

Instrukcja

Total RNA Zol-Out™ D

Zestaw do szybkiej izolacji ultraczystego, całkowitego RNA z odczynników typu TRIzol®, TRI Reagent®, RNAzol®, QIAzol®, TriPure™, TriSure™, etc. Z procedurą usuwania DNA podczas izolacji.

numer katalogowy	wielkość
043-25	25 izolacji
043-100	100 izolacji

Produkt przeznaczony wyłącznie do badań naukowych.

Gwarancja

Firma A&A Biotechnology udziela gwarancji na niniejszy produkt.

Firma nie gwarantuje poprawnego działania produktu w przypadku:

- odstępstwa od dostarczonego wraz z produktem protokołu
- braku zalecanego w niniejszym protokole wyposażenia i materiałów
- użycia innych odczynników niż zalecane lub które nie wchodzą w skład produktu
- użycia przeterminowanych odczynników oraz elementów produktu

Spis treści

Skład	2
Dodatkowy sprzęt i odczynniki	3
Niezbędne	3
Ważne informacje	3
Przygotowanie materiału	4
Przygotowanie mieszaniny trawiącej DNA	4
Protokół izolacji RNA	5
Informacje bezpieczeństwa	7

Skład

składnik	25 izolacji		100 izolacji		przechowywanie
	ilość	nr kat.	ilość	nr kat.	
mikrokolumny	25 szt.	K-C02-25	100 szt.	K-C02-100	15–25 °C
probówki 1,5 ml	25 szt.	K-C01-25P	100 szt.	K-C01-100	15–25 °C
probówki 2 ml	25 szt.	K-PC-25	100 szt.	K-PC-100	15–25 °C
A2WE roztwór płuczący	45 ml	K-A2WE-45	180 ml	K-A2WE-180	15–25 °C
R8I roztwór płuczący	20 ml	K-R8I-20	80 ml	K-R8I-80	15–25 °C
DNAza	220 µl	K-DNA-220B	650 µl	K-DNA-650B	-20 °C
10x bufor do DNAzy	1,5 ml	K-BDNA-15A	1,5 ml	K-BDNA-15A	-20 °C
woda ultraczysta	8 ml	K-WUP-8	30 ml	K-WUP-30	-20–25 °C

Pojemność mikrokolumny do oczyszczania RNA wynosi 10 µg.

Dodatkowy sprzęt i odczynniki

Niezbędne

- 96-99% etanol
- jałowe probówki zamykane 1,5 ml
- mikrowirówka
- inkubator 50 °C

Ważne informacje

W przypadku pracy z RNA używać plastikowych materiałów zużywalnych wolnych od RNAz. Pracować sterylnie, używać jednorazowych rękawiczek i zmieniać je każdorazowo, kiedy wymaga tego dobra praktyka laboratoryjna.

Przygotowanie materiału

1. Do **1 objętości** próbki zawieszonyj w odczynniku typu TRIzol dodać **1/3 objętości wody ultraczystej** (np. do 300 µl komórek zawieszonych w TRIzolu dodać po 100 µl wody ultraczystej).
2. Zamknąć probówkę. Wymieszać przez kilkakrotne odwracanie probówki.
3. Wirować przez **10 min** przy **10 000 RPM**.
4. Przenieść supernatant do **nowej** probówki 1,5 ml (nie ma w zestawie).
5. Do **1 objętości supernatantu** dodać **1 objętość 96%-99% etanolu** (nie ma w zestawie) (np. do 350 µl supernatantu dodać po 350 µl etanolu).
6. Zamknąć probówkę. Wymieszać przez kilkakrotne odwracanie probówki.
7. Przejsz do punktu [1. protokołu izolacji](#).

Przygotowanie mieszaniny trawiącej DNA

Przed przystąpieniem do izolacji RNA należy przygotować odpowiednią ilość mieszaniny trawiącej DNA według poniższego przepisu po 50 µl mieszaniny na próbkę:

odczynnik	objętość na 1 próbkę	objętość na 25 próbek	objętość na 100 próbek	n - ilość próbek
10x bufor do DNAzy	5 µl	26 x 5 µl	101 x 5 µl	(n+1) x 5 µl
	+	+	+	+
DNAza	6 µl	26 x 6 µl	101 x 6 µl	(n+1) x 6 µl
	+	+	+	+
woda ultraczysta	39 µl	26 x 39 µl	101 x 39 µl	(n+1) x 39 µl
	=	=	=	
mieszanina trawiąca DNA	50 µl	1,3 ml	5,05 ml	

Wymieszaj i opisz "mieszanina trawiąca DNA".

