

DNA/RNA Extracol Kit

Zestaw, zawierający mieszaninę fenolu i soli chaotropowych oraz minikolumnienki, przeznaczony do izolacji całkowitego RNA, DNA oraz białek z różnego rodzaju próbek.

● **kat. nr. E3750**

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 DNA/RNA	5
Część I Rozdrobnienie i homogenizacja próbki	5
Część II Rozdzielanie faz	6
Część III Precypitacja DNA/RNA.....	6
Część IV Oczyszczanie DNA.....	7
Część V Oczyszczanie RNA	7
Część VI Precypitacja białek.....	8
Tkanki, hodowle komórkowe, krew (limfocyty).....	8
Tkanki roślinne	9
Środki ostrożności.....	10

Składniki zestawu	25 izolacji E3750-01	100 izolacji E3750-02	Warunki przechowywania
DNA/RNA Extracol *	30 ml	120 ml	2-25°C
Wash RBW	54 ml	216 ml	15-25°C
PLB	4.5 ml	18 ml	15-25°C
Bromophenol Blue 0.5%	0.1 ml	0.4 ml	15-25°C
RNase-free water	3.6 ml	15 ml	15-25°C
Elution	3.6 ml	15 ml	15-25°C
DNA Binding 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	

* Zawiera fenol oraz rodnik guanidyny. Należy używać odzieży ochronnej, rękawiczek, okularów ochronnych i pracować pod wyciągiem. Może być przechowywany zarówno w temperaturze pokojowej jak i w 2-8°C (lodówka).

Uwagi wstępne

UWAGA 1 • Przeznaczenie odczynnika. Roztwór DNA/RNA Extracol jest jednofazową mieszaniną fenolu, soli chaotropowych i dodatkowych komponentów pozwalającą na wydajną lizę i izolację całkowitego RNA (wielko i małowcząsteczkowego) oraz DNA 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 1.0 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 DNA/RNA Extracol. W przypadku ludzkich leukocytów wyjściowa ilość krwi to maksymalnie 1.5 ml na 1 ml roztworu DNA/RNA Extracol.

UWAGA 3 • Maksymalna pojemność minikolumny. Maksymalna pojemność minikolumny wiążącej DNA to 20 μg . Naniesienie większej ilości DNA może prowadzić do zanieczyszczenia RNA. Maksymalna pojemność minikolumny wiążącej RNA to 100 μg . Maksymalna objętość płynu nanoszonego na minikolumny to 700 μl . Przetładowanie minikolumn zmniejsza wydajność i obniża jakość wyizolowanego materiału.

UWAGA 4 • Rozdrabnianie i liza próbek. W przypadku większości próbek (tkanki zwierzęce, roślinne) wymagana jest homogenizacja mechaniczna, którą należy przeprowadzić bezpośrednio w roztworze DNA/RNA Extracol lub w buforze RL (E0310). W przypadku stosowania buforu RL, objętość zawiesiny zhomogenizowanej tkanki dodanej do roztworu DNA/RNA Extracol, nie powinna przekraczać 10% objętości użytego roztworu DNA/RNA Extracol. W przypadku próbek łatwo ulegających lizie (komórki bakteryjne, hodowle komórkowe) wystarczy zawiesić materiał w roztworze DNA/RNA Extracol.

UWAGA 5 • Przechowywanie próbek. Próbki zawieszane i zhomogenizowane w roztworze DNA/RNA Extracol można przechowywać do kilku miesięcy w temperaturze -80°C .

UWAGA 6 • Przechowywanie komponentów zestawu. Minikolumny wiążące DNA i RNA należy przechowywać w $2-8^{\circ}\text{C}$ (lodówka). Pozostałe komponenty mogą być przechowywane zarówno w temperaturze pokojowej jak i w $2-8^{\circ}\text{C}$ (lodówka).

UWAGA 7 • Bezpieczeństwo. DNA/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

- Mikrowirówka z chłodzeniem do 4°C, rękawiczki, jałowe wolne od RNaz tipsy, jałowe wolne od RNaz probówki 1.5-2 ml, worteks, opcjonalnie sprzęt do homogenizacji tkanki.
- Chloroform lub 1-bromo-3-chloropropan, izopropanol, alkohol etylowy [75% v/v], alkohol etylowy [96-100% v/v].
- W przypadku krwi: roztwór do lizy erytrocytów Lyse RBC (E0326).
- Izolacja białek z tkanek, hodowli komórkowych, krwi (limfocyty): β -merkптоetanol (14.3 M, β -ME) lub [1 M] Dithiothreitol (DTT), roztwór GE – 0.3 M chlorowodorek guanidyny w 95% alkoholu etylowym.
- Izolacja białek z tkanek roślinnych: β -merkптоetanol (14.3 M, β -ME) lub [1 M] Dithiothreitol (DTT).
- Opcjonalnie bufor RL (E0310) do homogenizacji próbki.

