

GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit

Uniwersalny zestaw do izolacji całkowitego RNA

● **kat. nr. E3598**

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.....	4
Tkanki zwierzęce	5
Tkanki roślinne.....	7
Bakterie.....	9
Drożdże	11
Hodowle komórkowe	12
Krew (leukocyty).....	14
Grzyby	16
Dodatek 1: Protokół izolacji RNA z tkanek zwierzęcych z użyciem Proteinazy K	17
Dodatek 2: Oczyszczanie RNA z wykorzystaniem trawienia DNazą I na kolumnie.....	19
Dodatek 3: Oczyszczanie RNA po reakcjach enzymatycznych	20
Dodatek 4: Protokół izolacji RNA z tkanek zwierzęcych z użyciem mieszaniny RNA Extracol	21
Dodatek 5: Alternatywna metoda przygotowania materiału do izolacji RNA z drożdży z wykorzystaniem kulek szklanych BeadTubesDry	23
Dodatek 6: Izolacja RNA z roślin bogatych w związki fenolowe.....	25
Środki ostrożności	26

Składniki zestawu	25 izolacji E3598-01	100 izolacji E3598-02	Warunki przechowywania
LG	6 ml	24 ml	15-25°C
RL	15 ml	60 ml	15-25°C
Wash DN1	12 ml	48 ml	15-25°C
Wash RBW	27 ml	108 ml	15-25°C
DNR	1.5 ml	6 ml	15-25°C
RNase-free water	3 ml	12 ml	15-25°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 przeznaczony jest do izolacji całkowitego RNA (powyżej 200 nt) z tkanek zwierzęcych, roślin, bakterii, drożdży, hodowli komórkowych oraz świeżej krwi (leukocyty). Zestaw może być użyty do izolacji RNA z trudnych tkanek zwierzęcych z trawieniem Proteinazą K, oczyszczania RNA po reakcjach enzymatycznych, izolacji RNA z wykorzystaniem RNA Extracolu oraz oczyszczania RNA z trawieniem DNazą I na minikolumnie.

UWAGA 2 • Maksymalna ilość użytego materiału. Maksymalna pojemność minikolumny wiążącej RNA to 100 µg. Maksymalna objętość płynu nanoszonego na minikolumnę to 650 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 homogenizacyjnych i wiążących, które należy przechowywać w 2-8°C.

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 LG oraz RL do 1 ml dodać 10 µl β-merkaptoetanolu (β-ME, 14.3M). Po dodaniu β-ME buforu LG oraz RL są stabilne przez 1 miesiąc. Alternatywą jest dodanie do 1 ml tychże buforów 10 µl DTT (dodawac [1 M] roztwór DTT w wodzie wolnej od RNaz). DTT nie jest stabilny w buforze RL lub LG 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 • Dodatkowe zalecenia. Poniższa procedura efektywnie eliminuje całość DNA lub w przypadku zbyt dużej ilości materiału użytego do izolacji i przeładowania minikolumny homogenizacyjnej większość DNA. W związku z tym w przypadku niektórych zastosowań RNA szczególnie wrażliwych na minimalne ilości DNA, proponujemy oczyszczanie zgodnie z Dodatkiem 2 (strona 19) 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. 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 do oczyszczania RNA należy przechowywać szczelnie zamknięte, aby uniknąć zmiany stężenia w wyniku parowania.

Wyposażenie i odczynniki dostarczane przez użytkownika

- Do wszystkich protokołów: 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, łańcuch wolny od RNaz tipsy, łańcuch wolny od RNaz próbki 1.5-2 ml, opcjonalnie DNaza I do trawienia na kolumnie (patrz Dodatek 2 strona 19).
- Do protokołu z bakterii – lizozym, bufor TE (10 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA).
- Do protokołu z tkanek roślinnych i zwierzęcych – sprzęt konieczny do rozdrobnienia i homogenizacji tkanek, w zależności od wybranej metody: młyn i ciekły azot lub mechaniczny homogenizator.
- Do protokołu z tkanek zwierzęcych – opcjonalnie Proteinaza K, EURx nr kat. E4350 (patrz Dodatek 1 strona 16).
- Do protokołu z drożdży - BeadTubeDry nr kat. E0358, bufor PBS (nr kat. E0281) lub 0.9% NaCl. Ewentualnie bufor YL: 1 M sorbitol, 0.1 M EDTA, oraz litykaza nr kat. E0329.
- Do protokołu z krwi – bufor do lizy erytrocytów Lyse RBC, EURx nr kat. E0326. Jeżeli początkowa objętość krwi przekracza 400 μl – odpowiedniej wielkości, łańcuch próbki do lizy erytrocytów.
- Do protokołu z wykorzystaniem RNA Extracol (patrz Dodatek 4 strona 21) – RNA Extracol, EURx nr kat. E3750, chloroform lub 1-bromo-3-chloropropan, izopropanol, alkohol etylowy [75% v/v].
- Opcjonalnie do protokołu z tkanek roślinnych – odczynnik redukujący pianę do roztworów lizujących AFR01, EURx nr kat. E0328. W wielu przypadkach pierwszym etapem izolacji RNA jest rozdrobnienie i homogenizacja próbki. Przeprowadza się ją w buforach lizujących bogatych w detergenty, które powodują znaczne spienienie mieszaniny homogenizacyjnej. Widoczne jest to zwłaszcza podczas użycia homogenizatorów mechanicznych bądź wytrząsania próbek z różnego rodzaju kulkami rozdrabniającymi. Aby zapobiec tworzeniu się nadmiaru piany można dodać odczynnik AFR01 do buforu LG w ilości 5 μl na 1 ml roztworu [0.5% (v/v)] i dobrze wymieszać. W przypadku bardzo silnego spienienia, po homogenizacji próbkę należy zwirować z prędkością 8 000 x g przez 30 sekund.
- Opcjonalnie do protokołu z tkanek roślinnych - Lyse Buffer PVP nr kat. E0291-01 do lizy tkanek u gatunków roślin, szczególnie bogatych w związek fenolowe i polisacharydy oraz tkanki zdrewniałe.

Tkanki zwierzęce

UWAGA 1 • Protokół przeznaczony jest do izolacji całkowitego RNA (powyżej 200 nt) z tkanek zwierzęcych.

UWAGA 2 • Izolację RNA z trudnych materiałów bogatych w kolagen, białka kurczliwe czy tkankę łączną (np. serce, mięśnie czy skóra) polecamy prowadzić zgodnie z **Dodatkiem 1** (strona 16) z użyciem Proteinyzy K. Izolację RNA z materiałów bogatych w tłuszcze (np. mózg, tłuste tkanki) polecamy prowadzić zgodnie z **Dodatkiem 4** (strona 21) z użyciem RNA Extracolu.

