



Blut RNA Mini Kit

Datenblatt

Artikel-Nr. BS 77.611.0010 10 Präparationen
Artikel-Nr. BS 77.611.0050 50 Präparationen
Artikel-Nr. BS 77.611.0250 250 Präparationen

(Nur für Forschung und *in vitro*-Anwendungen)

Chargen-Nr.:

Mindestens haltbar bis:

Aussehen:

Farbe:

Bio&SELL	E-Mail: info@bio-sell.de Internet: www.bio-sell.de	Fon : +49 (0) 9128 – 724 32 32 Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33
---------------------	--	--

Lohweg 27
90537 Feucht bei Nürnberg

Blut RNA Mini Kit

Beschreibung

Säulchen basierte Extraktion von Gesamt-RNA aus 0,5 – 1 ml Vollblut.

Kit-Komponenten

(Lagerung: Puffer FMC bei 4 °C, restliche Komponenten bei Raumtemperatur)

	10 Aufreinigungen	50 Aufreinigungen	250 Aufreinigungen
Buffer FMC	200 ml (ready-to-use)	30 ml (konzentriert)	5 x 30 ml (konzentriert)
Lysispuffer SM	8 ml	40 ml	160 ml
Waschpuffer IT	3 ml (Endvolumen 6 ml)	15 ml (Endvolumen 30 ml)	70 ml (Endvolumen 140 ml)
Waschpuffer MT	2 ml (Endvolumen 10 ml)	8 ml (Endvolumen 40 ml)	40 ml (Endvolumen 200 ml)
RNase-freies Wasser	1 ml	5 ml	2 x 10 ml
Zentrifugationssäule E (blau)	10	50	5 x 50
Zentrifugationssäule S (violett)	10	50	5 x 50
Sammeltubes 2,0 ml	60	6 x 50	30 x 50
Elutionstubes 1,5 ml	10	50	5 x 50

<p>Bio&SELL Lohweg 27 90537 Feucht bei Nürnberg</p>	<p>E-Mail: info@bio-sell.de Internet: www.bio-sell.de</p>	<p>Fon : +49 (0) 9128 – 724 32 32 Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33</p>
--	--	--

Blut RNA Mini Kit

Wichtige Schritte vor Beginn

- Zugabe von 96 – 99,8% Ethanol zu Waschpuffer IT und MT. Die entsprechenden Volumina je nach Kit Größe entnehmen Sie der nachfolgenden Tabelle. Gründlich mischen und Flasche stets dicht verschlossen halten.
- Zugabe von ddH₂O zu Puffer FMC. Die entsprechenden Volumina entnehmen Sie der nachfolgenden Tabelle. Mischen Sie gut und lagern Sie die Flasche bei 4 ° C

	10 Präparationen	50 Präparationen	250 Präparationen
Waschpuffer IT	3 ml 96 – 99,8% Ethanol zugeben	15 ml 96 – 99,8% Ethanol zugeben	70 ml 96 – 99,8% Ethanol zugeben
Waschpuffer MT	8 ml 96 – 99,8% Ethanol zugeben	32 ml 96 – 99,8% Ethanol zugeben	160 ml 96 – 99,8% Ethanol zugeben
Puffer FMC	Keine Zugabe erforderlich!	Beschriften Sie eine 1l-Flasche mit "Puffer FMC". Übertragen Sie das Konzentrat aus der Flasche "Konzentrierte FMC" auf die etikettierte Flasche "Puffer FMC". Fügen Sie 970 ml ddH₂O hinzu.	Beschriften Sie eine 1l-Flasche mit "Puffer FMC". Übertragen Sie das Konzentrat aus der Flasche "Konzentrierte FMC" auf die etikettierte Flasche "Puffer FMC". Fügen Sie 970 ml ddH₂O hinzu.

Blut RNA Mini Kit

- Stellen Sie sicher, dass Waschpuffer IT und Waschpuffer MT durch Zugabe von Ethanol einsatzbereit sind.
- Stellen Sie sicher, dass der Puffer FMC gemäß obiger Anweisung aus dem Konzentrat hergestellt wurde. Kühlen Sie ihn vor Verwendung auf 4°C ab.
- Alle Zentrifugationsschritte sollten bei 4°C und bei Raumtemperatur durchgeführt werden
- Verwenden Sie keine gefrorenen Blutproben

Nicht im Kit enthaltene Komponenten

- Optional: DNase I
- 15 ml Reaktionsgefäße („Falcon-Tubes“)
- ddH₂O (RNase frei)
- 1l Flasche
- 70% Ethanol
- 96 – 99,8% Ethanol
- Eis zum Kühlen der Komponenten

