syngen.pl kolumienki.pl

Syngen RNA clean-up Kit

Zawartość opakowania i warunki przechowywania

Syngen RNA clean-up Kit	zestaw demo	SY391010	SY391011
Liczba izolacji	**4**	**50**	**200**
Bufor RW	1,8 ml	30 ml	80 ml
Bufor RP1	3 ml	30 ml	110 ml
Bufor RP2	1,5 ml	20 ml	2 x 35 ml
Woda wolna od RNaz	1,5 ml	6 ml	12 ml
Kolumienki R	4 szt.	50 szt.	200 szt.
Probówki 2 ml	4 szt.	50 szt.	200 szt.
Probówki 1,5 ml	4 szt.	50 szt.	200 szt.

Kolumienki R, a także wszystkie roztwory, powinny być przechowywane w temperaturze pokojowej (15-25°C).

Sprzęt i odczynniki potrzebne do wykonania procedury, a niedostarczone z zestawem

- Etanol (96-100%)
- Probówki 1.5 ml i 2 ml (eppendorfki)
- Statyw
- Sterylne końcówki do pipet (najlepiej z filtrem)
- Pipety automatyczne nastawne
- Mikrowirówka
- Worteks
- Łaźnia wodna, blok grzejny lub termomikser na 65°C

Przygotowanie odczynników przed pierwszym użyciem

Bufor płuczący

Bufor płuczący RP2 jest dostarczany jako koncentrat. Przed pierwszym użyciem dodaj do niego odpowiednią ilość etanolu (96-100%) i starannie wymieszaj. Poniższa tabela przedstawia sposób przygotowania buforu płuczącego.

Syngen RNA clean-up Kit	zestaw demo	SY391010	SY391011
Liczba izolacji	**4**	**50**	**200**
Objętość etanolu, jaką należy dodać do koncentratu buforu płuczącego RP2	6 ml	80 ml	po 140 ml do 35 ml buforu

Bufor RP2 po dodaniu etanolu powinien być szczelnie zamknięty i przechowywany w temperaturze pokojowej. Przed rozpoczęciem procedury zawsze wymieszaj rozpuszczony bufor przez obrócenie butelki kilka razy.

Materiał wyjściowy

Ilość materiału na 1 izolację: maksymalnie 100 µg RNA w maksymalnie 100 ul roztworu.

Specyfikacja

Wydajność: 85-95%
Objętość elucji: 30-50 µl
Złoże wiąże do 100 µg RNA
Czas wykonania procedury: do 10 minut bez opcjonalnego trawienia DNazą

Zanim zaczniesz

1. Do buforu RP2 dodaj odpowiednią ilość 96-100% etanolu.
2. Jeżeli w jakimś buforze wytrącił się precypitat, rozpuść go inkubując w 37°C przez kilka minut, mieszając, a następnie ostudź.
3. Jeżeli dodatkowo chcesz wykonać trawienie DNazą (opcjonalnie) rozpuść DNazę I wolną od RNaz w buforze do rozpuszczania (150 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris HCl o pH 7,5) o końcowym stężeniu 0,5 U/ul.

PROTOKÓŁ

1. W 1,5 ml probówce umieść próbkę RNA i uzupełnij wodą wolną od RNaz (dostarczono) do objętości 100 µl. Maksymalna dopuszczalna objętość próbki RNA to 100 µl. Jeżeli objętość próbki RNA wynosi 100 µl, nie dodawaj wody.

2. Dodaj 350 µl buforu wiążącego RW. Zamknij probówkę i wymieszaj na worteksie.

3. Dodaj 250 µl etanolu (96-100%) (nie dostarczono) i wymieszaj na worteksie.

4. Umieść kolumienkę R w probówce 2 ml (dostarczono). Przenieś całą zawartość probówki z kroku 3 na kolumienkę R. Zamknij wieczko.

5. Wiruj przez 1 minutę z prędkością 10.000 x g (lub 14.000 rpm). Odrzuć supernatant, a kolumienkę przenieś z powrotem do probówki.

   ⇨ Opcja: trawienie DNA. Jeżeli potrzebujesz RNA wolne od DNA, wykonaj poniższe kroki.
   Jeśli nie wykonujesz trawienia DNazą na kolumnie, przejdź do kroku 6.

   - do kolumienki dodaj 250 µl buforu RP1. Wiruj przez 1 minutę z prędkością 10.000 x g (lub 14.000 rpm). Odrzuć supernatant, a kolumienkę przenieś z powrotem do probówki.

   - na środek membrany w kolumience dodaj 100 µl roztworu DNazy I wolnej od RNaz o stężeniu 0,5 U/ul (nie dostarczono). Zamknij wieczko i inkubuj przez 15 minut w temperaturze pokojowej.

   - do kolumienki dodaj 250 µl buforu RP1. Wiruj przez 1 minutę z prędkością 10.000 x g (lub 14.000 rpm). Odrzuć supernatant, a kolumienkę przenieś z powrotem do probówki.

- przejdź do kroku 7.

6. Dodaj do kolumienki 500 µl buforu płuczącego RP1, zamknij wieczko. Wiruj przez 1 minutę z prędkością 10.000 x g (lub 14.000 rpm). Odrzuć supernatant, a kolumienkę przenieś z powrotem do probówki.

7. Dodaj do kolumienki 750 µl buforu RP2, zamknij wieczko. Wiruj przez 1 minutę z prędkością 10.000 x g (lub 14.000 rpm). Odrzuć supernatant, a kolumienkę przenieś z powrotem do probówki.

8. Powtórz krok 7.

9. Wiruj kolumienkę przez 3 minuty z prędkością 10.000 x g, aby wysuszyć membranę.

10. Przenieś kolumienkę do nowej 1,5 ml probówki (dostarczono). Na środek membrany dodaj 30-50 µl wody wolnej od RNaz (dostarczono) i inkubuj w RT przez 1 minutę. Zamknij wieczko.

11. Wiruj przez 2 minuty z prędkością 10.000 x g. Ostrożnie wysuń kolumienkę i zamknij probówkę z wyeluowanym RNA. Przechowuj w temperaturze od -70°C do -86°C.

Samodzielne rozwiązywanie problemów

1. Mała wydajność:

   RNA zostało na kolumnie. Powtórz elucję. Podgrzej wodę do elucji do 70°C i inkubuj na kolumnie 5 minut.

2. Zdegradowane RNA

   Wystąpiło zanieczyszczenie RNazami. Pracuj zgodnie z zasadami pracy z RNA. Sprawdź zanieczyszczenia buforów.

3. Problem w reakcjach enzymatycznych

   Wystąpiło zanieczyszczenie eluatu solą. Upewnij się, czy przygotowano bufor RP2 zgodnie z zaleceniami oraz że powtórzono płukanie buforem w kroku 8.

4. Niewłaściwy współczynnik A260/A280

   Obecność DEPC w DEPC-owanej wodzie użytej do elucji lub blankowania. Używaj wody dostarczonej z zestawem. Przy pomiarze spektrofotometrycznym blankuj na 10 mM Tris-HCl, a nie DEPC-owanej wodzie.

Producent

Syngen Biotech Sp. z o.o. Sp. k.
54-116 Wrocław, ul. Ostródzka 13
tel. 71 349 70 13, 71 349 91 66, 71 349 61 67, faks 71 349 70 33
kolumienki.pl, syngen.pl, info@syngen.pl