

Zestaw do izolacji RNA z bakterii i drożdży



I. PRZEZNACZENIE ZESTAWU

The **EXTRACTME RNA BACTERIA & YEAST KIT** przeznaczony jest do szybkiej i wydajnej izolacji RNA o wysokiej czystości z hodowli drożdżowych lub kultur bakteryjnych oraz mrożonych osadów. Protokół izolacji i składy buforów zostały zoptymalizowane w celu osiągnięcia wysokiej wydajności i czystości izolowanego RNA. Produkt przeznaczony jest wyłącznie do zastosowań badawczo-rozwojowych.

II. SKŁAD I PRZECHOWYWANIE ZESTAWU

LICZBA IZOLACJI	10 IZOLACJI	50 IZOLACJI	250 IZOLACJI	¹ Warunki przechowywania
Nr katalogowy	EM25-010	EM25-050	EM25-250	
RYS Buffer* (RNA Yeast Spheroplast Buffer)	6.6 ml	33 ml	165 ml	TP
▲ RYLM Buffer (RNA Yeast Lysis Mix)	20 µl	100 µl	500 µl	-20°C
▲ RNA Extraction Enhancer	60 µl	300 µl	1.5 ml	-20°C
RYBL Buffer* (RNA Yeast & Bacteria Lysis Buffer)	6.6 ml	33 ml	165 ml	TP / chronić przed światłem
DNase I*** (lyophilized)	1 szt.	2 szt.	10 szt.	TP ²
Nuclease-free water	255 µl	510 µl	2.55 ml	TP
10x DNase I Reaction Buffer	0.9 ml	4.5 ml	22.5 ml	TP
RYBW1 Buffer (conc.)** (RNA Wash Buffer 1)	3.6 ml	18 ml	90 ml	TP / chronić przed światłem
RYBW2 Buffer (RNA Wash Buffer 2)	16.5 ml	83 ml	413 ml	TP
REB (RNA Elution Buffer)	2 ml	10 ml	5x 10 ml	TP
RNA Homogenizing Columns H	10 szt.	50 szt.	5x 50 szt.	TP
RNA Purification Columns B	10 szt.	50 szt.	5x 50 szt.	TP
Collection Tubes (2 ml)	10 szt.	50 szt.	5x 50 szt.	TP

¹ TP – temperatura pokojowa (+15°C do +25°C)

² Po zawieszeniu, **DNase I** należy przechowywać w temperaturze **-20°C**, zachowuje całkowitą aktywność przez 6 miesięcy.

* Przed pierwszym użyciem, do **RYS** i **RYBL Buffers** należy dodać **100% β-merkaptotoetanolu do końcowego stężenia 1%**. Trwałość RYS i RYBL Buffers po dodaniu β-merkaptotoetanolu wynosi 4 tygodnie w temp. 2–8°C. Stąd też, w przypadku izolacji RNA prowadzonej partiami, należy przenieść odpowiednią do izolacji ilość RYS i RYBL Buffers do osobnej butelki (wolnej od RNaz) i dodać β-merkaptotoetanol. Po dodaniu β-merkaptotoetanolu zalecane jest oznaczenie butelki.

** Przed pierwszym użyciem do **RYBW1 Buffer** należy dodać odpowiednią ilość **96–100% etanolu** (informacja na etykietach oraz w poniższej tabeli). Po dodaniu etanolu zalecane jest oznaczenie butelki.

*** **DNaza I** jest transportowana w postaci zliofilizowanej. Każda fiolka zawiera wystarczającą ilość enzymu na 25 izolacji. Przed pierwszym użyciem należy zawiesić liofilizat DNazy I w 255 μ l Nuclease-free water. Inkubować 60 s w temperaturze pokojowej. Ostrożnie wymieszać poprzez kilkakrotne odwracanie probówki. DNaza I jest wrażliwa na denaturację fizyczną. Dlatego nie należy worteksować roztworu DNase I. Podziel go na porcje, aby uniknąć nadmiernego zamrażania-rozmrażania. Nie zamrażać / rozmrażać więcej niż trzy razy.

LICZBA IZOLACJI	10 IZOLACJI	50 IZOLACJI	250 IZOLACJI
Nr katalogowy	EM25-010	EM25-050	EM25-250
RYS Buffer	6.6 ml	33 ml	165 ml
100% β-mercaptoethanol	66 μ l	330 μ l	1.65 ml
RYBL Buffer	6.6 ml	33 ml	165 ml
100% β-mercaptoethanol	66 μ l	330 μ l	1.65 ml
RYBW1 Buffer	3.6 ml	18 ml	90 ml
Etanol 96–100%	3.6 ml	18 ml	90 ml
Całkowita objętość	7.2 ml	36 ml	180ml

▲ Bufory RYBL i RYBW1 chroń przed światłem.