<p>Bio&SELL Lohweg 27 90537 Feucht bei Nürnberg</p>	<p>E-Mail: info@bio-sell.de Internet: www.bio-sell.de</p>	<p>Fon : +49 (0) 9128 – 724 32 32 Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33</p>
--	--	--

Blut RNA Mini Kit

Allgemeine Bemerkungen und Sicherheitshinweise zum Umgang mit RNA

RNA ist deutlich instabiler als DNA. Sie ist äußerst anfällig für Degradierung durch endogene RNasen im Ausgangsmaterial und durch im Labor allgegenwärtige exogene RNasen. Um bei der RNA-Präparation zufrieden stellende Ergebnisse bezüglich Qualität und Ausbeuten zu erhalten, müssen Verunreinigungen durch exogene RNasen auf ein Minimum reduziert werden. Beachten Sie hierzu die folgenden Empfehlungen:

- Während der gesamten Präparation stets Latex- oder Vinylhandschuhe tragen, um RNase-Kontaminationen insbesondere von der Hautoberfläche zu vermeiden.
- Handschuhe häufig wechseln und alle Gefäße geschlossen halten.
- Isolierte RNA stets kühlen.
- Die Präparationsdauer möglichst gering halten.
- Während der gesamten Präparation nur sterile Einmal-Polypropylengefäße benutzen (diese sind gewöhnlich RNase-frei).
- Nicht-Einweg-Plastikartikel vor Gebrauch mit 0,1 M NaOH, 1 mM EDTA und nachfolgend mit RNase-freiem Wasser spülen, um RNase-Freiheit sicherzustellen. Chloroform-resistente Plastik-artikel können alternativ mit Chloroform gespült werden.
- Alle Glaswaren sollten vor Gebrauch mit Detergenzien gereinigt, sorgfältig gespült und für mindestens 4 Stunden bei 240°C im Ofen gebacken werden. Autoklavieren allein ist nicht ausreichend zur vollständigen Inaktivierung vieler RNasen. Das Backen im Ofen hingegen stellt zusätzlich zur Inaktivierung der RNasen sicher, dass sich keine anderen Nukleinsäuren (wie z.B. Plasmid-DNA) an der Oberfläche befinden. Alternativ können Glaswaren durch vollständiges Bedecken mit 0,1% DEPC (Diethyl-Pyrocbonat) für 12 Stunden bei 37°C und nachfolgendes Autoklavieren oder Erhitzen auf 100°C für 15 Minuten zur Entfernung des restlichen DEPC gereinigt werden.
- Elektrophorese-Kammern mit Detergenzien (z.B. 0,5% SDS) reinigen und anschließend sorgfältig mit RNase-freiem Wasser und nachfolgend mit Ethanol spülen. Trocknen lassen!
- Alle Puffer und Lösungen mit DEPC-behandeltem RNase-freiem ddH₂O ansetzen.
- Den Umgang mit Bakterienkulturen, Zellkulturen oder anderen biologischen Quellen von RNasen im gleichen Labor vermeiden, in dem die RNA-Präparation durchgeführt wird.
- Getrennte Apparate, Glas- und Plastikwaren für die RNA-Isolierung und für Applikationen, bei denen RNasen freigesetzt werden können verwenden.

<p>Bio&SELL</p> <p>Lohweg 27 90537 Feucht bei Nürnberg</p>	<p>E-Mail: info@bio-sell.de Internet: www.bio-sell.de</p>	<p>Fon : +49 (0) 9128 – 724 32 32 Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33</p>
---	--	--



Blut RNA Mini Kit

Protokoll : Isolierung von Gesamt-RNA aus 0,5 ml bis 1 ml

Vollblutproben

Wichtig: Bitte beachten Sie, dass bis zu 1,0 ml Vollblut verarbeitet werden kann. Wenn die zu erwartende Menge an Leukozyten mehr als 1×10^7 ist, reduzieren Sie die Menge an Ausgangsvolumen der Blutprobe. Verwenden Sie keine gefrorenen Blutproben!

1. Transferieren Sie **0,5 – 1,0 ml frisches Vollblut in ein 15 ml Reaktionsgefäß**. Geben Sie **10 ml kalten (+4°C) Puffer FMC hinzu**. Vortexen Sie kurz.

2. Inkubieren Sie den Ansatz kurz auf Eis für 15 min. Während dieser Zeit mischen Sie 2 Mal kurz durch Vortexen. Zentrifugieren Sie den Ansatz anschließend bei $2.500 \times g$ (3.000 rpm) für 5 min bei +4°C. Entfernen Sie den Überstand vollständig.

