

RNA 3-zone

Odczynnik do izolacji RNA

RNA 3-zone jest odczynnikiem umożliwiającym izolację całkowitego kwasu rybonukleinowego (total RNA) z materiału biologicznego, takiego jak komórki bakterii, drożdży, tkanki roślinne i zwierzęce. Wykorzystanie RNA 3-zone umożliwia uzyskanie wysokiej jakości RNA pozbawionego zanieczyszczeń białkowych i DNA. Proces izolacji prowadzany z wykorzystaniem RNA 3-zone pozwala na uzyskanie czystego RNA w ciągu 1 h.

RNA uzyskany przy pomocy RNA 3-zone można następnie wykorzystać w innych technikach biologii molekularnej, takich jak np.:

- odwrotna transkrypcja
- Northern blot
- hybrydyzacja dot blot
- translacja in vitro
- klonowanie molekularne



Dodatkowe odczynniki potrzebne do izolacji RNA:

1. chloroform
2. alkohol izopropylowy
3. 75% etanol (roztwór w H₂O_{DEPC})
4. woda wolna od RNaz lub 0,5 % roztwór SDS .

W celu przygotowania wody wolnej od RNaz należy wlać wodę do butelek wolnych od RNaz, następnie dodać DEPC w ilości umożliwiającej uzyskanie 0,01% roztworu (v/v). Odstawić na noc, a następnie roztwór poddać autoklawowaniu. Roztwór SDS przygotowywać wyłącznie przy użyciu autoklawowanej H₂O_{DEPC}.

Uwaga! Składniki RNA 3-zone mają właściwości drażniące i żrące. Podczas pracy z RNA 3-zone należy zachować szczególną ostrożność, unikać kontaktu ze skórą, ubraniem oraz wdychania oparów. Należy stosować rękawiczki i okulary ochronne. Pracować pod dyktando.

RAZEM Z NAMI



Warunki przechowywania: +4°C Lot nr

Exp. date

Izolacja RNA przy użyciu RNA 3-zone:

1. Homogenizacja

Tkanki

Próbkę homogenizować przy użyciu homogenizatora w obecności RNA 3-zone stosując 1 ml RNA 3-zone na 50-100 mg tkanki. Objętość próbki nie powinna przekraczać 10% objętości RNA 3-zone użytego do homogenizacji.

Komórki z hodowli jednowarstwowej (monolayer)

Lizę komórek przeprowadzić bezpośrednio na płytce przez podanie 1 ml RNA 3-zone na każde 3,5 cm² powierzchni płytki. Komórki na płytce z RNA 3-zone przepipetować kilka razy. Ilość RNA 3-zone jaką należy podać zależy od powierzchni płytki (1 ml na 10 cm²), nie zaś od ilości komórek. Zbyt małą ilość RNA 3-zone zwiększa ryzyko pojawienia się kontaminacji DNA.

Zawiesina komórkowa

Komórki osadzić przez krótkie zwirowanie. Następnie lizować komórki pipetując z RANzone, używając 1 ml odczynnika na 5-10 x 10⁶ komórek zwierzęcych, roślinnych lub drożdżowych. W przypadku bakterii stosować 1 ml RNzone na 1 x 10⁷ komórek. Unikać przemywania komórek przed zastosowaniem RNA 3-zone ze względu na wysokie ryzyko degradacji mRNA. Zniszczenie struktury niektórych komórek drożdży i bakterii może wymagać użycia homogenizatora.

Uwaga: W przypadku próbek o wysokiej zawartości białek, tłuszczów, polisacharydów lub takich próbek jak mięśnie, tkanka tłuszczowa oraz fragmenty bulw roślinnych należy wprowadzić dodatkowy etap po homogenizacji.

Dotykowy etap:

Po homogenizacji usunąć nierozpuszczone elementy homogenatu przez wirowanie 12 000 x g/10 min/2-8°C. Uzyskany osad zawiera błony zewnątrzkomórkowe, polisacharydy i wysokocząsteczkowy DNA, natomiast supernatant zawiera RNA. Podczas izolacji z komórek o dużej zawartości tłuszczu, jego nadmiar zbiera się w postaci warstwy powierzchniowej, którą trzeba usunąć. W każdym przypadku należy przenieść klarowny roztwór homogenatu do nowej probówki i przystąpić do kolejnego etapu separacji fazy.

2. Separacja fazy

Próbkę po homogenizacji inkubować przez 5 min/15-30°C tak, aby umożliwić kompletną dysocjację kompleksów nukleoproteinowych. Dodać 0,2 ml chloroformu na 1 ml RANzone. Zawartość probówki wymieszać ręcznie energicznie wstrząsając przez 15 sek. Inkubować w 2-3 min/ 15-30°C. Następnie zwirować próbkę przy maksimum 12 000 x g/15 min/ 2-8°C. W wyniku wirowania mieszanina rozdziela się na 3 fazy: dolną fenolowo-chloroformową, interfazę oraz górną fazę wodną (bezbarwna). RNA znajduje się w górnej fazie wodnej. Objętość fazy wodnej stanowi ok. 60 % objętości RNA 3-zone użytego do homogenizacji.

3. Precypitacja RNA

Przenieść fazę wodną do nowej probówki. W przypadku izolacji DNA lub białek zachować fazę organiczną. Przeprowadzić precypitację RNA z fazy wodnej przy użyciu alkoholu izopropylowego stosując 0,5 ml alkoholu na 1 ml RNA 3-zone użytego na etapie homogenizacji. Próbkę inkubować 10 min/15-30°C, a następnie zwirować przy maksimum 12 000 x g/10 min/ 2-8°C. Precypitat RNA zwykle tworzy podobny do żelu osad na ściankach i dnie probówki, który jest niewidoczny przed wirowaniem.

4. Przemycanie RNA

Po wirowaniu usunąć supernatant. Osad RNA przemyć 75% etanolem stosując przynajmniej 1 ml 75% etanolu na każdy 1 ml RNA 3-zone użytego na etapie homogenizacji. Próbkę wymieszać przez zworteksowanie, zwirować przy maksimum 7500 x g/ 5 min/ 2-8°C.

5. Rozpuszczanie RNA

Na ostatnim etapie izolacji krótko wysuszyć osad RNA przez pozostawienie otwartej probówki lub suszyć próżniowo przez 5-10 min. Nie należy suszyć RNA przez poprzez zwirowanie w warunkach próżni. Bardzo ważne jest, aby nie przesuszyć osadu RNA, gdyż może to spowodować zmniejszenie jego rozpuszczalności. Częściowo rozpuszczony RNA osiąga stosunek OD A260/280 < 1,6. RNA rozpuszczać w wodzie wolnej od RNaz lub 0,5% roztworze SDS przez kilkukrotne pipetowanie. Inkubować 10 min/55-60°C. Unikać obecności SDSu jeżeli izolowany RNA będzie wykorzystywany do reakcji enzymatycznych. RNA można również rozpuszczać w 100% dejonizowanym formamidzie, co umożliwi przechowywanie w -70°C nawet do kilku lat.