Metoda opiera się na ekstrakcji wodnych roztworów kwasów nukleinowych za pomocą rozpuszczalników organicznych. Rozdzielenie kwasów nukleinowych między fazami jest zależne od pH. Przy pH wyższym niż 6 DNA oraz RNA pozostaje w fazie wodnej. Fenol zwiększa efektywność oddzielania kwasów nukleinowych od związanych białek, denaturuje białka oraz inaktywuje RNazy i DNazy. Próbka poddawana jest homogenizacji i lizie w roztworze **DNA/RNA Extracol**. Po dodaniu chloroformu lub 1- bromo-3-chloropropanu następuje rozdział mieszaniny na fazy: górną wodną (zawierającą RNA i DNA), interfazę oraz dolną organiczną (zawierającą białka). RNA i DNA może być wytrącone z warstwy wodnej za pomocą izopropanolu lub rozdzielone z wykorzystaniem kolumniek krzemionkowych.

Izolacja DNA/RNA

Część I Rozdrobnienie i homogenizacja próbek

1. Tkanki

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

Tkankę można zhomogenizować w buforze **RL** (E0310) a następnie dodać zawiesinę do roztworu **DNA/RNA Extracol**. Stosując bufor **RL** objętość zawiesiny zhomogenizowanej tkanki dodanej do roztworu **DNA/RNA Extracol** nie powinna przekraczać 10% objętości użytego roztworu **DNA/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 **DNA/RNA Extracol**.

Tkankę można zhomogenizować w buforze **RL** (E0310) a następnie dodać zawiesinę do roztworu **DNA/RNA Extracol**. Stosując bufor **RL**, objętość zawiesiny zhomogenizowanej tkanki, dodanej do roztworu **DNA/RNA Extracol**, nie powinna przekraczać 10% objętości użytego roztworu **DNA/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 **DNA/RNA Extracol** na 5-10 x 10⁶ komórek. Dla uzyskania całkowitej lizy wymieszać dokładnie przez pipetownie.

4. Hodowle komórkowe w warstwie

Usunąć pożywkę. Dodać **DNA/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 DNA/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 **DNA/RNA Extracol**. Do świeżej krwi dodać 4 objętości buforu **Lyse RBC** (E0326). Wymieszać przez odwracanie próbówki. Pozostawić w 4°C na 10 min 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 **DNA/RNA Extracol**. Dla uzyskania całkowitej lizy wymieszać dokładnie przez pipetownie.

Część II Rozdzielanie faz

1. Pozostawić zhomogenizowaną próbkę na 5 min w temperaturze pokojowej.
2. Dodać 0.2 ml chloroformu na 1 ml roztworu **DNA/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 DNA/RNA Extracol użytego do homogenizacji.*
3. Wytrząsać próbkę ręcznie lub przy użyciu worteksu 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 rozdzielanie mieszaniny na fazy. Górna, wodna, bezbarwna frakcja zawiera RNA oraz DNA. Stanowi ona ok. 50% objętości próbki.*
6. Ostrożnie zebrać górną, bezbarwną warstwę i przenieść do nowej próbki. W celu jednoczesnego uzyskania DNA i RNA przejść do części Precypitacja DNA/RNA. Aby uzyskać oddzielnie DNA lub RNA przejść do części Oczyszczanie DNA. Korzystając z minikolumnienek zachować proporcję: faza wodna z 1 ml roztworu DNA/RNA Extracol użytego do homogenizacji na 1 minikolumnienkę.

Opcjonalnie zachować pozostałość (interfaza oraz warstwa dolna, fenolowa) do izolacji białek. W celu oczyszczania białek przejść do części Precypitacja białek.