Aby uniknąć parowania, upewnij się, że butelki z buforami są szczelnie zamknięte.

Data ważności

Data ważności zestawu, przechowywanego w odpowiednich warunkach, podana jest na etykietach produktu. Po otwarciu zestaw zachowuje stabilność przez okres 12 miesięcy.

III. SPECYFIKACJA PRODUKTU

MATERIAŁ WYJŚCIOWY

- hodowle bakteryjne (do to 1×10^9 komórek)
lub drożdżowe (do to 5×10^7 komórek)
- mrożony osad komórkowy

WYDAJNOŚĆ IZOLACJI RNA

Wydajność izolacji zależy od ilości i rodzaju materiału próbki:

- do 60 μg RNA z kultur bakteryjnych
- do 30 μg RNA z kultur drożdżowych

POJEMNOŚĆ ZŁOŻA

ok. 90 μg RNA

CZAS IZOLACJI

- 30 minut izolacja RNA z bakterii (+10 minut etap z DNase I)
- 50 minut izolacja RNA z drożdzy (+10 minut etap z DNase I)

CZYSTOŚĆ RNA

A_{260}/A_{280} ratio = 1.9–2.1

IV. PRZYGOTOWANIE PRÓBK

Izolacja DNA z hodowli płynnej (0.2–3 ml)

Przed pobraniem odpowiedniej objętości hodowli płynnej, zawiesinę komórek należy dokładnie wymieszać. Do 1.5 ml probówki typu Eppendorf przenieść żądaną objętość hodowli bakteryjnej (maksymalnie 1.5 ml) i wirować przy 3000–4000 x g. Zdekantować supernatant. Jeśli istnieje potrzeba izolacji z większej niż 1.5 ml objętości hodowli, do powstałego osadu dodać kolejne 1.5 ml hodowli i powtórzyć wirowanie. Kontynuować izolację od pkt. 2 Protokołu izolacji (sekcja VI – Bakterie, sekcja VII – Drożdże).

Izolacja DNA z zamrożonego osadu komórkowego

Natychmiast po wyjęciu zamrożonego osadu komórkowego z zamrażarki kontynuuj izolację od pkt. 2 Protokołu izolacji (sekcja VI – Bakterie lub sekcja VII – Drożdże). Nie pozwól, aby osad się rozmroził.

Izolacja z bakterii Gram-dodatnich

Przed przystąpieniem do izolacji DNA z bakterii Gram-dodatnich próbkę należy poddać działaniu odpowiedniego enzymu. Do izolacji DNA z bakterii z rodzaju *Staphylococcus* zaleca się stosowanie lizostafiny. W przypadku innych bakterii Gram-dodatnich może być konieczne zoptymalizowanie czasu inkubacji lub stężenia lizozymu.

Staphylococcus:

1. Odwirować 1.5 ml hodowli bakteryjnej.
2. Supernatant zdekantować, a osad bakteryjny zawiesić w **200 µl TE***.
3. Do zawiesiny komórek dodać **20 µl** roztworu **lizostafiny 400 U/ml** i **6 µl RNA Extraction Enhancer**, dokładnie wymieszać poprzez pipetowanie lub worteksowanie.
4. Kontynuować izolację od pkt. 3 Protokołu izolacji (sekcja VI).

* Bufor TE: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0.

V. PRZED PRYZYSTĄPIENIEM DO IZOLACJI

1. Każdy z odczynników zestawu należy dobrze wymieszać. Nie należy mieszać zbyt intensywnie buforu **RYBL**.
2. Należy upewnić się czy do buforu **RYBW1** został dodany etanol. Jeśli nie, należy dodać odpowiednią ilość 96–100% etanolu (ilości podane są na etykietach oraz w tabeli w sekcji II).
3. Przed pierwszym użyciem, do buforów **RYS** i **RYBL** należy dodać **100% β -merkптоetanolu do końcowego stężenia 1%**. Trwałość buforów **RYS** i **RYBL** po dodaniu β -merkптоetanolu wynosi 4 tygodnie w temp. 2–8°C. Stąd też, w przypadku izolacji RNA prowadzonej partiami, należy przenieść odpowiednią do izolacji ilość **RYS** i **RYBL** Buffers do osobnej butelki (wolnej od RNaz) i dodać β -merkптоetanol.
4. W przypadku wytrącenia się osadu w buforach **RYBL** lub **RYBW1**, butelkę z roztworem należy ogrzać do temp. 50°C (**RYBL**) lub 37°C (**RYBW1**) i inkubować, aż do całkowitego rozpuszczenia się osadu, mieszając co kilka minut, a następnie schłodzić do temp. pokojowej.
5. Upewnij się, że DNaza I jest przygotowana (patrz strona 4).
6. Przygotuj statyw mrozący do przechowywania wyizolowanego RNA.