UWAGA 3 • Używając mózdzierza i tłuczka izolować maksymalnie z 30 mg tkanek stałych na jedną minikolumnę. Korzystając z homogenizatora mechanicznego użyć do 10 razy mniej materiału do izolacji.

UWAGA 4 • W trakcie czynności związanych z izolacją RNA, zamrożone tkanki nie powinny ulec rozmrożeniu.


UWAGA 5 • Przed użyciem buforu RL do 1 ml dodać 10 µl β-merkptoetanolu (β-ME) lub 10 µl DTT. Po dodaniu β-ME bufor RL jest stabilny przez 1 miesiąc. DTT nie jest stabilny w buforze RL (patrz Uwaga 4 strona 3).

- a)** Zamrozić fragment tkanki w ciekłym azocie, a następnie dokładnie rozdrobnić, używając do tego celu wcześniej schłodzonego mózdzierza i tłuczka. Umieścić rozdrobnioną tkankę w schłodzonej, RNase-free 2 ml próbówce typu Eppendorf.

 - Fragment tkanki należy rozbić jak najdrobniej, gdyż jest to etap decydujący o wydajności izolacji RNA.
 - Zamrożone tkanki nie powinny ulec rozmrożeniu.
 - Nie należy używać więcej niż 30 mg tkanek.

b) Rozdrobnić fragment tkanki (świeży lub zamrożony) mechanicznie w 400 µl buforu **RL** za pomocą homogenizatora. Przejść do punktu 3.

 - Fragment tkanki należy zhomogenizować/rozbić jak najdrobniej, gdyż jest to etap decydujący o wydajności izolacji RNA.
 - Korzystając z homogenizatora mechanicznego należy użyć do 10 razy mniej materiału do izolacji niż w przypadku mózdzierza i tłuczka.
- Dodać 400 µl buforu **RL** do rozdrobnionej tkanki. Dokładnie wymieszać przez wortekowanie.
- Wirować próbkę przez 3 min z maksymalną prędkością.
- Ostrożnie przenieść supernatant do **minikolumny homogenizacyjnej** umieszczonej w 2 ml próbówce odbierającej. Wirować przez 2 min z prędkością 11 000 x g.

- 
- *Wirowanie przez minikolumnę homogenizacyjną filtruje i homogenizuje lizat oraz eliminuje DNA.*
 - 5. Do przesączu (flow-through) dodać 0.7 objętości alkoholu etylowego (96-100%). Wymieszać dokładnie przez pipetowanie. Nie wirować.
 - *Na przykład, do 400 µl przesączu dodać 280 µl etanolu.*
 - 6. 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.
 - 7. Dodać 400 µl buforu płuczącego **Wash DN1** do minikolumny. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
 - *Krok ten efektywnie eliminuje ślady DNA. Jednakże w przypadku niektórych zastosowań RNA szczególnie wrażliwych na minimalne ilości DNA, dalsze kroki proponujemy wykonać zgodnie z Dodatkiem 2 (strona 19) wykorzystującym trawienie preparatu DNazą I (w trakcie izolacji na minikolumnie).*
 - 8. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i powtórnie umieścić minikolumnę w probówce.
 - 9. Dodać 600 µl buforu płuczącego **Wash RBW** do minikolumny. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
 - 10. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i powtórnie umieścić minikolumnę w probówce.
 - 11. Dodać 300 µl buforu płuczącego **Wash RBW** 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.*
 - 12. Minikolumnę umieścić w nowej probówce typu Eppendorf 1.5-2 ml. Dodać 30-100 µl **RNase-free water** centralnie na membranę.
 - 13. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
 - 14. 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).

Tkanki roślinne

UWAGA 1 • Protokół przeznaczony jest do izolacji całkowitego RNA (powyżej 200 nt) z tkanek roślinnych.

UWAGA 2 • Używając moździerca i tłuczka izolować maksymalnie z 100 mg tkanek roślinnych na jedną minikolumnę. Korzystając z homogenizatora mechanicznego użyć do 10 razy mniej materiału do izolacji.

UWAGA 3 • Przed użyciem buforów RL oraz LG do 1 ml każdego z nich dodać po 10 µl β-merkaptoetanolu (β-ME) lub 10 µl DTT. Po dodaniu β-ME bufony RL i LG są stabilne przez 1 miesiąc. DTT nie jest stabilny w buforze RL lub LG (patrz Uwaga 4 strona 3).


UWAGA 4 • W przypadku pracy z roślin o dużej zawartości związków fenolowych/zdrewniałych lub problemów z uzyskaniem RNA/DNA zdatnego do analiz PCR/RT-PCR proponujemy zastąpienie buforu LG buforem Lyse Buffer PVP nr kat. E0291-01 i postępowanie zgodnie z dodatkiem 6 (patrz strona 25).

- a)** Zamrozić fragment tkanki roślinnej w ciekłym azocie, a następnie dokładnie rozdrobnić, używając do tego celu wcześniej schłodzonego moździerca i tłuczka. Umieścić rozdrobnioną tkankę (max. 100 mg) w schłodzonej, RNase-free 2 ml probówce typu Eppendorf. Dodać 200 µl buforu **LG** oraz 100 µl buforu **RL** do rozdrobnionej tkanki. Dokładnie wymieszać przez worteksowanie.

 - Nie należy używać więcej niż 100 mg tkanek.
 - Fragment tkanki należy rozbić jak najdrobniej, gdyż jest to etap decydujący o wydajności izolacji.
 - Zamrożone tkanki nie powinny ulec rozmrożeniu.
- b)** Rozdrobnić fragment tkanki (świeży lub zamrożony) mechanicznie za pomocą homogenizatora w mieszaninie 200 µl buforu **LG** oraz 100 µl buforu **RL**.

 - W celu podniesienia wydajności izolacji zalecamy użycie homogenizatora mechanicznego. Korzystając z homogenizatora mechanicznego należy użyć do 10 razy mniej materiału do izolacji niż w przypadku moździerca i tłuczka.
- Wirować próbkę przez 4 min z maksymalną prędkością.
- Ostrożnie przenieść supernatant do nowej, RNase-free, probówki 1.5-2 ml typu Eppendorf i dodać 200 µl buforu **RL**. Dokładnie wymieszać przez pipetowanie.
- Ostrożnie przenieść supernatant do **minikolumny homogenizacyjnej** umieszczonej w 2 ml probówce odbierającej. Wirować przez 2 min z maksymalną prędkością.