Verwerfen Sie nicht das Pellet!

3. Das Tube verkehrt herum auf ein Papiertaschentuch stellen um den Überstand möglichst komplett zu entfernen.

Bemerkung: Spuren von Überstand haben einen Einfluss auf das weitere Reinigungsverfahren.

4. Zugabe von **5 ml Puffer FMC** zum Zellpellet. Resuspendieren Sie das Pellet vollständig durch kräftiges Schütteln (mit der Hand). Zentrifugieren Sie bei $2.500 \times g$ (3.000 rpm) für 3 min bei +4°C. Entfernen Sie den Überstand vollständig.

Verwerfen Sie nicht das Pellet!

Bio&SELL Lohweg 27 90537 Feucht bei Nürnberg	E-Mail: info@bio-sell.de Internet: www.bio-sell.de	Fon : +49 (0) 9128 – 724 32 32 Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33
---	--	--



Blut RNA Mini Kit

5. Das Tube verkehrt herum auf ein Papiertaschentuch stellen um den Überstand möglichst komplett zu entfernen.

Bemerkung: Spuren von Überstand haben einen Einfluss auf das weitere Reinigungsverfahren.

6. Geben Sie **600 µl Lysepuffer SM** zum Zellpellet. Inkubieren Sie den Ansatz für 2 min bei Raumtemperatur. Resuspendieren Sie anschließend das Zellpellet durch auf- und abpipettieren.

Bemerkung: Um die maximale RNA Ausbeute zu erreichen ist eine komplette Resuspension und Lyse des Pellets wichtig. Es sollten keinerlei Zellklumpen nach diesem Lyse-Schritt mehr erkennbar sein. Falls nötig inkubieren Sie für weitere 2 min bei Raumtemperatur.

7. Setzen Sie ein **Zentrifugationssäule E (blau)** in ein 2,0 ml Sammel tube. Transferieren Sie die lysierte Probe in die Zentrifugationssäule E. Zentrifugieren Sie bei 10.000 x g (12.000 rpm) für 2 min. Verwerfen Sie die Zentrifugationssäule E.

Verwerfen Sie nicht das Filtrat, dieses beinhaltet die RNA!

Bemerkung: Falls die Lösung nicht vollständig durch die Zentrifugationssäule gelaufen ist, zentrifugieren Sie erneut mit höherer Geschwindigkeit oder verlängern Sie die Zentrifugationszeit.

8. Setzen Sie eine **Zentrifugationssäule S (violet)** in ein 2,0 ml Sammel tube. Geben Sie das **gleiche Volumen (600 µl) an 70% Ethanol zum Filtrat aus Schritt 7**. Mischen Sie die Probe durch auf- und ab-pipettieren. Transferieren Sie **650 µl der Probe in die Zentrifugationssäule S (violet)**. Zentrifugieren Sie bei 10.000 x g (12.000 rpm) für 1 min.

Bio&SELL Lohweg 27 90537 Feucht bei Nürnberg	E-Mail: info@bio-sell.de Internet: www.bio-sell.de	Fon : +49 (0) 9128 – 724 32 32 Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33
---	--	--



Blut RNA Mini Kit

Bemerkung: Falls die Lösung nicht vollständig durch die Zentrifugationssäule gelaufen ist, zentrifugieren Sie erneut mit höherer Geschwindigkeit oder verlängern Sie die Zentrifugationszeit.

9. Verwerfen Sie das 2,0 ml Sammeltube und setzen Sie die Zentrifugationssäule S in ein neues 2,0 ml Sammeltube. Laden Sie den verbliebenen Rest der Probe auf die Zentrifugationssäule S. Zentrifugieren Sie erneut bei 10.000 x g (12.000 rpm) für 1 min.

10. Verwerfen Sie das 2,0 ml Sammeltube mit dem Filtrat und setzen Sie die Zentrifugationssäule S in ein neues 2,0 ml Sammeltube.

11. Öffnen Sie die Zentrifugationssäule S und geben Sie **500 µl Waschpuffer IT** auf die Säule. Deckel verschließen und bei 10.000 x g (12.000 rpm) für 1 min zentrifugieren. Verwerfen Sie das 2,0 ml Sammeltube mit dem Filtrat und setzen Sie die Zentrifugationssäule S in ein neues 2,0 ml Sammeltube.

12. Öffnen Sie die Zentrifugationssäule S und geben Sie **700 µl Waschpuffer MT** hinzu. Deckel verschließen und bei 10.000 x g (12.000 rpm) für 1 min zentrifugieren. Verwerfen Sie das 2,0 ml Sammeltube mit dem Filtrat und setzen Sie die Zentrifugationssäule S in ein neues 2,0 ml Sammeltube.

