



A&A BIOTECHNOLOGY
innovating life science

Instrukcja

Total RNA Mini Plus D

Zestaw do izolacji całkowitego RNA z usuwaniem DNA na kolumnie.

numer katalogowy	wielkość
042-25	25 izolacji
042-100	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

Specyfikacja	3
Skład	3
Dodatkowy sprzęt i odczynniki	4
Niezbędne	4
Opcjonalne	4
Ważne informacje	4
Przygotowanie materiału	5
Bakterie, drożdże	5
Hodowle komórkowe	5
Tkanki roślinne, tkanki zwierzęce	5
Krew świeża (nie mrożona)	6
Przygotowanie mieszaniny trawiącej DNA	6
Protokół izolacji RNA	7
Informacje bezpieczeństwa	10

Specyfikacja

format	mikrokolumna
pojemność złoża	10 µg RNA
wielkość próbek	<ul style="list-style-type: none"> • hodowla bakteryjna: do 500 µl • hodowla drożdżowa: do 500 µl • krew: do 1 ml • hodowla komórkowa: do 5 x 10⁵ • tkanka roślinna, zwierzęca: do 10 mg
objętość elucji	od 15 µl
roztwór elucyjny	woda ultraczysta

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-C01-100P	15-25 °C
probówki 2 ml	50 szt.	K-PC-50	200 szt.	K-PC-200	15-25 °C
DNAza 10 U/µl	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
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
Fenzol Plus	15 ml	K-FENP-15	50 ml	K-FENP-50	2-8 °C
Izopropanol	15 ml	K-IZO-15	50 ml	K-IZO-50	15-25 °C
woda ultraczysta	8 ml	K-WUP-8	30 ml	K-WUP-30	-20-25 °C

Dodatkowy sprzęt i odczynniki

Niezbędne

- jałowe probówki zamykane 1,5 ml
- mikrowirówka
- inkubator 50 °C

Opcjonalne

- RBCL ([nr.kat. 213-100, 213-250](#))

Ważne informacje

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

Przygotowanie materiału

Bakterie, drożdże

1. Odwirować **100-500 µl** świeżej nocnej hodowli bakteryjnej lub drożdżowej.
Usunąć supernatant.
2. Przejść do punktu [1. protokołu izolacji](#).

Hodowle komórkowe

1. Odwirować komórki w ilości 1×10^5 - 5×10^5 .
Usunąć supernatant.
2. Przejść do punktu [1. protokołu izolacji](#).

Tkanki roślinne, tkanki zwierzęce

1. Tkanki (**1-10 mg**) należy rozetrzeć w moździerzu z ciekłym azotem.
2. Przenieść sproszkowane tkanki do probówki zamykanej 1,5 ml (nie ma w zestawie).
3. Przejść do punktu [1. protokołu izolacji](#).

Krew świeża (nie mrożona)

Dodatkowe odczynniki, których będziesz potrzebować:

- **RBCL** (maksymalnie 5 ml na próbkę), [nr kat. 213-100](#)

1. Do **maksymalnie 1 ml** krwi dodać odpowiednią ilość buforu **RBCL** do lizy erytrocytów.

Uwaga. Zalecamy użycie 5 objętości RBCL na 1 objętość krwi.

2. Całość wymieszać i pozostawić **w lodzie na 15 min.**

Informacja. Po inkubacji roztwór z mętnego powinien zmienić się na szkarłatnie przezroczysty.

3. Wirować przez **10 min** przy **3000 x g**.

Usunąć supernatant.

4. Przejdź 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

1. Do przygotowanej próbki dodać po **400 µl Fenozolu Plus** i mieszać przez pipetowanie, aż do całkowitej lizy komórek.

Uwaga. Fenozol Plus inaktywuje endogenne RNAzy. Próby zawieszane w Fenozolu Plus mogą być przechowywane:

- do roku w temp. -20 °C, -80 °C
- do tygodnia w temp. +2 °C do +8 °C
- do 24 godzin w temp. pokojowej

Roztwór Fenozolu Plus zawiera fenol. Należy unikać jego kontaktu ze skórą i pracować w rękawiczkach ochronnych.

