

RNA Extracol

Mieszanka fenolu i soli chaotropowych przeznaczona do izolacji całkowitego RNA z różnego rodzaju próbek.

● **kat. nr. E3700**

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
Izolacja RNA.....	5
Rozdrobnienie i homogenizacja próbeki	5
Rozdzielanie faz.....	6
Precypitacja RNA.....	7
Środki ostrożności.....	7

Składniki zestawu	E3700-01	E3700-02	Warunki przechowywania
RNA Extracol	25 ml	100 ml	15-25°C
Protokół	1	1	

Uwagi wstępne

UWAGA 1 • Przeznaczenie odczynnika. Roztwór RNA Extracol jest jednofazową mieszaniną fenolu, soli chaotropowych i dodatkowych komponentów pozwalającą na wydajną lizę i izolację całkowitego RNA (wielko i małowzrostkowego) z tkanek ludzkich, zwierzęcych i roślinnych lub z komórek bakteryjnych bądź drożdżowych.

UWAGA 2 • Maksymalna ilość użytego materiału. Należy używać maksymalnie 100 mg tkanki na 1 ml roztworu. W przypadku komórek zwierzęcych, roślinnych lub drożdżowych orientacyjna ilość to maksymalnie $5-10 \times 10^6$ komórek na 1 ml roztworu lub 1×10^7 komórek bakteryjnych. Objętość dodanej tkanki, osadu lub zawiesiny komórkowej nie powinna przekraczać 10% objętości użytego roztworu RNA Extracol. W przypadku ludzkich leukocytów wyjściowa ilość krwi to maksymalnie 1.5 ml na 1 ml roztworu RNA Extracol.

UWAGA 3 • Rozdrabnianie i liza próbek. W przypadku większości próbek (tkanki zwierzęce, roślinne) wymagana jest homogenizacja mechaniczna, którą należy przeprowadzić bezpośrednio w roztworze RNA Extracol lub w buforze RL (E0310). W przypadku stosowania buforu RL, objętość zawiesiny zhomogenizowanej tkanki, dodanej do roztworu RNA Extracol, nie powinna przekraczać 10% objętości użytego roztworu RNA Extracol. W przypadku próbek łatwo ulegających lizie (komórki bakteryjne, hodowle komórkowe) wystarczy zawiesić materiał w roztworze RNA Extracol.

UWAGA 4 • Przechowywanie próbek. Próbki zawieszane i zhomogenizowane w roztworze RNA Extracol można przechowywać do kilku miesięcy w temperaturze -80°C .

UWAGA 5 • Przechowywanie komponentów zestawu. Roztwór może być przechowywany zarówno w temperaturze pokojowej jak i w $2-8^{\circ}\text{C}$ (lodówka).

UWAGA 6 • Bezpieczeństwo. RNA Extracol zawiera fenol (toksyczny i żrący) oraz rodnik guanidyny (drażniący) i może być groźny dla zdrowia, jeżeli jest używany niepoprawnie. Należy używać odzieży ochronnej, rękawiczek, okularów ochronnych i pracować pod wyciągiem.

Wyposażenie i odczynniki dostarczane przez użytkownika

- Chloroform lub 1-bromo-3-chloropropan, izopropanol, alkohol etylowy [75% v/v], woda wolna od RNaz.
- Opcjonalnie bufor RL (E0310) do homogenizacji próbki.
- W przypadku krwi: roztwór do lizy erytrocytów Lyse RBC (E0326).
- Mikrowirówka z chłodzeniem do 4°C, rękawiczki, jałowe wolne od RNaz tipsy, jałowe wolne od RNaz probówki 1.5-2 ml, wortex, opcjonalnie sprzęt do homogenizacji tkanki.

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 Extractol**. 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.

Izolacja RNA

W przypadku izolacji RNA z próbek zabezpieczonych roztworem **fix RNA** (E0280), przed przystąpieniem do procedury, należy usunąć roztwór **fix RNA**. Tkanki zwierzęce lub roślinne należy przenieść (np. przy pomocy jałowej pincety) z roztworu i umieścić przed homogenizacją w roztworze **RNA Extracol** lub buforze **RL**. W przypadku bardzo rozdrobnionego materiału, komórek bakteryjnych, zwierzęcych lub leukocytów roztwór **fix RNA** powinien zostać usunięty przez wirowanie i zlanie z nad osadu komórkowego. Następnie osad należy zawiesić w roztworze **RNA Extracol** lub buforze **RL**. Dokładny opis postępowania z próbkami zabezpieczonymi za pomocą roztworu **fix RNA** (E0280) znajduje się w protokole dostępnym na stronie www.eurx.com.pl.

- *W razie problemów z odwirowaniem osadu związanych ze zwiększoną gęstością roztworu **fix RNA**, bezpośrednio przed wirowaniem i izolacją, próbkę należy rozcieńczyć wodą wolną od RNaz (E0210). W większości przypadków rozcieńczenie 2:1 (dwie objętości roztworu **fix RNA** i jedna objętość wody) jest wystarczające.*

Rozdrobnienie i homogenizacja próbki

1. Tkanki

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

Tkankę można zhomogenizować w buforze **RL** (E0310) 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**.