Część III Precypitacja DNA/RNA

1. Dodać 0.5 ml izopropanolu do fazy wodnej na 1 ml roztworu **DNA/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 **DNA/RNA Extracol** użytego do homogenizacji. Wymieszać dokładnie przez worteksowanie.
5. Wirować próbkę przez 5 min w 4°C z prędkością 10 000 x g.
6. Usunąć supernatant. Wyszuszyć osad i zawiesić w wodzie wolnej od RNaz.
 - o *Próbka zawiera DNA oraz RNA.*

Część IV Oczyszczanie DNA

1. Fazę wodną otrzymaną w punkcie 6 protokołu w części Rozdzielanie faz przenieść do **minikolumny wiążącej DNA** umieszczonej w 2 ml próbówce odbierającej. Wirować przez 1 min z prędkością 12 000 x g. Przesącz zachować do oczyszczenia RNA.
 - o *W celu otrzymania RNA zachować przesącz i przejść do części Oczyszczanie RNA.*
2. Dodać 650 µl buforu płuczącego **Wash RBW** do minikolumny. Wirować przez 1 min z prędkością 12 000 x g.
3. Wyjąć minikolumnę, wyłączyć przesącz i powtórnie umieścić minikolumnę w próbówce.
4. Dodać 350 µl buforu płuczącego **Wash RBW** do minikolumny. Wirować przez 2 min z prędkością 12 000 x g.
5. Minikolumnę umieścić w nowej próbówce typu Eppendorf 1.5-2 ml. Dodać 60-100 µl buforu **Elution** ogrzanego do 80°C. Pozostawić na 2 min w temperaturze pokojowej.
6. Wirować minikolumnę przez 2 min z prędkością 12 000 x g. Usunąć minikolumnę, zamknąć próbkę. DNA jest gotowe do dalszych analiz/manipulacji, może być przechowywane w 2-8°C lub zamrożone w -20°C (należy unikać wielokrotnego zamrażania i rozmrażania DNA).

Część V Oczyszczanie RNA

1. Do przesączu z punktu 1 protokołu z części Oczyszczanie DNA dodać taką samą objętość alkoholu etylowego (96-100%). Wymieszać dokładnie przez pipetowanie. Nie wirować.
 - o *Przykładowo: jeżeli otrzymano 400 µl przesączu należy dodać 400 µl etanolu.*
2. Przenieść maksymalnie 700 µl mieszaniny (razem z osadem jeżeli powstał) do **minikolumny wiążącej RNA** umieszczonej w próbówce odbierającej. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g. Wylać przesącz.
3. Przenieść pozostałość mieszaniny do tej samej **minikolumny wiążącej RNA**. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g. Wylać przesącz.
4. Dodać 650 µl buforu płuczącego **Wash RBW** do minikolumny. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
5. Wyjąć minikolumnę, wyłączyć przesącz i powtórnie umieścić minikolumnę w próbówce.
6. Dodać 350 µl buforu płuczącego **Wash RBW** do minikolumny. Wirować przez 2 min z prędkością 11 000 x g.
7. Minikolumnę umieścić w nowej próbówce typu Eppendorf 1.5-2 ml. Dodać 60-100 µl wody RNase-free. Pozostawić na 2 min w temperaturze pokojowej.



8. Wirować minikolumnę przez 2 min z prędkością 11 000 x g. Usunąć minikolumnę, zamknąć probówkę. RNA jest gotowe do dalszych analiz/manipulacji. Powinno być przechowywane zamrożone w -20°C.

Część VI Precypitacja białek

Tkanki zwierzęce, hodowle komórkowe, krew (limfocyty)