VI. PROTOKÓŁ IZOLACJI Z BAKTERII

1. Zwirować **0.2–1.5 ml** hodowli bakteryjnej przy 3000–4000 x g przez 5 min.
2. Supernatant zdekantować, a osad bakteryjny dokładnie zawiesić w **100 µl lizozymu** (10 mg/ml w 10 mM Tris – HCl pH 8.0) i **6 µl RNA Extraction Enhancer**.
3. Inkubować w **37°C** przez 10 min.
4. Dodać **600 µl RYBL Buffer** i worteksować przez 60 s.
5. Wirować 120 s przy 15 000–21 000 x g.
6. **Supernatant (ok. 600 µl)** przenieść do **minikolumny homogenizacyjnej H** umieszczonej w probówce odbierającej (2 ml) i wirować 120 s przy 15 000–21 000 x g. Zachować przesącz.
7. Do przesączu dodać **600 µl 70% EtOH**. Wymieszać przez pipetowanie lub worteksowanie 5 s.
8. Przenieść **700 µl mieszaniny** do **minikolumny wiążącej B** umieszczonej w probówce odbierającej (2 ml) i wirować 60 s przy 15 000 x g. Odrzucić przesącz i przenieść minikolumnę do nowej próbówki odbierającej (2 ml).
9. Przenieść pozostałą część mieszaniny do tej samej kolumny wiążącej B umieszczonej w probówce odbierającej. Wirować 60 s przy 15 000 x g. Odrzucić przesącz i przenieść kolumnę wiążącą B do nowej próbówki odbierającej.

Opcjonalne usuwanie DNA:

- a. Przemycie kolumny wiążącej B poprzez dodanie **500 µl buforu RYBW2** i wirowanie przez 60 s przy 11 000–15 000 x g.
- b. Do każdej izolacji należy użyć **90 µl 10x DNase I Reaction Buffer** i **10 µl** zawieszanej **DNazy I**. Wymieszać przez odwrócenie próbówki.
- c. Nanieść **95 µl mieszaniny** na środek kolumny wiążącej B. Inkubować 15 minut w temperaturze pokojowej. Wirować przez 20 s przy 11 000–15 000 x g i przejść do kroku 10.

10. Do minikolumny dodać **650 µl buforu płuczącego RYBW1** i wirować 60 s przy 11 000–15 000 x g.
11. Wylać przesącz z próbówki odbierającej i umieścić w niej z powrotem minikolumnę.
12. Do minikolumny dodać **650 µl buforu płuczącego RYBW2** i wirować 30 s przy 11 000–15 000 x g.
13. Wylać przesącz z próbówki odbierającej i umieścić w niej z powrotem minikolumnę.
14. Do minikolumny dodać **500 µl buforu płuczącego RYBW2** i wirować 60 s przy 11 000–15 000 x g.
15. Wylać przesącz z próbówki odbierającej i umieścić w niej z powrotem minikolumnę.
16. Wirować 60–120 s przy 15 000–21 000 x g.
 - ▲ Bufor płuczący zawiera alkohol, który może powodować inhibicję niektórych reakcji enzymatycznych, a także obniżenie wydajności elucji, dlatego istotne jest jego całkowite usunięcie przed etapem elucji.
17. Ostrożnie wyjąć suchą minikolumnę z próbówki odbierającej i umieścić ją w jałowej próbówce 1.5 ml typu Eppendorf.
18. Nanieść na środek kolumny wiążącej B **50–100 µl buforu elucyjnego REB**.
 - ▲ Możliwa jest zmiana objętości buforu elucyjnego w zakresie 30–100 µl.
19. Inkubować przez 3 min. w temp. pokojowej.
20. Wirować 120 s przy 7000–11 000 x g.
21. Minikolumnę usunąć, a wyizolowane RNA przechowywać w temp. -80°C do czasu dalszych analiz.