 - Wirowanie przez minikolumnę homogenizacyjną filtruje i homogenizuje lizat oraz eliminuje DNA.
- Do przesączu (flow-through) dodać 0.6 objętości alkoholu etylowego (96-100%). Wymieszać dokładnie przez pipetowanie. Nie wirować.

- 
- *Na przykład, do 400 µl przesączu dodać 240 µl etanolu.*
 - 6. 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.
 - 7. Dodać 400 µl buforu płuczącego **Wash DN1** do minikolumny. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
 - *Krok ten efektywnie eliminuje ślady DNA. Jednakże w przypadku niektórych zastosowań RNA szczególnie wrażliwych na minimalne ilości DNA, dalsze kroki proponujemy wykonać zgodnie z Dodatkiem 2 (strona 19) wykorzystującym trawienie preparatu DNaz I (w trakcie izolacji na minikolumnie).*
 - 8. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i powtórnie umieścić minikolumnę w probówce.
 - 9. Dodać 600 µl buforu płuczącego **Wash RBW** do minikolumny. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
 - 10. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i powtórnie umieścić minikolumnę w probówce.
 - 11. Dodać 300 µl buforu płuczącego **Wash RBW** 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.*
 - 12. Minikolumnę umieścić w nowej probówce typu Eppendorf 1.5-2 ml. Dodać 30-100 µl **RNase-free water** centralnie na membranę.
 - 13. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
 - 14. 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).

Bakterie


UWAGA 1 • Protokół jest przeznaczony do izolacji całkowitego RNA (powyżej 200 nt) zarówno z bakterii Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych.

UWAGA 2 • Przed izolacją należy przygotować bufor TE z dodatkiem lizozymu: 500 µg/ml dla bakterii Gram- lub 5 mg/ml dla bakterii Gram + .

UWAGA 3 • Przed użyciem buforu RL do 1 ml dodać 10 µl β-merkaptoetanolu (β-ME) lub 10 µl DTT. Po dodaniu β-ME bufor RL jest stabilny przez 1 miesiąc. DTT nie jest stabilny w buforze RL (patrz Uwaga 4 strona 3).

UWAGA 4 • Hodowlę należy zwirować w 4°C. Następne etapy należy wykonywać w temperaturze pokojowej. Izolację należy wykonywać ze świeżo zwirowanych hodowli.

1. Zwirować nocną hodowlę bakteryjną (5 min w 4°C), dokładnie usunąć supernatant.
 - o Nie należy używać więcej niż 1×10^9 bakterii.
 - o Najwyższej jakości RNA uzyskuje się z hodowli bakteryjnych znajdujących się w fazie logarytmicznej wzrostu lub wczesnej fazie stacjonarnej.
2. Dokładnie zawiesić osad bakteryjny w 100 µl buforu TE zawierającego lizozym (patrz Uwaga 2).
3. Inkubować próbkę w temperaturze pokojowej:
 - a) 5-10 min bakterie gram-ujemne
 - b) 15-20 min bakterie gram-dodatnie
4. Dodać 350 µl buforu **RL**. Dokładnie wymieszać przez worteksowanie.
5. Przenieść lizat do **minikolumny homogenizacyjnej** umieszczonej w 2 ml próbownicy odbierającej. Wirować przez 2 min z maksymalną prędkością.
 - o Wirowanie przez minikolumnę homogenizacyjną filtruje i homogenizuje lizat oraz eliminuje DNA.
6. Dodać 250 µl alkoholu etylowego (96-100%) do przesączu (flow-through). Wymieszać dokładnie przez pipetowanie. Nie wirować.
 - o Po dodaniu etanolu może strącić się osad.
7. Przenieść mieszaninę (razem z osadem jeżeli powstał) do **minikolumny wiążącej** umieszczonej w próbownicy odbierającej. Wirować przez 1 min z prędkością $11\ 000 \times g$. Wylać przesącz.
8. Dodać 400 µl buforu płuczącego **Wash DN1** do minikolumny. Wirować przez 1 min



z prędkością 11 000 x g.

o Krok ten efektywnie eliminuje ślady DNA. Jednakże w przypadku niektórych zastosowań RNA szczególnie wrażliwych na minimalne ilości DNA, dalsze kroki proponujemy wykonać zgodnie z Dodatkiem 2 (strona 19) wykorzystującym trawienie preparatu DNazą I (w trakcie izolacji na minikolumnie).

9. Wyjąć minikolumnę, wyłączyć przesącz i powtórnie umieścić minikolumnę w probówce.
10. Dodać 600 µl buforu płuczącego **Wash RBW** do minikolumny. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
11. Wyjąć minikolumnę, wyłączyć przesącz i powtórnie umieścić minikolumnę w probówce.
12. Dodać 300 µl buforu płuczącego **Wash RBW** do minikolumny. Wirować przez 2 min z prędkością 11 000 x g.

o 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.
13. Minikolumnę umieścić w nowej probówce typu Eppendorf 1.5-2 ml. Dodać 30-100 µl **RNase-free water** centralnie na membranę.
14. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
15. 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).

Drożdże

UWAGA 1 • Protokół przeznaczony jest do izolacji całkowitego RNA (powyżej 200 nt) z drożdży.

UWAGA 2 . Ze względu na zwiększoną wydajność izolacji RNA z drożdży zalecamy izolację RNA z użyciem protokołu dodatek 5: Alternatywna metoda przygotowania materiału do izolacji RNA z drożdży z wykorzystaniem kulek szklanych BeadTubesDry (patrz strona 23).

UWAGA 3 • Korzystając z metody z trawieniem enzymatycznym przygotować przed izolacją bufor YL: 1 M sorbitol, 0.1 M EDTA. Przed użyciem dodać: 10 µl (50 U) litykazy E0329 na 1×10^7 komórek, 0.1% β-merkaptotoetanolu lub DTT.

UWAGA 4 • Przed użyciem buforu RL do 1 ml dodać 10 µl β-merkaptotoetanolu (β-ME) lub 10 µl DTT. Po dodaniu β-ME bufor RL jest stabilny przez 1 miesiąc. DTT nie jest stabilny w buforze RL (patrz Uwaga 4 strona 3).

UWAGA 5 • Hodowlę należy zwirować w 4°C. Następne etapy należy wykonywać w temperaturze pokojowej. Izolację należy wykonywać ze świeżo zwirowanych hodowli.