13. Zentrifugation bei 10.000 x g (12.000 rpm) für 3 min um alle Spuren von Ethanol zu entfernen. Verwerfen Sie das 2,0 ml Sammeltube.

Bio&SELL Lohweg 27 90537 Feucht bei Nürnberg	E-Mail: info@bio-sell.de Internet: www.bio-sell.de	Fon : +49 (0) 9128 – 724 32 32 Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33
---	--	--

Blut RNA Mini Kit

14. Überführen Sie die Zentrifugationssäule S in ein **1,5 ml Elutionstube**. Öffnen Sie vorsichtig den Deckel der Zentrifugationssäule S und geben Sie **30 – 50 µl RNase-freies Wasser** hinzu. Inkubation des Ansatzes für 1min bei Raumtemperatur.

Anschließend Zentrifugation bei 6.000 x g (8.000 rpm) für 1 min.

Bemerkung: In Abhängigkeit von der Ausbeute oder der benötigten Konzentration an Gesamt-RNA, können Sie auch mit unterschiedlichen Mengen an RNase-freiem Wasser eluieren. Ein geringeres Volumen an RNase-freiem Wasser erhöht die Konzentration der RNA und ein höheres Volumen an RNase-freiem Wasser führt zwar zu einer erhöhten Ausbeute jedoch zu einer niedrigeren Konzentration der Gesamt-RNA. Bitte beachten Sie, dass das Minimum an RNase-freies Wasser **20 µl** sein sollte.

Kalkulation der Zentrifugalkraft (relative centrifugal force, rcf) in [g], ausgehend von Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute, rpm)

$$RCF (g) = 1,19 \cdot 10^{-5} \times (rpm)^2 \times R$$

R = Radius des Rotors in cm (Achtung: Radius, nicht Durchmesser!)

Beispiel:

Berechnung der Zentrifugalkraft bei 10.000 rpm in einer Zentrifuge mit Rotor-Radius 9 cm

$$RCF = 1,19 \cdot 10^{-5} \times (10.000)^2 \times 9$$

$$RCF = 10.710$$

<p>Bio&SELL Lohweg 27 90537 Feucht bei Nürnberg</p>	<p>E-Mail: info@bio-sell.de Internet: www.bio-sell.de</p>	<p>Fon : +49 (0) 9128 – 724 32 32 Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33</p>
--	--	--

Blut RNA Mini Kit

Troubleshooting

Problem / mögliche Ursache	Bemerkungen und Vorschläge
<p>Verstopfte Zentrifugationssäule</p> <p>Ungenügender Zellaufschluss oder unvollständige Homogenisierung</p>	<p>Nach der Lyse einen zusätzlichen Zentrifugationsschritt zum Abtrennen zellulärer Bestandteile einfügen; Protokoll mit dem Überstand fortsetzen.</p> <p>Geringere Menge an Ausgangsmaterial einsetzen.</p>
<p>Niedrige Ausbeute an RNA</p> <p>Ungenügender Zellaufschluss oder unvollständige Homogenisierung</p> <p>Schlechte Elution</p>	<p>Geringere Menge an Ausgangsmaterial einsetzen. Überladen der Zentrifugationssäule reduziert die Ausbeute.</p> <p>RNase-freies Wasser stets mittig auf die Zentrifugationssäule pipettieren, selbst wenn mit niedrigen Volumina eluiert wird</p> <p>Inkubationszeit mit RNase-freiem Wasser auf bis zu 5 min verlängern oder Elutionsschritt wiederholen.</p>
<p>DNA-Kontamination</p> <p>Zu viel Ausgangsmaterial</p> <p>Falsche Lyse des Ausgangsmaterials</p>	<p>Geringere Menge an Ausgangsmaterial einsetzen.</p> <p>Im Protokoll beschriebenen Aufschlussmethoden verwenden.</p> <p>DNase-Verdau an die Elution der RNA anschließen oder DNase-Verdau nach Bindung der RNA an die Zentrifugationssäule S durchführen.</p>
<p>Gesamt-RNA degradiert</p> <p>Falscher Umgang mit dem Ausgangsmaterial oder falsche Lagerung des Ausgangsmaterial</p> <p>RNase-Kontamination der Lösungen, Gefäße usw.</p>	<p>Das Ausgangsmaterial muß frisch sein! Sicherstellen, dass das Protokoll schnell abgearbeitet wird, insbesondere die ersten Schritte.</p> <p>Sterile, RNase-freie Filtertips verwenden. Vor jeder Präparation Pipetten, Geräte und den Arbeitsplatz reinigen. Stets Handschuhe tragen.</p>
<p>Probleme mit Nachfolgeanwendungen (z.B. RT-PCR)</p> <p>Kontamination des Eluats mit Ethanol</p> <p>Kontamination des Eluats mit Salzen</p>	<p>Angegebene Zentrifugationszeiten einhalten, falls erforderlich sogar verlängern (Ethanolgeruch!)</p> <p>Zentrifugationssäulen wie im Protokoll beschrieben waschen</p> <p>Sicherstellen, dass die Waschlösungen IT und MT Raumtemperatur haben. Falls Kristalle in den Waschlösungen zu finden sind, diese durch vorsichtiges Erwärmen lösen.</p>