VII. PROTOKÓŁ IZOLACJI Z DROŻDŻY

1. Zwirować **0.2–1.5 ml** hodowli drożdżowej przy 3000–4000 x g przez 5 min.
 2. Supernatant zdekantować, a osad komórkowy dokładnie zawiesić w **600 µl RYS Buffer**.
 3. Dodać **2 µl RYML Buffer**.
 4. Inkubować w **30°C** przez 30 min.
 5. Po inkubacji wirować próbkę 10 min przy 3000–4000 x g.
 6. Ostrożnie usunąć supernatant pipetą. Zwrócić szczególną uwagę, aby nie naruszyć osadu sferoplastów.
 7. Osad dokładnie zawiesić w **600 µl RYBL Buffer** i intensywnie worteksować 60 s.
 8. Wirować 120 s przy 15 000–21 000 x g.
 9. Nie naruszając osadu delikatnie przenieść **supernatant** do **minikolumny homogenizującej H**, umieszczonej w próbówce odbierającej i wirować 120 s przy 15 000–21 000 x g.
 10. Do przesączu dodać **600 µl 70% etanolu**. Wymieszać przez pipetowanie lub worteksowanie 5 s.
 11. Przenieść **700 µl mieszaniny** do **minikolumny wiążącej B** umieszczonej w próbówce odbierającej (2 ml) i wirować 60s przy 15 000 x g. Odrzucić przesącz i przenieść minikolumnę do nowej próbówki odbierającej (2 ml).
 12. Przenieść pozostałą część mieszaniny do tej samej kolumny wiążącej B umieszczonej w próbówce odbierającej. Wirować 60 s przy 15 000 x g. Odrzucić przesącz i przenieść kolumnę wiążącą B do nowej próbówki odbierającej.
- Opcjonalne usuwanie DNA:
- a. Przemycie kolumny wiążącej B poprzez dodanie **500 µl buforu RYBW2** i wirowanie przez 60 s przy 11 000–15 000 x g.
 - b. Do każdej izolacji należy użyć **90 µl 10x DNase I Reaction Buffer** i **10 µl** zawieszony **DNazy I**. Wymieszać przez odwrócenie próbówki.

- c. Nanieść **95 µl mieszaniny** na środek kolumny wiążącej B. Inkubować 15 minut w temperaturze pokojowej. Wirować przez 20 s przy 11 000–15 000 x g i przejść do kroku 13.
13. Do minikolumny dodać **650 µl buforu płuczącego RYBW1** i wirować 60 s przy 11 000–15 000 x g.
14. Wylać przesącz z próbówki odbierającej i umieścić w niej z powrotem minikolumnę.
15. Do minikolumny dodać **650 µl buforu płuczącego RYBW1** i wirować 60 s przy 11 000–15 000 x g.
16. Wylać przesącz z próbówki odbierającej i umieścić w niej z powrotem minikolumnę.
17. Do minikolumny dodać **500 µl buforu płuczącego RYBW2** i wirować 60 s przy 11 000–15 000 x g.
18. Wylać przesącz z próbówki odbierającej i umieścić w niej z powrotem minikolumnę.
19. Wirować 60–120 s przy 15 000–21 000 x g.
- ▲ Bufor płuczący zawiera alkohol, który może powodować inhibicję niektórych reakcji enzymatycznych, a także obniżenie wydajności elucji, dlatego istotne jest jego całkowite usunięcie przed etapem elucji.
20. Ostrożnie wyjąć suchą minikolumnę z próbówki odbierającej i umieścić ją w jałowej próbówce 1.5 ml typu Eppendorf.
21. Nanieść na środek **50–100 µl buforu elucyjnego REB**.
- ▲ Możliwa jest zmiana objętości buforu elucyjnego w zakresie 30–100 µl.
22. Inkubować przez 3 min w temp. pokojowej.
23. Wirować 120 s przy 7 000–11 000 x g
24. Minikolumnę usunąć, a wyizolowane RNA przechowywać w temp. -80°C do czasu dalszych analiz.

VIII. BEZPIECZEŃSTWO I POSTĘPOWANIE Z PRODUKTEM

RYBL Buffer



Niebezpieczeństwo

H331

P261, P304+P340 P311, EUH032

RYBW1 Buffer



Uwaga

H302, H412

P264, P273, P301+P312 P330, EUH032

RYBW2 Buffer



Niebezpieczeństwo

H225, H319, H336

P210, P305+P351+P338, P304+P340 P312

EUH032 W kontakcie z kwasami uwalnia bardzo toksyczne gazy. **H225** Wysoce łatwopalna ciecz i pary. **H302** Działa toksycznie po połknięciu. **H319** Działa drażniąco na oczy. **H331** Działa toksycznie w następstwie wdychania. **H336** Może wywoływać uczucie senności lub zawroty głowy. **H412** Działa szkodliwie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki. **P210** Przechowywać z dala od źródeł ciepła, gorących powierzchni, źródeł iskrzenia, otwartego ognia i innych źródeł zapłonu. Nie palić. **P261** Unikać wdychania pyłu / dymu / gazu / mgły / par / rozpylonej cieczy. **P264** Dokładnie umyć ręce po użyciu. **P273** Nie wypuszczać do środowiska. **P304+P340 P311** W przypadku dostania się do dróg oddechowych: Wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić warunki do odpoczynku w pozycji umożliwiającej swobodne oddychanie. Skontaktować się z ośrodkiem zatruc lub lekarzem. **P301+P312 P330** W przypadku połknięcia: W przypadku złego samopoczucia skontaktować się z ośrodkiem zatruc lub lekarzem. Wypłukać usta. **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.