1. Zwirować odpowiednią ilość hodowli drożdży z prędkością 5 000 x g przez 5 min w 4°C. Dokładnie usunąć supernatant.
 - o Nie należy używać więcej niż 5×10^7 komórek drożdży.
2. Zawiesić osad w 1.5 ml buforu **YL** zawierającego litykazę (patrz Uwaga 3). Inkubować przez 30 min w 30°C.
 - o Należy użyć świeżo hodowanych komórek.
3. Zwirować powstałe sferoplasty przez 5 min z prędkością 1 000 x g.
4. Dodać 350 µl buforu **RL** do osadu. Dokładnie wymieszać przez worteksowanie.
5. Przenieść lizat 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 DNA.
6. Dodać 250 µl alkoholu etylowego (96-100%) do przesączu (flow-through). Wymieszać dokładnie przez pipetowanie. Nie wirować.
7. 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.
8. Dodać 400 µl buforu płuczącego **Wash DN1** do minikolumny. Wirować przez 1 min

z prędkością 11 000 x g.

o Krok ten efektywnie eliminuje ślady DNA. Jednakże w przypadku niektórych zastosowań RNA szczególnie wrażliwych na minimalne ilości DNA, dalsze kroki proponujemy wykonać zgodnie z Dodatkiem 2 (strona 19) wykorzystującym trawienie preparatu DNazą I (w trakcie izolacji na minikolumnie).

9. Wyjąć minikolumnę, wyłączyć przesącz i powtórnie umieścić minikolumnę w probówce.
10. Dodać 600 µl buforu płuczącego **Wash RBW** do minikolumny. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
11. Wyjąć minikolumnę, wyłączyć przesącz i powtórnie umieścić minikolumnę w probówce.
12. Dodać 300 µl buforu płuczącego **Wash RBW** do minikolumny. Wirować przez 2 min z prędkością 11 000 x g.

o 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.
13. Minikolumnę umieścić w nowej probówce typu Eppendorf 1.5-2 ml. Dodać 30-100 µl **RNase-free water** centralnie na membranę.
14. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
15. 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).

Hodowle komórkowe

UWAGA 1 • Protokół jest przeznaczony do izolacji całkowitego RNA (powyżej 200 nt) z hodowli komórkowych.

UWAGA 2 • Nie należy używać więcej niż 10⁶ komórek.

UWAGA 3 • Przed użyciem buforu RL do 1 ml dodać 10 µl β-merkaptoetanolu (β-ME) lub 10 µl DTT. Po dodaniu β-ME bufor RL jest stabilny przez 1 miesiąc. DTT nie jest stabilny w buforze RL (patrz Uwaga 4 strona 3).

1. W probówce 2 ml typu Eppendorf zwirować hodowlę komórek przez 5 min z prędkością 1 000 x g. Ostrożnie wybrać supernatant znad osadu.
2. Dodać 400 µl buforu **RL** do osadu. Dokładnie wymieszać przez worteksowanie.
3. Przenieść lizat do **minikolumny homogenizacyjnej** umieszczonej w 2 ml probówce

- odbierającej. Wirować przez 2 min z maksymalną prędkością.
- *Wirowanie przez minikolumnę homogenizacyjną filtruje i homogenizuje lizat oraz eliminuje DNA.*
4. Dodać 250 µl alkoholu etylowego (96-100%) do przesączu (flow-through). Wymieszać dokładnie przez pipetowanie. Nie wirować.
 5. 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.
 6. Dodać 400 µl buforu płuczącego **Wash DN1** do minikolumny. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
 - *Krok ten efektywnie eliminuje ślady DNA. Jednakże w przypadku niektórych zastosowań RNA szczególnie wrażliwych na minimalne ilości DNA, dalsze kroki proponujemy wykonać zgodnie z Dodatkiem 2 (strona 19) wykorzystującym trawienie preparatu DNazą I (w trakcie izolacji na minikolumnie).*
 7. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i powtórnie umieścić minikolumnę w probówce.
 8. Dodać 600 µl buforu płuczącego **Wash RBW** 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 RBW** do minikolumny. Wirować przez 1 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 30-100 µl **RNase-free water** 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 przechowywane w 2-8°C lub zamrożone w -20°C (należy unikać wielokrotnego zamrażania i rozmrażania RNA).

Krew (leukocyty)

UWAGA 1 • Protokół 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 • Po etapie lizy erytrocytów (punkt 5 protokołu), leukocyty można przechowywać zawieszone w roztworze fix RNA (EURx nr kat. E0280).

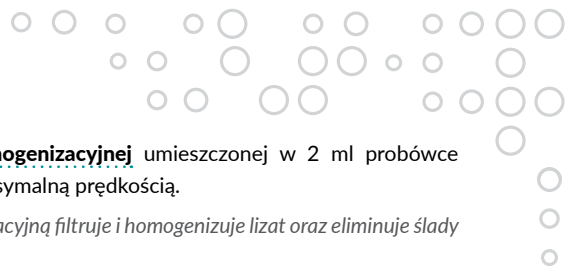
UWAGA 3 • Jedna minikolumna pozwala na oczyszczenie RNA z nie więcej niż 0,75 ml krwi (do 10^6 komórek jądrzastych).

UWAGA 4 • Do izolacji RNA z próbki krwi o objętości większej niż 0,75 ml należy zastosować dodatek 4 niniejszego protokołu (str. 21).

UWAGA 5 • Przed użyciem buforu RL do 1 ml dodać 10 μ l β -merkaptoetanolu (β -ME) lub 10 μ l DTT. Po dodaniu β -ME bufor RL jest stabilny przez 1 miesiąc. DTT nie jest stabilny w buforze RL (patrz Uwaga 4 strona 3).

UWAGA 6 • Zestaw nie zawiera buforu Lyse RBC. Bufor Lyse RBC dostępny jest jako oddzielny produkt EURx nr kat. E0326.

1. 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 Maksymalna ilość krwi to 0,75 ml.
2. Pozostawić w 4°C na 10 minut w celu lizy erytrocytów. Wymieszać dwa razy.
3. Wirować próbkę przez 10 min w 4°C z prędkością 400 x g. Wylać supernatant.
 - o Ostrożnie zebrać pipetą nad osadu resztkę supernatantu.
4. 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.
5. Wirować próbkę przez 10 min w 4°C z prędkością 400 x g. Wylać supernatant.
 - o Ostrożnie zebrać pipetą nad osadu resztkę supernatantu.
6. Pellet zawiesić w 400 μ l buforu **RL**. Dobrze wymieszać przez pipetowanie i worteksowanie.
 - o Dopuszczalne jest czerwone zabarwienie pelletu.

