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℃ / -30℃

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	Quantidade para 50 reações
Tampão de Ligação	40ml
Tampão de Limpeza	60ml
Tampão de Lavagem	12ml
Proteinase K (20mg/ml)	1ml
Água RNAse Free	10ml
Tubos RNAse Free	50 unidades
Colunas Spin e Tubos de Coleta	50 unidades

Reagente opcional

Componente	Necessário para 50 reações
DNAse I (3unidades/ul)	1500U
DNAse I Reaction Buffer	4x1ml

Requerimentos de Amostra

Tipo de Amostra	Quantidade de Amostra	Quantidade de BB4 (preparado com 2-mercaptoethanol)
Célula animal	≤$5x10^6$	0,3-0,6ml
Tecido Animal	≤20mg	0,3-0,6ml
Célula bacteriana	≤$1x10^9$	0,35ml

Manuseio de Amostras e Isolamento de RNA

A. Células Animais em Cultura

1. Coleta Celular

- **Para células em suspensão:** (Não exceder a capacidade máxima recomendada de células). Transferir as células para um tubo de centrífuga livre de RNase, centrifugar a $12.000 \times g$ por 5 min a $2 - 8\,°C$ e remover cuidadosamente todo o sobrenadante.
- **Para células aderentes:** (Não exceder 5×10^6 células). Tratar com tripsina, transferir as suspensões celulares para um tubo de centrífuga livre de RNase, centrifugar a $12.000 \times g$ por 5 min a $2 - 8\,°C$ e remover cuidadosamente todo o sobrenadante.

Nota: Para células aderentes, um método alternativo consiste em aspirar totalmente o meio de cultura e adicionar diretamente um volume adequado de Tampão de Ligação (adicionar $10\,\mu L$ de β-mercaptoetanol por 1 mL do Tampão de Ligação, preparado no momento do uso) diretamente no recipiente de cultura (diâmetro ≤ 10 cm). Transferir o lisado celular para um tubo de centrífuga livre de RNase e prosseguir diretamente para a etapa de homogeneização (Etapa 3 desta seção).

2. Lise

Agitar levemente o tubo para desagregar o *pellet* celular. Adicionar o volume adequado do Tampão de Ligação (adicionar $10\,\mu L$ de β-mercaptoetanol por 1 mL do Tampão de Ligação, preparado no momento do uso) e agitar vigorosamente no *vortex* até que o *pellet* esteja completamente disperso.

Nota: Para $\leq 10^6$ células, utilizar $0{,}3$ mL do Tampão de Ligação. Para 1×10^6 a 5×10^6 células, utilizar $0{,}6$ mL do Tampão de Ligação.

3. Homogeneização

Misturar a solução de forma homogênea pipetando suavemente para cima e para baixo de 5 a 10 vezes com ponteiras livres de RNase.

4. Centrifugação

Centrifugar a $12.000 \times g$ por 5 min à temperatura ambiente. Em seguida, transferir o sobrenadante para um novo tubo de centrífuga livre de RNase.

B. Tecido Animal

1. Maceração

Realizar o congelamento instantâneo (*flash-freezing*) do tecido em nitrogênio líquido e macerá-lo até a obtenção de um pó fino utilizando cadinho e pistilo pré-resfriados. Transferir o pó pulverizado para um tubo de centrífuga.

2. Lise

Adicionar $0{,}3$ mL do Tampão de Ligação (adicionar $10\,\mu L$ de β-mercaptoetanol por 1 mL do Tampão de Ligação, preparado no momento do uso) e $15\,\mu L$ de Proteinase K por 10 mg de tecido. Homogeneizar adequadamente e incubar a $56\,°C$ por $10 - 20$ min.

Nota: Para tecidos ≤ 10 mg, utilizar $0{,}3$ mL do Tampão de Ligação. Para tecidos entre 10 e 20 mg, utilizar $0{,}6$ mL do Tampão de Ligação.

3. Centrifugação

Centrifugar a $12.000 \times g$ por 5 min à temperatura ambiente. Transferir o sobrenadante para um novo tubo de centrífuga livre de RNase.