Protokół izolacji RNA

Jeżeli objętość próbki jest większa niż **700 µl** należy powtórzyć punkty 1. i 2. protokołu izolacji wylewając przesącz po wirowaniu.

1. **Maksymalnie 700 µl** przygotowanej próbki nanieść na mikrokolumnę.
2. Wirować przez **1 min** przy **10 000 RPM**.
3. Dodać po **700 µl** roztworu płuczącego **A2WE**.
4. Wirować przez **2 min** przy **10 000 RPM**.

Uwaga. Należy wirować min. 2 min celem usunięcia etanolu ze złoża.

Trawienie DNAzą na kolumnie

5. Przenieść mikrokolumnę do **nowej** probówki 2 ml (w zestawie).
6. Otworzyć mikrokolumnę i nanieść po **50 µl mieszaniny trawiącej DNA** bezpośrednio na membranę mikrokolumny po czym delikatnie zamknąć mikrokolumnę.

Uwaga: Cała próbka musi zostać naniesiona na membranę. Należy uważać, aby próbka nie pozostała na ściankach mikrokolumny lub pierścieniu przytrzymującym membranę. Przy zamykaniu mikrokolumny należy uważać, aby nie przecisnąć mieszaniny trawiącej przez złoże w wyniku wytworzenia nadciśnienia nad złożem.
7. Inkubować przez **30 min** w temp. **37 °C**.
8. Dodać **700 µl** roztworu płuczącego **R8I** na mikrokolumnę.
9. Wirować przez **1 min** przy **10 000 RPM**.
10. Wyjąć mikrokolumnę. Przesącz wymieszać przez pipetowanie, pobrać (**ok. 750 µl**) i nanieść ponownie na mikrokolumnę. Mikrokolumnę należy umieścić **w tej samej** probówce 2 ml.
11. Wirować przez **1 min** przy **10 000 RPM**.

12. Wyjąć mikrokolumnę z próbówki, wylać przesącz i ponownie umieścić w niej mikrokolumnę.
13. Dodać **700 µl** roztworu płuczącego **A2WE**.
14. Wirować przez **1 min** przy **10 000 RPM**.
15. Wyjąć mikrokolumnę z próbówki, wylać przesącz i ponownie umieścić w niej mikrokolumnę.
16. Dodać **200 µl** roztworu płuczącego **A2WE**.
17. Wirować przez **2 min** przy **10 000 RPM**.
Uwaga. Należy wirować min. 2 min celem usunięcia etanolu ze złoża.
18. Przenieść mikrokolumnę do **nowej** próbówki 1,5 ml (w zestawie).
19. Dodać po **40 µl wody ultraczystej**.
20. Pozostawić na **3 min** w **temp. pokojowej**.
21. Wirować przez **1 min** przy **10 000 RPM**.
22. Mikrokolumnę usunąć, zamknąć próbówkę z wyizolowanym RNA i przechowywać w temp. -20, -80 °C do czasu dalszych analiz.

Informacje bezpieczeństwa



NIEBEZPIECZEŃSTWO

A2WE roztwór płuczący

H225 Wysoce łatwopalna ciecz i pary.

H319 Działa drażniąco na oczy.

P210 Przechowywać z dala od źródeł ciepła, gorących powierzchni, iskrzenia, otwartego ognia i innych źródeł zapłonu. Palenia wzbronione.

P233 Przechowywać pojemnik szczelnie zamknięty.

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.



NIEBEZPIECZEŃSTWO

R8I roztwór płuczący

H225 Wysoce łatwopalna ciecz i pary.

H319 Działa drażniąco na oczy.

H336 Może wywoływać uczucie senności lub zawroty głowy.

P210 Przechowywać z dala od źródeł ciepła, gorących powierzchni, iskrzenia, otwartego ognia i innych źródeł zapłonu. Palenia wzbronione.

P261 Unikać wdychania par.

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.



A&A BIOTECHNOLOGY
innovating life science

A&A Biotechnology, ul. Strzelca 40, 80-299 Gdańsk
tel. 883 323 761, 600 776 268
info@aabiotech.com, www.aabiotech.com

wersja 2023-2