- 
7. Przenieść próbkę do **minikolumny homogenizacyjnej** umieszczonej w 2 ml probówce odbierającej. Wirować przez 2 min z maksymalną prędkością.
 - *Wirowanie przez minikolumnę homogenizacyjną filtruje i homogenizuje lizat oraz eliminuje ślady DNA.*
 8. Dodać 250 µl 96-100% alkoholu etylowego do przesączu (flow-through). Wymieszać dokładnie przez pipetowanie. Nie wirować.
 9. 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.
 10. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i powtórnie umieścić minikolumnę w probówce.
 11. Dodać 600 µl buforu płuczącego **Wash RBW** do minikolumny. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
 12. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i powtórnie umieścić minikolumnę w probówce.
 13. Dodać 300 µl buforu płuczącego **Wash RBW** do minikolumny. Wirować przez 1 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.*
 14. Minikolumnę umieścić w nowej probówce typu Eppendorf 1.5-2 ml. Dodać 30-100 µl **RNase-free water** centralnie na membranę.
 15. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
 16. 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).
-

Grzyby

UWAGA 1 • Protokół przeznaczony jest do izolacji całkowitego RNA (powyżej 200 nt) z owocników grzybów lub grzybni wolnej od gleby. Do detekcji RNA/DNA z grzybni wraz z ziemią (próbka środowiskowa) należy użyć zestawu Environmental DNA & RNA Purification Kit nr kat. E3572.

UWAGA 2 • Przed użyciem buforu RL należy dodać 10 µl β-merkaptioetanolu (β-ME) lub 10 µl DTT do 1 ml buforu. Po dodaniu β-ME bufor RL jest stabilny przez 1 miesiąc. DTT nie jest stabilny w buforze RL (patrz Uwaga 4 strona 3).

UWAGA 3 • Nie przekraczać 50 mg próbki do jednej izolacji RNA. Do izolacji RNA należy użyć świeżych owocników lub grzybni. Stare owocniki, lub przesuszona grzybnia, posiadają mało RNA i jest ono zdegradowane.

UWAGA 4 • Do homogenizacji można użyć homogenizatora mechanicznego, moździerza i ciekłego azotu lub Tissue Grinding Tool E0359-03; E0359-04.

UWAGA 5 • Tissue Grinding Tool E0359-03 lub E0359-04 składa się z próbówki o objętości 1.5 ml ze złożem granitowym i patyczka do rozcierania. Zestaw dostępny jest jako osobny produkt. Należy zamawiać oddzielnie.

1. Wybrać metodę homogenizacji próbki:
 - a) Do Tissue Grinding Tool dodać 400 µl buforu RL oraz fragment owocnika grzyba lub grzybni i bardzo dobrze rozetrzeć patyczkiem z zestawu.
 - b) Zamrozić fragment tkanki w ciekłym azocie, a następnie dokładnie rozdrobnić, używając do tego celu wcześniej schłodzonego moździerza i tłuczka. Umieścić rozdrobnioną tkankę w schłodzonej, RNase-free 2 ml próbówce typu Eppendorf.
 - c) Rozdrobnić fragment tkanki (świeży lub zamrożony) mechanicznie w 400 µl buforu RL za pomocą homogenizatora.
 - o *Fragment tkanki należy rozbić jak najdrobniej, gdyż jest to etap decydujący o wydajności izolacji RNA. Zamrożone tkanki nie powinny ulec rozmrożeniu. Nie należy używać więcej niż 50 mg grzybni.*
2. W przypadku metod homogenizacji a) i c): Przejść do pkt 3 części „Tkanki zwierzęce” strona 5 protokołu. W przypadku metody homogenizacji b): Przejść do pkt 2 części „Tkanki zwierzęce” strona 5 protokołu.

Dodatek 1: Protokół izolacji RNA z tkanek zwierzęcych z użyciem Proteiny K

UWAGA 1 • Dodatek przeznaczony jest do izolacji całkowitego RNA (powyżej 200 nt) z użyciem Proteiny K z trudnych materiałów bogatych w kolagen, białka kurczliwe czy tkankę łączną (np. serce, mięśnie czy skóra).

UWAGA 2 • Jedna minikolumna pozwala na oczyszczenie RNA z nie więcej niż 30 mg tkanek stałych.

UWAGA 3 • Przed użyciem buforu RL do 1 ml dodać 10 µl β-merkaptoetanolu (β-ME) lub 10 µl DTT. Po dodaniu β-ME bufor RL jest stabilny przez 1 miesiąc. DTT nie jest stabilny w buforze RL (patrz Uwaga 4 strona 3).


UWAGA 4 • Przygotować roztwór wodny (20 mg/ml) Proteiny K. Polecamy użycie Proteiny K EURx nr kat. E4350.

- a) Zamrozić fragment tkanki w ciekłym azocie, a następnie dokładnie rozdrobnić, używając do tego celu wcześniej schłodzonego moździerza i tłuczka. Umieścić rozdrobnioną tkankę w schłodzonej, RNase-free 2 ml próbówce typu Eppendorf.

 - Fragment tkanki należy zhomogenizować/rozbić jak najdrobniej, gdyż jest to etap decydujący o wydajności izolacji RNA.
 - Zamrożone tkanki nie powinny ulec rozmrożeniu.
 - Nie należy używać więcej niż 30 mg tkanek.

b) Rozdrobnić fragment tkanki (świeży lub zamrożony) mechanicznie w 300 µl buforu **RL** za pomocą homogenizatora. Przejść do punktu 3.

 - Korzystając z homogenizatora mechanicznego należy użyć do 10 razy mniej materiału do izolacji niż w przypadku moździerza i tłuczka.
 - W celu podniesienia wydajności izolacji zalecamy użycie homogenizatora mechanicznego.
2. Dodać 300 µl buforu **RL** do rozdrobnionej tkanki. Dokładnie wymieszać przez worteksowanie.
3. Ostrożnie przenieść próbkę do **minikolumny homogenizacyjnej** umieszczonej w 2 ml próbówce odbierającej. Wirować przez 2 min z maksymalną prędkością.
 - Wirowanie przez minikolumnę homogenizacyjną filtruje i homogenizuje lizat oraz eliminuje DNA.
4. Do przesączu dodać 600 µl jałowej, podwójnie destylowanej wody, dokładnie wymieszać. Dodać 15 µl Proteiny K (20mg/ml), wymieszać dokładnie przez pipetowanie.
5. Inkubować 10 min w 55°C.