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.

2. Tkanki roślinne

Zhomogenizować fragment tkanki roślinnej w roztworze **RNA Extracol**.

Tkankę można zhomogenizować w buforze **RL** (E0310) 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**.

W przypadku niekompletnej homogenizacji należy odwirować próbkę z prędkością 12 000 x g przez 10 min w 4°C. Przenieść klarowny supernatant z nad osadu do czystej próbówki.

3. Hodowle komórkowe w zawiesinie

Osadzić komórki przez wirowanie i usunąć supernatant. Zawiesić osad w proporcji 1 ml roztworu **RNA Extracol** na $5-10 \times 10^6$ komórek. Dla uzyskania całkowitej lizy wymieszać dokładnie przez pipetownie.

4. Hodowle komórkowe w warstwie

Usunąć pożywkę. Dodać **RNA Extracol** w proporcji 1 ml roztworu na 10 cm² powierzchni, bezpośrednio na płytkę. Dla uzyskania całkowitej lizy wymieszać dokładnie przez pipetownie.

o *Nie stosować roztworu RNA Extracol na plastikowych płytkach.*

5. Krew (leukocyty)

W pierwszym etapie należy przeprowadzić lizę erytrocytów. W przypadku krwi ludzkiej używać wyjściowo maksymalnie 1.5 ml świeżej krwi na 1 ml roztworu **RNA Extracol**. Do świeżej krwi dodać 4 objętości buforu **Lyse RBC**. Wymieszać przez odwracanie próbki. Pozostawić w 4°C na 10 minut w celu lizy erytrocytów. W trakcie inkubacji wymieszać kilkakrotnie przez odwracanie. Wirować próbkę przez 10 min w 4°C z prędkością 400 x g. Wylać supernatant.

Osad zawiesić w roztworze **RNA Extracol**. Dla uzyskania całkowitej lizy wymieszać dokładnie przez pipetownie.

Rozdzielanie faz

1. Pozostawić zhomogenizowaną próbkę na 5 min w temperaturze pokojowej.
2. 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.*
3. Wyrzasać próbkę ręcznie lub przy użyciu wortexu przez 15 sek.
4. Pozostawić próbkę w temperaturze pokojowej na 2-5 min.
5. 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.*
6. Ostrożnie zebrać górną warstwę i przenieść do nowej próbki.

Precypitacja RNA

1. Dodać 0.5 ml izopropanolu do fazy wodnej na 1 ml roztworu **RNA Extracol** użytego do homogenizacji. Dokładnie wymieszać.
2. Pozostawić próbkę w temperaturze pokojowej na 10 min.
3. Wirować próbkę przez 10 min w 4°C z prędkością 12 000 x g.
4. Usunąć supernatant. Przepłukać osad dodając 75% etanol w proporcji: 1 ml 75% etanolu na 1 ml roztworu **RNA Extracol** użytego do homogenizacji. Wymieszać dokładnie przez worteksowanie.
5. Wirować próbkę przez 5 min w 4°C z prędkością 10 000 x g.
 - o *Opcjonalnie, w celu doczyszczenia RNA, powtórzyć płukanie osadu (punkt 4 i punkt 5).*
6. Usunąć supernatant. Wysuszyć osad i zawiesić w wodzie wolnej od RNaz.
 - o *W celu całkowitego usunięcia ewentualnych śladów fenolu i uniknięcia inhibicji reakcji enzymatycznych zalecamy doczyszczenie rozpuszczonego RNA przy użyciu kolumniek krzemionkowych. Można w tym celu użyć zestawu: Universal RNA (E3598), Universal RNA/miRNA (E3599). Zamiennie, w celu izolacji RNA, można użyć produktu RNA/DNA Extracol (E3750), który zawiera w protokole doczyszczenie DNA i RNA na minikolumnkach.*

Środki ostrożności

RNA Extracol

Niebezpieczeństwo



H301+H311+H331 Działa toksycznie po połknięciu, w kontakcie ze skórą lub w następstwie wdychania.

H314 Powoduje poważne oparzenia skóry oraz uszkodzenia oczu.

H341 Podejrzewa się, że powoduje wady genetyczne.



H373 Może powodować uszkodzenie narządów poprzez długotrwałe lub narażenie powtarzane.

H411 Działa toksycznie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki.

P273 Unikać uwolnienia do środowiska.

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

P301+P330+P331 W przypadku połknięcia: wypłukać usta. Nie wywoływać wymiotów.

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

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+P310 W przypadku połknięcia: natychmiast skontaktować się z ośrodkiem zatruc/lekarzem.

P391 Zebrać wyciek.

EUH032 W kontakcie z kwasami uwalnia bardzo toksyczne gazy.



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

