

## GeneMATRIX Human Blood RNA Purification Kit

Zestaw do izolacji całkowitego RNA ze świeżej krwi ludzkiej.

● **kat. nr. E3596**

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

<b>Uwagi wstępne</b> .....	<b>3</b>
<b>Wyposażenie i odczynniki dostarczane przez użytkownika</b> .....	<b>4</b>
<b>Protokół</b> .....	<b>5</b>
<b>Liza erytrocytów</b> .....	<b>5</b>
<b>Liza leukocytów i wiązanie RNA</b> .....	<b>5</b>
<b>Płukanie i elucja RNA</b> .....	<b>6</b>
<b>Środki ostrożności</b> .....	<b>6</b>

<b>Składniki zestawu</b>	<b>25 izolacji E3596-01</b>	<b>Warunki przechowywania</b>
Buffer A	0.9 ml	15-25°C
RL	15 ml	15-25°C
Lyse RBC 5x *	2 x 25 ml	2-8°C
RNase-free water	2 x 100 ml	15-25°C
Wash RBW	30 ml	15-25°C
Wash RB1	15 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	

\* Bufor Lyse RBC dostarczony jest jako 5x stężony. Przed użyciem buforu dodać odpowiednią ilość RNase-free water (patrz naklejka na buforze: do 25 ml Lyse RBC 5x dodać 100 ml RNase-free water).

## Uwagi wstępne

**UWAGA 1 • Przeznaczenie zestawu.** Zestaw przeznaczony jest do izolacji całkowitego RNA (powyżej 200 nt) ze świeżej krwi ludzkiej. Zestaw nie nadaje się do izolacji RNA z krwi mrożonej. W przypadku próbek mrożonych należy użyć Universal Blood RNA Purification Kit (Nr kat. E3594). W przypadku przechowywania krwi próbki muszą być stabilizowane specjalnym buforem, który znajduje się w zestawie.

**UWAGA 2 • Przechowywanie próbek.** Możliwe jest przechowywanie próbek krwi w temperaturze 4°C do kilku godzin. Wydłużenie czasu przechowywania może prowadzić do degradacji RNA oraz indukcji ekspresji genów. Zarówno degradacja *in vitro* RNA jak i indukcja ekspresji genów może prowadzić do zaniżenia lub przeszacowania względnej liczby transkryptów genów *in vivo*. Możliwe jest stosowanie heparyny, EDTA lub cytrynian do stabilizowania próbki krwi.

**UWAGA 3 • Maksymalna ilość użytego materiału.** Jedna minikolumna pozwala na oczyszczenie RNA z nie więcej niż 0.5 ml krwi. 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 i zanieczyszczenie izolatu DNA. W przypadku izolacji RNA z większej objętości krwi, do oczyszczania należy użyć odczynnika na bazie fenolu np. RNA Extracol E3700.

**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 RNase-free water i przechowywać w małych porcjach do jednokrotnego użytku.

**UWAGA 5 • Dodatkowe zalecenia.** Bufor Lyse RBC dołączony do zestawu jest 5x stężony. Przed użyciem przelać zawartość butelki RNase-free water 100 ml do butelki Lyse RBC 5x. Tak przygotowany bufor jest gotowy do użycia (Lyse RBC 1x) (patrz naklejka na buforze).

**UWAGA 6 • 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 buforu Lyse RBC5x, który należy przechowywać w 2-8°C .

**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, łańcuchki wolne od RNaz tipsy, łańcuchki wolne od RNaz próbówki 1.5-2 ml. Jeżeli początkowa objętość krwi przekracza 400  $\mu$ l – odpowiedniej wielkości, łańcuchki wolne od RNaz próbówki do lizy erytrocytów.