- 
6. Dodać 0.5 objętości **96-100%** alkoholu etylowego do próbki. Wymieszać dokładnie przez pipetowanie. Nie wirować.
 7. Przenieść 650 µl mieszaniny (razem z osadem jeżeli powstał) do **minikolumny wiążącej** umieszczonej w probówce odbierającej. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g. Wylać przesącz.
 8. Powtórzyć punkt 7: przenieść pozostałą mieszaninę do tej samej **minikolumny wiążącej** umieszczonej w probówce odbierającej. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g. Wylać przesącz.
 9. Dodać 400 µl buforu płuczącego **Wash DN1** do minikolumny. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
 - *Krok ten efektywnie eliminuje ślady DNA. Jednakże w przypadku niektórych zastosowań RNA szczególnie wrażliwych na minimalne ilości DNA, dalsze kroki proponujemy wykonać zgodnie z Dodatkiem 2 (strona 19) wykorzystującym trawienie preparatu DNazą I (w trakcie izolacji na minikolumnie).*
 10. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i ponownie umieścić minikolumnę w probówce.
 11. Dodać 600 µl buforu płuczącego **Wash RBW** do minikolumny. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
 12. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i ponownie umieścić minikolumnę w probówce.
 13. Dodać 300 µl buforu płuczącego **Wash RBW** 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.*
 14. Minikolumnę umieścić w nowej probówce typu Eppendorf 1.5-2 ml. Dodać 30-60 µl **RNase-free water** centralnie na membranę.
 15. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
 16. Usunąć minikolumnę, zamknąć probówkę. RNA jest gotowe do dalszych analiz/manipulacji, może być przechowywane w 2-8°C lub zamrożone w -20C (należy unikać wielokrotnego zamrażania i rozmrażania RNA).

Dodatek 2: 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. Polecamy użycie DNazy I EURx nr kat. E1345.

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 CaCl₂ 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 jej worteksować, a po dodaniu DNazy I do roztworu należy mieszać jedynie przez delikatne pipetowanie. Używać tylko DNazy I wolnej od RNaz.

1. Po wykonaniu **Wash DN1** i odwirowaniu, wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i powtórnie umieścić minikolumnę w probówce.
2. Dodać 50 µl buforu **DNR** (z dodaną DNazą I) centralnie na membranę i pozostawić w temperaturze pokojowej na 10 – 20 min. Nie wirować.
3. Dodać 400 µl buforu **Wash RBW** do minikolumny. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
4. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i powtórnie umieścić minikolumnę w probówce.
5. Dodać 500 µl buforu płuczącego **Wash RBW** do minikolumny. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
6. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g w celu usunięcia resztek buforu płuczącego.
7. Minikolumnę umieścić w nowej probówce typu Eppendorf 1.5-2 ml. Dodać 30-100 µl **RNase-free water** centralnie na membranę.
8. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
9. 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 3: Oczyszczanie RNA po reakcjach enzymatycznych

UWAGA 1 • Protokół przeznaczony jest do doczyszczania całkowitego RNA (powyżej 100 nt) po reakcjach enzymatycznych (np. oczyszczanie RNA otrzymanego przy użyciu T7 Transcription Kit EURx E0901).

UWAGA 2 • Maksymalna objętość roztworu RNA to 100 μ l. Minimalna to 30 μ l. W przypadku mniejszej objętości niż 30 μ l dopełnić wodą wolną od RNaz do 30 μ l.

UWAGA 3 • Procedura eliminuje DNA z roztworu.

UWAGA 4 • Przed użyciem buforu RL do 1 ml dodać 10 μ l β -merkaptoetanolu (β -ME) lub 10 μ l DTT. Po dodaniu β -ME bufor RL jest stabilny przez 1 miesiąc. DTT nie jest stabilny w buforze RL (patrz Uwaga 4 strona 3).

1. Dodać 3 objętości buforu **RL** do 1 objętości roztworu RNA i wymieszać.
 - o Np. do 40 μ l roztworu RNA dodać 120 μ l buforu RL.
 - o Upewnić się czy do buforu RL został dodany β -ME lub DTT (uwaga 1 str 3).
2. Przenieść mieszaninę do **minikolumny homogenizacyjnej** umieszczonej w 2 ml próbówce odbierającej. Wirować przez 2 min z maksymalną prędkością.
3. Dodać 0.8 objętości 96% alkoholu etylowego do przesączu (flow-through). Wymieszać dokładnie przez pipetowanie. Nie wirować.
 - o Np. do 150 μ l przesączu dodać 120 μ l etanolu.
4. 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.
5. Dodać 400 μ l buforu płuczącego **Wash DN1** do minikolumny. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
6. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i powtórnie umieścić minikolumnę w próbówce.
7. Dodać 650 μ l buforu płuczącego **Wash RBW** do minikolumny. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
8. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i powtórnie umieścić minikolumnę w próbówce.
9. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g w celu usunięcia resztek buforu płuczącego.
10. Minikolumnę umieścić w nowej próbówce typu Eppendorf 1.5-2 ml. Dodać 30-100 μ l **RNase-free water** centralnie na membranę.

11. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
12. Usunąć minikolumnę, zamknąć probówkę. RNA jest gotowe do dalszych analiz/manipulacji. Powinno być przechowywane zamrożone w -20°C.

Dodatek 4: Protokół izolacji RNA z tkanek zwierzęcych z użyciem mieszaniny RNA Extracol

UWAGA 1 • Dodatek przeznaczony jest do izolacji całkowitego RNA (powyżej 200 nt) z użyciem mieszaniny fenol-sole chaotropowe z trudnych materiałów bogatych w kolagen, białka kurczliwe czy tkankę łączną (np. serce, mięśnie czy skóra) lub bogatych w tłuszcze (np. mózg, tłuste tkanki) bądź ubogich w RNA, a także w przypadku próbek krwi o objętości powyżej 0.75 ml.

UWAGA 2 • Zastosowanie mieszaniny RNA Extracol pozwala na znaczne zwiększenie ilości początkowej materiału, co w przypadku tkanek trudnych do obróbki bądź ubogich w RNA skutkuje zwiększeniem stężenia oczyszczonego RNA w eluacie.

UWAGA 3 • W trakcie czynności związanych z izolacją RNA, zamrożone tkanki nie powinny ulec rozmrożeniu.

UWAGA 4 • Poniższa procedura efektywnie eliminuje całość DNA lub w przypadku zbyt dużej ilości materiału użytego do izolacji i przetadowania minikolumny homogenizacyjnej większość DNA. W związku z tym w przypadku niektórych zastosowań RNA szczególnie wrażliwych na minimalne ilości DNA, proponujemy oczyszczanie zgodnie z Dodatkiem 2 wykorzystującym trawienie preparatu DNazą I (w trakcie izolacji na minikolumnie).