<p>Bio&SELL</p> <p>Lohweg 27 90537 Feucht bei Nürnberg</p>	<p>E-Mail: info@bio-sell.de Internet: www.bio-sell.de</p>	<p>Fon : +49 (0) 9128 – 724 32 32 Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33</p>
---	--	--



Blut RNA Mini Kit

Technische Daten

Alle Produkte von Bio&SELL werden umfassenden Qualitätskontrollen unterzogen. Dadurch wird gewährleistet, dass sie bei vorschriftsmäßiger Anwendung einwandfrei funktionieren. Die Komponenten jedes Bio&SELL Blut RNA Mini Kits wurden in der Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebeproben getestet und die extrahierte RNA auf dem Agilent Bioanalyzer analysiert.

Versand: bei Raumtemperatur

Lagerung: Das Bio&SELL Blut RNA Mini Kit sollte trocken und bei Raumtemperatur (14° –25°C) gelagert werden. Unter diesen Bedingungen ist es mindestens 12 Monate stabil. Vor jeder Nutzung sollten alle Komponenten Raumtemperatur haben. Kristalle, die sich eventuell während der Lieferung bzw. Lagerung gebildet haben, können durch vorsichtiges Erwärmen gelöst werden.

Sicherheitshinweis: Dieses Produkt sollte nur von Personen verwendet werden, die Routine in Laboranwendungen haben. Es sollte laborübliche Schutzkleidung wie Kittel, Handschuhe und Schutzbrillen getragen werden. Bei Kontakt mit Haut und Augen sollten die betroffenen Stellen umgehend mit Wasser gewaschen bzw. ausgespült werden.

Anwendungshinweis: In bestimmten Ländern sind einige Anwendungen, für die dieses Produkt eingesetzt werden kann, patentrechtlich geschützt. Da durch den Kauf keine Lizenzen erworben werden, kann abhängig vom Anwendungsland und der Anwendung der Erwerb entsprechender Lizenzrechte erforderlich sein.

Bio&SELL Lohweg 27 90537 Feucht bei Nürnberg	E-Mail: info@bio-sell.de Internet: www.bio-sell.de	Fon : +49 (0) 9128 – 724 32 32 Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33
---	--	--

Blut RNA Mini Kit

Weitere Produkte, die Sie interessieren könnten:

Reverse Transkription inkl. QRT-PCR (One-Step Mixe)

Bio&SELL

„One-Step RevTrans-qRT-PCR EvaGreen® No Rox“-Kit

Kombiniert die Reverse Transkription mit der, auf den Farbstoff EvaGreen® basierten, quantitativen Real-time-PCR.

Bio&SELL

„One-Step RevTrans-qRT-PCR EvaGreen® Rox“-Kit

Vereint die Reverse Transkription mit der, auf den Farbstoff EvaGreen® basierten, quantitativen Real-time-PCR und enthält zusätzlich den internen Referenzfarbstoff Rox.

Bio&SELL

„One-Step RevTrans-qRT-PCR Labeled Probes No Rox“-Kit

Kombiniert die Reverse Transkription mit einer Sonden-basierten quantitativen Real-time-PCR.

Bio&SELL

„One-Step RevTrans-qRT-PCR Labeled Probes Rox“-Kit

Vereint die Reverse Transkription mit der Sonden-basierten quantitativen Real-time-PCR und enthält zusätzlich den internen Referenzfarbstoff Rox.



**Profitieren Sie von der
Zeitersparnis und dem
geringen
Kontaminationsrisiko**

www.bio-sell.de/qrt-pcr/reverse-transkription-inkl-qrt-pcr-one-step-mixe.html

<p>Bio&SELL Lohweg 27 90537 Feucht bei Nürnberg</p>	<p>E-Mail: info@bio-sell.de Internet: www.bio-sell.de</p>	<p>Fon : +49 (0) 9128 – 724 32 32 Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33</p>
---	--	--