# Protokół

## Liza erytrocytów

1. Dodać 30  $\mu$ l buforu aktywacyjnego **Buffer A** do fioletowej **minikolumny homogenizacyjnej** (nie wirować). Pozostawić w temperaturze pokojowej do momentu naniesienia lizatu na **minikolumnę homogenizacyjną**.
  - Dodanie buforu aktywacyjnego Buffer A centralnie na powierzchnię membran zapewnia kompletne nasączenie membran buforem aktywacyjnym i uzyskanie maksymalnej wydajności wiązania RNA.
  - Aktywację należy wykonać przed rozpoczęciem procedury izolacji RNA.
2. Do świeżej krwi dodać 4 objętości buforu **Lyse RBC**. Wymieszać przez odwracanie próbówki.
  - Na przykład, do 300  $\mu$ l krwi dodać 1200  $\mu$ l buforu Lyse RBC.
  - Maksymalna ilość krwi to 0.5 ml. W przypadku próbki krwi o objętości 0.5 ml - 1.5 ml, do izolacji RNA należy użyć odczynnika na bazie fenolu np. RNA Extracol E3700, aby uniknąć zanieczyszczenia DNA. Rekomendowana procedura: liza krwi z użyciem Lyse RBC zgodnie z protokołem E3700: Rozdrobnienie i homogenizacja próbki, pkt. 5 Krew (leukocyty). Rozdzielenie faz za pomocą chloroformu, a następnie odwirowanie i zebranie górnej warstwy wodnej i przeniesienie do nowej próbówki. Dodanie etanolu (96-100% [v/v]) w objętości 1:1 i naniesienie roztworu do minikolumny wiążącej (pkt 9 protokołu Human Blood RNA Purification Kit. Kontynuować zgodnie z protokołem Human Blood RNA Purification Kit.
  - Nie używać krwi mrożonej.
  - Rozcieńczyć bufor Lyse RBC5x.
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.
  - 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.
  - Na przykład, jeżeli do izolacji użyto 300  $\mu$ l krwi dodać 600  $\mu$ 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.

## Liza leukocytów i wiązanie RNA

7. Pellet zawiesić w 400 µl buforu **RL**. Dobrze wymieszać przez pipetowanie i worteksowanie.
  - o Dopuszczalne jest czerwone zabarwienie pelletu.
  - o Upewnić się czy do buforu RL został dodany β-ME lub DTT (patrz Uwaga 4 strona 3).
8. Przenieść próbkę do **minikolumny homogenizacyjnej** umieszczonej w 2 ml próbówce odbierającej. Wirować przez 2 min z maksymalną prędkością.
  - o Wirowanie przez minikolumnę homogenizacyjną filtruje i homogenizuje lizat oraz eliminuje ślady DNA.
9. Dodać 250 µl 96-100% alkoholu etylowego do przesączu (flow-through). Wymieszać dokładnie przez pipetowanie. Nie wirować.
  - o Po dodaniu etanolu może strącić się osad.
10. Przenieść mieszaninę (razem z osadem jeżeli powstał) do **minikolumny wiążącej** umieszczonej w próbówce odbierającej. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g. Wylać przesącz.

## Płukanie i elucja RNA

11. Dodać 500 µl buforu płuczącego **Wash RB1** do minikolumny. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
12. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i powtórnie umieścić minikolumnę w próbówce.
13. Dodać 600 µl buforu płuczącego **Wash RBW** do minikolumny. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
14. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i powtórnie umieścić minikolumnę w próbówce.
15. Dodać 300 µl buforu płuczącego **Wash RBW** do minikolumny. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
16. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i powtórnie umieścić minikolumnę w próbówce.
17. 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 µl **RNase-free water** centralnie na membranę.
19. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
20. Usunąć minikolumnę, zamknąć próbkę. 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).

# Środki ostrożności

## Buffer A



### Niebezpieczeństwo

**H314** Powoduje poważne oparzenia skóry oraz uszkodzenia oczu.

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

**P301+P330+P331** W przypadku połknięcia: wypluć usta. NIE wywoływać wymiotów.

**P303+P361+P353** W przypadku kontaktu ze skórą (lub z włosami): Natychmiast zdjąć całą zanieczyszczoną odzież. Spłukać skórę pod strumieniem wody [lub prysznicem].

**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 ośrodkiem zatruc/lekarzem.

**P405** Przechowywać pod zamknięciem.

## 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 RB1



### Uwaga

**H226** Łatwopalna ciecz i pary.

**H302** Działa szkodliwie po połknięciu.

**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.

**P301+P312** W przypadku połknięcia: w przypadku złego samopoczucia skontaktować się z ośrodkiem zatruc/lekarzem.

**P403+P235** Przechowywać w dobrze wentylowanym miejscu. Przechowywać w chłodnym miejscu.

**EUH032** W kontakcie z kwasami uwalnia bardzo toksyczne gazy.

## 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 Human Blood RNA Purification Kit jest przeznaczony do szybkiej izolacji całkowitego RNA ze świeżej krwi ludzkiej. 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 erytrocyty natomiast leukocyty zostają odwirowane. W trakcie dalszej izolacji RNA próbka poddana zostaje lizie w obecności buforów denaturujących, które inaktywują RNazy komórkowe. Następnie lizat jest wirowany w mini-kolumnkach 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 kolumnkach 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, 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](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

