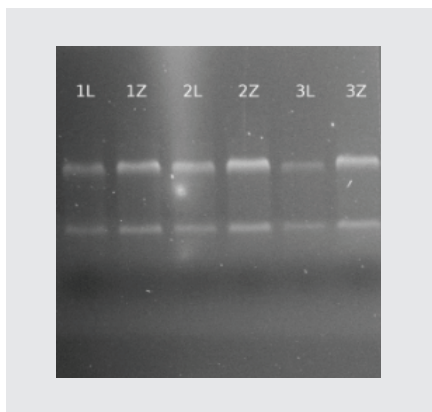
## RNA wyizolowane zestawem oraz reakcje RT-PCR



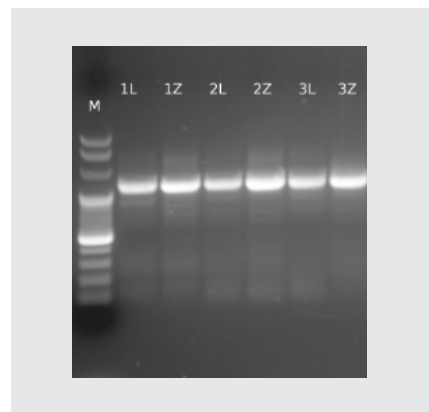
**Rys. 1a.** RNA wyizolowane z krwi ludzkiej 2 godziny po pobraniu. Wyjściowa objętość pojedynczej preparacji 0.5 ml (próbki 1-6). Na żelu 20  $\mu$ l próbki na ścieżkę (1/3 całkowitej wyizolowanej ilości RNA).



**Rys. 1b.** RT-PCR wykonany przy użyciu OneStep RT-PCR kit (EURx kat. nr E0803). Gen ARG I. Użyto po 4  $\mu$ l RNA wyizolowanego z 0.5 ml krwi ludzkiej (preparacje 1-6). M - wzorec wielkości Perfect™100 bp (EURx).



**Rys. 2a.** RNA wyizolowane z krwi ludzkiej 5 dni po pobraniu przechowywanej z dodatkiem buforu LyseBlood w lodówce (L) lub zamrażarce (Z). Wyjściowa objętość pojedynczej preparacji 0.5 ml (próbki 1-3). Na żelu 20  $\mu$ l próbki na ścieżkę (1/3 całkowitej wyizolowanej ilości RNA).



**Rys. 2b.** RT-PCR wykonany przy użyciu OneStep RT-PCR kit (EURx kat. nr E0803). Gen ARG I. Użyto po 4  $\mu$ l RNA wyizolowanego z 0.5 ml krwi ludzkiej przechowywanej 5 dni z dodatkiem buforu LyseBlood w lodówce (L) lub zamrażarce (Z) (preparacje 1-3). M - wzorec wielkości Perfect™100 bp (EURx).

# Środki ostrożności

## Lyse Blood



### Uwaga

**H315** Działa drażniąco na skórę.

**H319** Działa drażniąco na oczy.

**H400** Działa bardzo toksycznie na organizmy wodne.



**P280** Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy.

**P273** Unikać uwolnienia do środowiska.

**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.

**P310** Natychmiast skontaktować się z lekarzem.

**P302+P352** W przypadku kontaktu ze skórą: umyć dużą ilością wody.

**P332+P313** W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry: zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.

**P391** Zebrać wyciek.

## 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.

## 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.

## Wash RBW



### 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.

- **GeneMATRIX Universal Blood RNA Purification Kit jest przeznaczony do szybkiej izolacji całkowitego RNA ze świeżej lub mrożonej krwi ludzkiej bądź zwierzęcej. Oczyszczone RNA nie zawiera zanieczyszczeń m.in. takich jak: DNA, białka, lipidy, barwniki, detergenty, organiczne inhibitory enzymów, związki buforowe, sole, kationy dwuwartościowe.**

Na wstępie lizie poddane zostają wszystkie morfotyczne składniki krwi. Na etapie tym krew może zostać zamrożona i przechowana gdyż specjalny skład buforu stabilizuje RNA i chroni przed działaniem RNaz. W trakcie dalszej izolacji RNA próbka poddana zostaje rozpuszczeniu w obecności buforów denaturujących, które dodatkowo inaktywują RNazy komórkowe. Następnie lizat jest wirowany w mini-kolumienkach o specjalnej konstrukcji, które rozdrabniają komórkowe DNA, redukują lepkość lizatu i wstępnie oczyszczają preparat usuwając fragmenty DNA. Dodanie etanolu wytwarza warunki do selektywnego wiązania RNA do membrany GeneMATRIX. 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 redestylowaną, wolną od RNaz. Maksymalna wydajność procesu to ok. 100 µg RNA o długości powyżej 200 nt. Możliwe jest również oczyszczanie RNA o długości poniżej 200 nt; w takim wypadku wydajność stopniowo spada. 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<sub>2</sub>. W celu osiągnięcia wysokiej wydajności i czystości otrzymanych kwasów nukleinowych, opracowano wyspecjalizowane bufony wiążące i płuczące, projektowane pod kątem optymalnego wykorzystania właściwości nowych membran.**

Zastosowanie gotowych do użycia membran, umieszczonych w kolumienkach wirowniczych (ang. Spin-format) w połączeniu ze specjalną konstrukcją naszych minikolumn, 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 złóż 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, hybrydizacji. 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](http://www.eurx.com.pl)  
orders: email: [orders@eurx.com.pl](mailto:orders@eurx.com.pl)  
tel. +48 58 524 06 97, fax +48 58 341 74 23