UWAGA 5 • Zestaw nie zawiera RNA Extracolu. RNA Extracol dostępny jest jako oddzielny produkt EURx nr kat. E3750.

Metoda opiera się na ekstrakcji wodnych roztworów kwasów nukleinowych za pomocą rozpuszczalników organicznych. Rozdzielenie kwasów nukleinowych między fazami jest zależne od pH. Przy pH 4-6 DNA znajduje się w fazie organicznej podczas, gdy RNA pozostaje w fazie wodnej. Fenol zwiększa efektywność oddzielania kwasów nukleinowych od związanych białek, denaturuje białka oraz inaktywuje RNazy. Próbkę poddawana jest homogenizacji i lizie w roztworze **RNA Extracol**. Po dodaniu chloroformu lub 1-bromo-3-chloropropanu następuje rozdział mieszaniny na fazy: górną wodną (zawierającą RNA), interfazę (zawierającą DNA) oraz dolną organiczną (zawierającą DNA oraz białka). RNA jest wytrącane z warstwy wodnej za pomocą izopropanolu.

1. Zhomogenizować fragment tkanki w roztworze **RNA Extracol**. Zachować proporcję: maksymalnie 100 mg tkanki na 1 ml roztworu.

2. Tkankę można zhomogenizować w buforze **RL** a następnie dodać zawiesinę do roztworu **RNA Extracol**. Stosując bufor **RL** objętość zawiesiny zhomogenizowanej tkanki dodanej do roztworu **RNA Extracol** nie powinna przekraczać 10% objętości użytego roztworu **RNA Extracol**.
 - o W celu uzyskania komórek jądrzastych (leukocytów) z próbek krwi o objętości powyżej 0,75 ml należy przeprowadzić lizę erytrocytów zgodnie z instrukcją str. 14 pkt 1-5 z użyciem buforu Lyse RBC. Uzyskany pelet zhomogenizować w roztworze RNA Extracol.
3. Tkanki bogate w tłuszcze lub w razie niekompletnej homogenizacji próbkę należy odwirować z prędkością 12 000 x g przez 10 min w 4°C. Usunąć górną warstwę tłuszczu (jeżeli powstała) i przenieść klarowny supernatant z nad osadu do czystej próbówki.
4. Pozostawić zhomogenizowaną próbkę na 5 min w temperaturze pokojowej.
5. Dodać 0.2 ml chloroformu na 1 ml roztworu **RNA Extracol** użytego do homogenizacji.
 - o Zamiast chloroformu można użyć 1-bromo-3-chloropropan. Należy wówczas dodać 0.1 ml 1-bromo-3-chloropropanu na 1 ml roztworu RNA Extracol użytego do homogenizacji.
6. Wyrząsać próbkę ręcznie lub przy użyciu wortexu przez 15 sekund.
7. Pozostawić próbkę w temperaturze pokojowej na 2-5 min.
8. Wirować próbkę przez 15 min w 4°C z prędkością 12 000 x g.
 - o Nastąpi rozdzielenie mieszaniny na fazy. Górna, wodna, bezbarwna frakcja zawiera RNA. Stanowi ona ok. 50% objętości próbki.
9. Ostrożnie zebrać górną warstwę i przenieść ją do **minikolumny homogenizacyjnej** umieszczonej w 2 ml próbówce odbierającej. Wirować przez 2 min z maksymalną prędkością.
 - o Należy uważać aby nie zanieczyścić próbki dolną warstwą organiczną.
 - o Wirowanie przez minikolumnę homogenizacyjną filtruje i homogenizuje lizat oraz eliminuje ślady DNA.
10. Zmierzyć objętość przesączu. Dodać 0.5 objętości 96-100% alkoholu etylowego do próbki. Wymieszać dokładnie przez pipetowanie. Nie wirować.
11. 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.
12. Dodać 400 µl buforu płuczącego **Wash DN1** do minikolumny. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
13. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i powtórnie umieścić minikolumnę w próbówce.
14. Dodać 600 µl buforu płuczącego **Wash RBW** 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 300 µl buforu płuczącego **Wash RBW** 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 próbówce i ponownie wirować przez 1 min.
17. Minikolumnę umieścić w nowej próbówce typu Eppendorf 1.5-2 ml. Dodać 30-100 µl **RNase-free water** centralnie na membranę.
18. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
19. 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).

Dodatek 5: Alternatywna metoda przygotowania materiału do izolacji RNA z drożdży z wykorzystaniem kulek szklanych BeadTubesDry

UWAGA 1 • Dodatek opracowano w celu zwiększenia wydajności izolacji całkowitego RNA (powyżej 200 nt) z komórek drożdży.

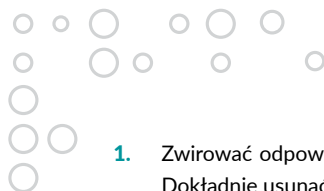
UWAGA 2 • Decydującym etapem izolacji RNA z drożdży jest homogenizacja tkanki w sposób efektywny oraz szybki, zapobiegający degradacji RNA. Ściana komórkowa drożdży zostaje efektywnie zniszczona w wyniku mechanicznego tarcia kulek szklanych o specjalnie dobranej średnicy. Zastosowana uniwersalna procedura pozwala uniknąć stosowania kosztownych enzymów lizujących specyficznych dla drożdży.

UWAGA 3 • Przed użyciem buforu RL do 1 ml dodać 10 µl β-merkaptioetanolu (β-ME) lub 10 µl DTT. Po dodaniu β-ME bufor RL jest stabilny przez 1 miesiąc. DTT nie jest stabilny w buforze RL (patrz Uwaga 4 strona 3).

UWAGA 4 • Zestaw GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit nr kat. E3598 nie zawiera próbek z kulkami szklanymi BeadTubeDry. Produkt BeadTubeDry dostępny jest jako oddzielny produkt EURx nr kat. E0358.

UWAGA 5 • Hodowlę należy zwirować w 4°C. Następne etapy należy wykonywać w temperaturze pokojowej. Protokół zaleca się do wykorzystania do izolacji RNA z komórek świeżych lub zabezpieczonych roztworem fixRNA (nr kat. E0280).

UWAGA 6 • Przed izolacją należy przygotować bufor PBS lub 0,9 % NaCl. Ewentualnie dokupić oddzielnie 1 x PBS nr kat. E0281.