C. Células Bacterianas

1. Coleta Celular

Centrifugar a cultura bacteriana a $12.000 \times g$ por 2 min a $2 - 8\,°C$ (a densidade celular não deve exceder 1×10^9 células). Remover completamente o sobrenadante (a remoção incompleta pode inibir a digestão subsequente da parede celular).

2. Ressuspensão

Ressuspender o *pellet* celular completamente em $100\,\mu$L do Tampão de Eluição contendo lisozima (preparar dissolvendo 1 mg de lisozima em $100\,\mu$L do Tampão de Eluição).

3. Lise

Adicionar $350\,\mu$L do Tampão de Ligação (adicionar $10\,\mu$L de β-mercaptoetanol por 1 mL de Tampão de Ligação, preparado no momento do uso). Agitar no *vortex* para homogeneizar e incubar à temperatura ambiente por 5 min.

4. Homogeneização

Homogeneizar a solução exaustivamente pipetando suavemente para cima e para baixo de 5 a 10 vezes com ponteiras livres de RNase.

5. Centrifugação

Centrifugar a $12.000 \times g$ por 2 min à temperatura ambiente. Transferir o sobrenadante para um novo tubo de centrífuga livre de RNase.

Isolamento de RNA

Nota prévia: Adicionar 48 mL de etanol absoluto ao Tampão de Lavagem antes do primeiro uso.

1. **Para amostras de células e tecidos:** Adicionar um volume igual de etanol a 70% ao sobrenadante.

   Para amostras bacterianas: Adicionar $250\,\mu$L de etanol 100% ao sobrenadante e misturar rigorosamente (pós-formação de precipitado).

Nota: Preparar a solução de etanol a 70% utilizando estritamente água livre de RNase.

2. Agitar vigorosamente no *vortex* para dispersar qualquer precipitado formado. Transferir toda a mistura (incluindo o precipitado) para a minicoluna de centrifugação (*spin column*). Centrifugar a $12.000 \times g$ por 30 segundos e descartar o *flow-through* (efluente). Caso o volume exceda a capacidade da coluna, realizar o carregamento em etapas fracionadas.

3. Adicionar $500\,\mu$L do Tampão de Limpeza à minicoluna e centrifugar a $12.000 \times g$ por 30 segundos. Descartar o *flow-through*.

4. **(Opcional) Digestão *on-column* para remoção de DNA genômico:** Adicionar $80\ \mu$L da solução de trabalho de DNase I [preparo: misturar $70\ \mu$L de Tampão de Reação + $10\ \mu$L (30 U) de DNase I em um tubo livre de RNase] diretamente sobre o centro da membrana da coluna. Incubar à temperatura ambiente por 15 min. Em seguida, repetir a etapa 3.
5. Adicionar $500\ \mu$L do Tampão de Lavagem e centrifugar a $12.000 \times g$ por 30 segundos. Descartar o *flow-through*.
6. Repetir a etapa 5.
7. Centrifugar a coluna vazia a $12.000 \times g$ por 2 min para eliminar completamente resíduos de etanol.
8. Transferir a minicoluna para um novo tubo livre de RNase de $1{,}5$ mL. Adicionar de 30 a $100\ \mu$L de água livre de RNase diretamente no centro da membrana. Incubar em repouso à temperatura ambiente por 1 min.
9. Centrifugar a $12.000 \times g$ por 2 min para eluir o RNA total.
10. Armazenar o RNA isolado a $-80\ ^{\circ}$C.

Recomendações e Avisos Críticos

- Certificar-se de que o β-mercaptoetanol foi adicionado ao tampão BB4 antes do uso.
- Certificar-se de que o etanol absoluto foi adicionado ao tampão WB4.
- Salvo indicação expressa em contrário, todas as etapas de centrifugação devem ser conduzidas à temperatura ambiente.

Apenas para uso em pesquisa, não para diagnóstico clínico.

Contatos:

- **Website:** www.genexplore.com.br
- **E-mail:** suporte@genexplore.com.br
- **Importado por:** Genexplore, Comércio, Importação e Exportação Ltda

  CNPJ: 62.359.822/0001-10 / I.E: 155.425.101.110

  Av: Primeiro de Maio 379 – sala 04 – Ribeirão Preto – SP – 14030-390