

Total RNA Isolation Kit

Total RNA Isolation Kit spája výhody Trizolovej a kolónkovej izolácie RNA. V priebehu **45 minút** umožňuje rýchlo a jednoducho vyzolovať **intaktnú total RNA** z tkanív alebo bunkových kultúr, pričom jedna kolónka je určená na spracovanie cca 50-100 mg tkaniva, resp. 5-10.10⁶ buniek. Takto získaná RNA môže byť následne procesovaná metódami RT-PCR, RNase protection assay, primer extension, Northern blot analysis, oligo (dT) izolácie mRNA, in vitro translácie a cDNA tvorbou knižníc.

Zloženie Total RNA Isolation Kitu (25 purifikácií):	
1. Redzol Reagent	25 ml
2. SiMax Membrane Spin Column	25 ks
3. RNA Washing Buffer	20 ml
4. DEPC Water	1,5 ml

Kat.č.	Názov	Cena s DPH
FTRI-25	Total RNA Isolation Kit (25 Isolations)	€ 46,8 1410 Sk

Pracovný protokol

1. Príprava:

Prípravte si potrebné množstvo buniek/tkaniva. 1 ml Redzolu je určený na spracovanie 5-100 mg tkaniva, resp. 5-10x10⁶ buniek.

2. Lýza buniek:

a. Adherované bunky

Odoberte kultivačné médium a pridajte Redzol. Pipetovaním suspenzie pomocou mikropipety zlyzujte všetky bunky a lyzát následne preneste do novej mikroskúmavky.

1 ml Redzolu je schopný zlyzovať cca 10 cm² buniek.

b. Bunkové suspenzie.

Bunky usadte centrifugáciou, odstráňte supernatant a pridajte Redzol. Pipetovaním suspenzie pomocou mikropipety zlyzujte všetky bunky (niektoré typy kvasiniek a baktérií je potrebné zlyzovať mechanicky v homogenizátore, alebo pomocou sklenených guľčiek). Lyzát preneste do novej mikroskúmavky.

1 ml Redzolu je určený na lýzu 5-10x10⁶ živočíšnych, rastlinných alebo kvasinkových buniek, resp. 1x10⁷ bakteriálnych buniek.

Upozornenie - bunky pred pridaním Redzolu nepremývajte, pretože premývaním môže nastať degradácia mRNA:

c. Tkanivá

Tkanivo rozdeľte na menšie časti, vložte do homogenizátora, pridajte adekvátne množstvo Redzolu a homogenizujte. Homogenát následne preneste do novej centrifugačnej skúmavky. Pletivo je možné homogenizovať aj v tekutom N₂ a až potom zmiešať s Redzolom. 1 ml Redzolu je určený na 50-100 mg tkaniva, pričom celkový objem tkaniva by mal byť pod 10% objemu Redzolu.

3. Separácia fáz

- a. Homogenát nechajte stáť 5 min pri 15-30°C, čím sa dosiahne kompletná lýza buniek.
- b. Pridajte 0,2 ml chloroformu (200 ul na 1 ml Redzolu), zvortexujte a nechajte 2-3 minúty stáť pri 15-30°C.
- c. Centrifugujte 15 min pri 12.000 rpm. Obsah mikroskúmavky sa tým rozdelí do troch fáz, pričom RNA je vo vrchnej vodnej fáze.

4. Purifikácia v kolónke

- a. Vrchnú vodnú fázu (bez porušenia spodnej fázy) preneste do novej 1,5 ml mikroskúmavky a pridajte 200 ul etanolu. Obsah jemne premiešajte prevracaním mikroskúmavky.
- b. Zmes preneste do SiMax Spin kolónky, vložte do novej 1,5 ml mikroskúmavky, nechajte postáť **najmenej 3 minúty**. Následne centrifugujte 2-3 min pri 12.000 rpm.
- c. SiMax Spin kolónku vložte do Collection tube, pridajte 600 ul Washing buffer a centrifugujte 1 min pri 12.000 rpm. Obsah z Collection tube odstráňte a vložte Spin kolónku späť.
- d. Centrifugujte ďalšie 2 min pri 12.000 rpm do úplného odstránenia Washing buffer z kolónky a SiMax Spin kolónku následne preneste do novej 1,5 ml mikroskúmavky. Do stredu membránky pridajte 50 ul DEPC vody alebo 0,5% SDS, nechajte postáť 2 minúty a centrifugujte 1 min pri 12.000 rpm. V eluáte sa nachádza intaktná RNA.

Pre zvýšenie výťažku je možné bod **d.** opakovať pridaním ďalších 30 ul DEPC vody. Výsledná koncentrácia RNA sa tým však zníži.