1. Do warstwy fenolowej, z punktu 6 części II protokołu, dodać 1.5 objętości izopropanolu. Wymieszać dokładnie. Pozostawić w temperaturze pokojowej przez 10 - 30 min.
2. Wirować próbkę przez 10 min z prędkością 12 000 x g w 4°C.
3. Usunąć supernatant. Przepłukać osad dodając roztwór GE w proporcji: 2 ml GE na 1 ml roztworu **DNA/RNA Extractol** użytego do homogenizacji. Wymieszać dokładnie przez wortekowanie. Pozostawić w temperaturze pokojowej przez 10-20 min.
 - o Przygotować roztwór GE: 0.3 M chlorowodorek guanidyny w 95% alkoholu etylowym.
4. Wirować próbkę przez 5 min z prędkością 7 500 x g w 4°C.
5. Usunąć supernatant i powtórzyć płukanie osadu roztworem GE (punkt 3 i punkt 4).
6. Przepłukać osad dodając 2 ml alkoholu etylowego (96-100%). Wymieszać dokładnie przez wortekowanie.
7. Wirować próbkę przez 5 min z prędkością 7 500 x g w 4°C. Usunąć supernatant.
8. Wysuszyć osad białkowy w temperaturze pokojowej przez 5-15 min.
9. Zawiesić osad w 80-150 µl buforu **PLB**.
 - o Bufor PLB jest buforem używanym w analizie SDS-PAGE białek (bufor Laemmli). Jeżeli białka nie będą analizowane przy użyciu SDS-PAGE, zawiesić osad w odpowiednim buforze zgodnym z wybraną metodą analizy. W wyniku stosowanej procedury sprecypitowane białka są silnie zdenaturowane i wykazują obniżoną rozpuszczalność w wodzie. Ponowne rozpuszczenie osadu jest możliwe w buforze PLB lub innym roztworze zawierającym wysokie stężenie detergentu (np. 1.5-5% SDS). W związku z tym do ilościowego oznaczania białek polecamy metodę Micro-BCA (Bicinchoninic Acid Assay).
 - o W przypadku SDS-PAGE przed użyciem buforu PLB do 1 ml dodać 25 µl β-merkaptoetanolu (β-ME) lub [1 M] DTT oraz 10 µl Bromophenol Blue. Po dodaniu β-ME bufor PLB przechowywać w 2-8°C.
 - o W wypadku krystalizacji komponentów buforu PLB roztwór należy podgrzać do całkowitego wyklarowania.
10. Ogrzewać w 60°C przez 5-10 min w celu rozpuszczenia i denaturacji próbki.

11. Jeżeli są widoczne nierozpuszczalne pozostałości, wirować próbkę przez 1 min z maksymalną prędkością. Supernatant jest gotowy do użytku w zastosowaniach typu analizy SDS-PAGE.

- o *Próbka może być przechowywana przez krótki okres czasu w 2-8°C lub w -20°C przez kilka miesięcy.*

Tkanki roślinne

1. Do warstwy fenolowej, z pkt 6 części II protokołu, dodać 2 objętości etanolu (96-100%). Wymieszać dokładnie. Pozostawić przez 30 min w temperaturze 2-8°C.
2. Wirować próbkę przez 10 min z prędkością 12 000 x g w 4°C.
3. Usunąć supernatant. Przeplukać osad dodając 75% etanol w proporcji: 2 ml 75% etanolu na 1 ml roztworu **DNA/RNA Extractol** użytego do homogenizacji. Wymieszać dokładnie przez worteksowanie.
4. Wirować próbkę przez 5 min z prędkością 7 500 x g w 4°C.
5. Usunąć supernatant i powtórzyć płukanie osadu (punkt 3 i punkt 4).
6. Usunąć supernatant. Wysuszyć osad białkowy w temperaturze pokojowej przez 5-15 min.
7. Zawiesić osad w 80-150 µl buforu **PLB**.

- o *Bufor PLB jest buforem używanym w analizie SDS-PAGE białek (bufor Laemmli). Jeżeli białka nie będą analizowane przy użyciu SDS-PAGE, zawiesić osad w odpowiednim buforze zgodnym z wybraną metodą analizy. W wyniku stosowanej procedury sprecypitowane białka są silnie zdenaturowane i wykazują obniżoną rozpuszczalność w wodzie. Ponowne rozpuszczenie osadu jest możliwe w buforze PLB lub innym roztworze zawierającym wysokie stężenie detergentu (np. 1.5-5% SDS). W związku z tym do ilościowego oznaczania białek polecamy metodę Micro-BCA (Bicinchoninic Acid Assay).*

- o *W przypadku SDS-PAGE przed użyciem buforu PLB do 1 ml dodać 25 µl β-merkaptioetanolu (β-ME) lub [1 M] DTT oraz 10 µl Bromophenol Blue. Po dodaniu β-ME bufor PLB przechowywać w 2-8°C.*

- o *W wypadku krystalizacji komponentów buforu PLB roztwór należy podgrzać do całkowitego wyklarowania.*

8. Ogrzewać w 60°C przez 5-10 min w celu rozpuszczenia i denaturacji próbki.
 9. Jeżeli są widoczne nierozpuszczalne pozostałości, wirować próbkę przez 1 min z maksymalną prędkością. Supernatant jest gotowy do użytku w zastosowaniach typu analizy SDS-PAGE.
- o *Próbka może być przechowywana przez krótki okres czasu w 2-8°C lub w -20°C przez kilka miesięcy.*

Środki ostrożności

DNA/RNA Extracool



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.

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.

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