- 
1. Zwirować odpowiednią ilość hodowli drożdży z prędkością 5 000 x g przez 5 min w 4°C. Dokładnie usunąć supernatant.
 - o Nie należy używać więcej niż 5×10^7 komórek drożdży.
 2. Zawiesić osad w 100 µl PBS lub 0.9 % NaCl i przenieść do probówki z kulkami szklanymi BeadTubeDry.
 - o Należy użyć świeżo zwirowanych hodowli.
 3. Probówki BeadTubeDry umieścić w worteksie. Użyć w tym celu specjalnego adaptera. Wortexować przez 5 min z maksymalną prędkością, nie dopuścić do podgrzania zawartości probówek, a następnie umieścić na lodzie.
 - o Do wytrząsania probówek BeadTubeDry można użyć wyspecjalizowanych przyrządów, nazywanych ang. "bead beater" lub "cell disrupter" (np. FastPrep, Precellys, Disruptor Genie), co pozwala na uzyskanie większej wydajności izolacji RNA. W celu uniknięcia podgrzania zawartości probówki i degradacji RNA zaleca się znaczne skrócenie czasu wytrząsania.
 4. Do probówki BeadTubeDry dodać 350 µl **RL** i dokładnie wymieszać przez wortexowanie.
 5. Wirować przez 1 min z maksymalną prędkością, a następnie całość supernatantu przenieść do **minikolumny homogenizacyjnej** umieszczonej w 2 ml probówce odbierającej. Wirować przez 2 min z maksymalną prędkością.
 - o Nie należy naruszać osadu powstałego po wirowaniu probówek BeadTubesDry.
 - o Wirowanie przez minikolumnę homogenizacyjną filtruje i homogenizuje lizat oraz eliminuje DNA
 6. Usunąć **minikolumnę homogenizacyjną** i przenieść przesącz nie naruszając osadu do nowej probówki.
 7. Przejdź do punktu 6 na str. 11 (część izolacji RNA z Drożdży).

Dodatek 6: Izolacja RNA z roślin bogatych w związki fenolowe.

UWAGA 1 • W szczególnych przypadkach pracy z roślinami o dużej zawartości związków fenolowych, a także tkanek zdrewniałych zaleca się zastąpienie buforu LG buforem Lyse Buffer PVP nr kat. E0291-01. Lyse Buffer PVP w składzie zawiera poliwinolopirolidon (PVP) aktywnie usuwający związki polifenolowe będące inhibitorami reakcji PCR.

UWAGA 2 • Modyfikacja protokołu polega na wymianie buforu LG na Lyse Buffer PVP oraz na 10 min inkubacji próbki na lodzie (krok 3).

UWAGA 3 • Przed użyciem buforu Lyse Buffer PVP do 1 ml dodać po 10 μ l β -merkaptoetanolu (β -ME) lub 10 μ l [1 M] DTT. Po dodaniu β -ME Lyse Buffer PVP jest stabilny przez 1 miesiąc. DTT nie jest stabilny w odczynniku Lyse Buffer PVP.

UWAGA 3 • Przed użyciem buforu RL do 1 ml dodać 10 μ l β -merkaptoetanolu (β -ME) lub 10 μ l DTT. Po dodaniu β -ME bufor RL jest stabilny przez 1 miesiąc. DTT nie jest stabilny w buforze RL (patrz Uwaga 4 strona 3).

- Wybrać metodę homogenizacji materiału roślinnego:
 - Zamrozić fragment tkanki roślinnej w ciekłym azocie, a następnie dokładnie rozdrobnić, używając do tego celu wcześniej schłodzonego moździerza i tłuczka. Umieścić rozdrobnioną tkankę (max. 100 mg) w schłodzonej, RNase-free 2 ml próbówce typu Eppendorf. Dodać 200 μ l buforu Lyse Buffer PVP oraz 100 μ l buforu **RL** do rozdrobnionej tkanki. Dokładnie wymieszać przez worteksowanie.
 - Rozdrobnić fragment tkanki (świeży lub zamrożony) mechanicznie za pomocą homogenizatora w mieszaniu 200 μ l buforu Lyse Buffer PVP oraz 100 μ l buforu **RL**.
 - Nie należy używać więcej niż 100 mg tkanek. Korzystając z homogenizatora mechanicznego należy użyć do 10 razy mniej materiału do izolacji niż w przypadku moździerza i tłuczka.
 - Fragment tkanki należy zhomogenizować/rozbić jak najdrobniej, gdyż jest to etap decydujący o wydajności izolacji. W celu podniesienia wydajności izolacji zalecamy użycie homogenizatora mechanicznego.
 - Zamrożone tkanki nie powinny ulec rozmrożeniu.
 - Upewnić się czy do buforu Lyse Buffer PVP i buforu RL został dodany β -ME lub DTT
- Wirować próbkę przez 4 min z maksymalną prędkością, a następnie przenieść supernatant do nowej RNase-free, próbówki 1.5-2 ml typu Eppendorf. Osad składający się z resztek roślinnych wyrzucić.
- Inkubować próbkę na lodzie 10 min.
- Kontynuować protokół od kroku 2 str. 7 tkanki roślinne.

Środki ostrożności

LG



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

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 RBW



Uwaga

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 RNA Purification Kit jest przeznaczony do szybkiej izolacji całkowitego komórkowego RNA, pochodzącego z różnorodnych źródeł m.in.: tkanek zwierząt i ludzi, roślin, grzybów, hodowli tkankowych, bakterii drożdży oraz krwi.**

Oczyszczone RNA nie zawiera zanieczyszczeń m.in. takich jak: DNA, białka, lipidy, barwniki, detergenty, organiczne inhibitory enzymów, związki buforowe, sole, kationy dwuwartościowe. W trakcie izolacji RNA próbka poddana zostaje lizie w obecności buforów denaturujących, które inaktywują RNazy komórkowe. Następnie lizat jest wirowany w minikolumnkach o specjalnej konstrukcji, które rozdrabniają komórkowe DNA, redukują lepkość lizatu i wstępnie oczyszczają preparat usuwając fragmenty DNA. Dodanie specjalnego buforu oraz 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 destylowaną, 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 precipitacji etanolem.

○ **GeneMATRIX to syntetyczne membrany nowej generacji wiążące DNA i RNA, wykorzystujące selektywne właściwości wiązania kwasów nukleinowych przez kompozytowy SiO₂. W celu osiągnięcia wysokiej wydajności i czystości otrzymanych kwasów nukleinowych, opracowano wyspecjalizowane bufor 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
orders: email: orders@eurx.com.pl
tel. +48 58 524 06 97, fax +48 58 341 74 23

