

RNA FAST UNIVERSAL KIT

Por favor, leia o manual cuidadosamente antes de usar

Cat. No. XP-200

Armazenamento:

- Kit com reagentes, colunas e tubos: Temperatura Ambiente
- DNase I e Buffer: -18°C / -30°C

Descrição:

Este kit foi projetado para a extração rápida de RNA total de células animais cultivadas, tecidos e *E. coli*. As amostras são lisadas, o DNA é digerido com a DNase I, e o RNA é especificamente ligado a uma membrana de gel de sílica. O RNA total extraído é de alta pureza, livre de contaminação por DNA e proteínas, e pode ser usado para RT-PCR, qRT-PCR, análise de microarrays, Northern blot e outros experimentos.

Conteúdo do Kit

Componente	50 reações
Binding Buffer 4 (BB4)	40ml
Clean Buffer 4 (CB4)	60ml
Wash Buffer 4 (WB4)	12ml
Proteinase K (20mg/ml)	1ml
DNase I (3unidades/ul)	1500U
DNase I Reaction Buffer	4x1ml
RNAse-free Water	10ml
RNAse free tube (1,5ml)	50 unidades
RNA spin coluna com tubos de coleta	50 unidades

Requerimentos de Amostra

Tipo de Amostra	Quantidade de Amostra	Quantidade de BB4 (preparado com 2-mercaptoethanol)
Célula animal	$\leq 5 \times 10^6$	0,3-0,6ml
Tecido Animal	$\leq 20\text{mg}$	0,3-0,6ml
Célula bacteriana	$\leq 1 \times 10^9$	0,35ml

Manuseio de Amostras:

A. Para Células Animais Cultivadas

1. Coleta de Células

- Para células de suspensão (não exceder 5×10^6 células): Transfira as células para um tubo livre de RNase e centrifuge a 12.000xg por 5 minutos a 2-8°C. Posteriormente remova cuidadosamente todo o sobrenadante.

- Para células aderentes (não exceder 5×10^6 células): Realize o tratamento das células aderentes da garrafa com tripsina e posteriormente transfira as células para um tubo livre de RNase, centrifugando a 12.000xg por 5 minutos a 2-8°C. Posteriormente remova cuidadosamente todo o sobrenadante.

Nota: Para células aderentes, outro método é remover todo o meio e adicionar diretamente um volume apropriado de BB4 (adicionar 10 µl β-mercaptoetanol por 1 ml de BB4) dentro da garrafa de cultura (diâmetro ≤ 10 cm) e transferir o lisado celular para um tubo livre de RNase, seguido pela homogeneização (passo 3 abaixo).

2. Lise

Retire suavemente as possíveis bolhas da solução que está dentro do tubo, adicionando posteriormente o volume apropriado de tampão de lise BB4 (adicione 10 µl β-mercaptoetanol por 1 ml de BB4), vortexando vigorosamente até que a total homogeneização e ressuspensão celular.

Nota: Para $\leq 1 \times 10^6$ células, utilize 0,3 ml de BB4. Para 1×10^6 a 5×10^6 células, utilize 0,6 ml BB4.

3. Homogeneização

Misture a solução cuidadosamente, pipetando suavemente para cima e para baixo 5 a 10 vezes com ponteiros DNase e RNase free.

4. Centrifugação

Centrifuge a 12.000 xg por 5 minutos em temperatura ambiente. Depois, transfira o sobrenadante para um novo tubo centrífuga RNase e DNase free.

B. Tecido Animal

1. Emasceração do tecido

Congele rapidamente o tecido em nitrogênio líquido e mascere até virar um pó fino usando um pilão. Transfira o pó para um tubo decentrífuga.

2. Lise

Adicione 0,3 ml de BB4 (adicione 10 µl β-mercaptoetanol por 1 ml de BB4) e 15 µl de Proteinase K a cada 10mg tecido. Misture bem e incube a 56°C por 10-20 minutos.

Nota: Para ≤ 10 mg de tecido, utilize 0,3 ml BB4. Para 10-20 mg de tecido, utilize 0,6 ml de BB4.

3. Centrifugação

Centrifuge a 12.000xg por 5 minutos em temperatura ambiente. Transfira o sobrenadante para um novo tubo centrífuga livre de RNase e DNase.

C.Células Bacterianas

1. Coleta de Células

Centrifuge a cultura bacteriana a 12.000xg por 2 minutos a 2-8°C (o número celular não deve exceder 1×10^9). Remova completamente todo o sobrenadante (a remoção incompleta pode inibir a digestão subsequente da parede celular).

2. Resuspensão

Resuspenda completamente o pellet celular em um tampão TE de 100 µl contendo lisozima (prepare-se dissolvendo 1 mg de lisozima em tampão TE de 100 µl).

3. Lise

Adicione 350 µl de BB4 (adicione 10 µl β-mercaptoetanol por 1 ml de BB4). Homogeneize vigorosamente com auxílio de um vortex e incube em temperatura ambiente por 5 minutos.

4. Homogeneização

Misture a solução cuidadosamente, pipetando suavemente para cima e para baixo 5 a 10 vezes com ponteiros sem RNase.

5. Centrifugação

Centrifuge a 12.000xg por 2 minutos em temperatura ambiente. Transfira o sobrenadante para um novo tubo centrífuga livre de RNase e DNase.

Isolamento do RNA

Nota: Adicione 48 ml de etanol absoluto ao WB4 antes do uso.

- Para amostras celulares e de tecido: Adicione volume igual de 70% de etanol ao sobrenadante. -
- Para amostras bacterianas: Adicione 250 µl de 100% de etanol ao sobrenadante e misture bem (pode se formar precipitado).

Nota: Prepare etanol 70% usando água sem RNase

2. Misture vagarosamente com auxílio de um vortex para dispersar qualquer precipitado. Transfira toda a mistura (incluindo o precipitado) para a coluna de spin. Centrifuge a 12.000xg por 30 segundos e descarte o fluxo. Se o volume exceder a capacidade da coluna, carregue em vários passos.

3. Adicione 500 µl de CB4 à coluna de spin e centrifuge a 12.000 × g por 30 segundos. Descarte o fluxo.

4. **(Opcional)** Para remoção do DNA genômico: Adicione 80 µl de solução de DNase I (preparação da solução de DNase I: Misture 70 µl de Reaction Buffer + 10 µl (30 U) de DNase I em um tubo sem RNase na hora do uso) diretamente no centro da membrana. Incube em temperatura ambiente por 15 minutos. Depois, repita o passo 3 uma vez.

5. Adicione 500 µl de WB4 e centrifuge a 12.000xg por 30 segundos. Descarte o fluxo.

6. Repita o passo 5 uma vez.

7. Centrifuge a coluna vazia a 12.000 xg por 2 minutos para remover o etanol residual.

8. Transfira a coluna de spin para um novo tubo livre de RNase de 1,5 mL. Adicione 30-100 µl de água livre de RNase diretamente no centro da membrana. Deixe em temperatura ambiente por 1 minuto.

9. Centrifuge a 12.000 xg por 2 minutos para eluir o RNA.

10. Armazene o RNA isolado a -80°C.

Notas

- Garantir que β -mercaptoetanol tenha sido adicionado ao BB4.
- Garantir que 96-100% de etanol tenha sido adicionado ao WB4.
- Todas as etapas da centrifugação são realizadas em temperatura ambiente.

Apenas para uso em pesquisa, não para diagnóstico clínico.

Contato

- Website: www.genexplore.com.br
- E-mail: suporte@genexplore.com.br