2. Inkubować próbkę przez **5 min** w temp. **50 °C**.

3. Do lizatu dodać **150 µl wody ultraczystej**.
Próbkę intensywnie wortexować przez **15 s**.

4. Próbkę pozostawić na **5 min** w temp. **pokojoyej**.
Następnie wirować przez **10 min** przy **10 000 RPM**.

Informacja. Podczas wirowania, DNA oraz białka osadzają się na dnie próbówki. RNA pozostaje rozpuszczone w supernatancie.

5. Pobrać po **400 µl supernatantu** do **nowej** próbówki 1,5 ml (nie ma w zestawie).
Dodać po **400 µl izopropanolu**.

6. Dokładnie wymieszać i nanieść na mikrokolumnę. Zamknąć mikrokolumnę wieczkiem od próbówki.

7. Wirować przez **1 min** przy **12 000 RPM**.

8. Przenieść mikrokolumnę do **nowej** próbówki 2 ml (w zestawie).
Dodać po **700 µl** roztworu płuczącego **A2WE**. Zamknąć mikrokolumnę wieczkiem od próbówki.

9. Wirować przez **2 min** przy **12 000 RPM**.

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

Trawienie DNAzą na kolumnie

10.	Przenieść mikrokolumnę do nowej probówki 2 ml (w zestawie).
11.	<p>Otworzyć mikrokolumnę i nanieść po 50 µl mieszaniny trawiącej DNA bezpośrednio na membranę mikrokolumny po czym delikatnie zamknąć mikrokolumnę.</p> <p>Uwaga: Cała mieszanina musi zostać naniesiona na membranę. Należy uważać, aby 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.</p>
12.	Inkubować przez 30 min w temp. 37 °C .
13.	Dodać 700 µl roztworu płuczącego R8I na mikrokolumnę.
14.	Wirować przez 1 min przy 12 000 RPM .
15.	Wyjąć mikrokolumnę. Przesącz wymieszać przez pipetowanie, pobrać (ok. 750 µl) i nanieść ponownie na mikrokolumnę. Mikrokolumnę należy umieścić w tej samej probówce 2 ml.
16.	Wirować przez 1 min przy 12 000 RPM .
17.	Dodać po 700 µl roztworu płuczącego A2WE . Zamknąć mikrokolumnę wieczkiem od probówki.
18.	Wirować przez 1 min przy 12 000 RPM .
19.	Wylać przesącz i umieścić mikrokolumnę w tej samej probówce 2 ml. Dodać po 200 µl roztworu płuczącego A2WE . Zamknąć mikrokolumnę wieczkiem od probówki.
20.	<p>Wirować przez 2 min przy 12 000 RPM.</p> <p>Uwaga. Należy wirować min. 2 min celem usunięcia etanolu ze złoża.</p>
21.	<p>Przenieść mikrokolumnę do nowej probówki 1,5 ml (w zestawie).</p> <p>Na złoże nanieść po 15-40 µl wody ultraczystej.</p> <p>Zamknąć mikrokolumnę wieczkiem od probówki.</p>
22.	<p>Próbkę pozostawić na 3 min w temp. pokojoyej.</p> <p>Wirować przez 1 min przy 12 000 RPM.</p>

23. Mikrokolumnę usunąć, a oczyszczone RNA znajdujące się w probówce przechowywać w temp. -20 °C, -80 °C, do czasu dalszych analiz.

Informacja. Probówka elucyjna połączona jest długim, elastycznym łącznikiem z wieczkiem. Zamykając probówkę, po usunięciu kolumny, należy zwrócić uwagę by zamykanie wieczka rozpocząć od strony łącznika. Kliknięcie świadczy o prawidłowym zamknięciu probówki. Inny sposób zamykania może spowodować samoczynne otwieranie probówki.

Informacje bezpieczeństwa



NIEBEZPIECZEŃSTWO

Fenozol Plus

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 wielokrotne narażenie.
 H411 Działa toksycznie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki.
 P261 Unikać wdychania pyłu.
 P273 Unikać uwolnienia do środowiska.
 P280 Stosować rękawice ochronne/ odzież ochronną/ ochronę oczu/ ochronę twarzy.
 P301+P310 W przypadku połknięcia: natychmiast skontaktować się z Ośrodkiem Zatruc lub lekarzem.
 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 lub lekarzem.



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.



NIEBEZPIECZEŃSTWO

Izopropanol

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

version 2023-1

