



RNA Mini Kit

Datenblatt

Artikel-Nr. BS 67.311.0010 10 Präparationen
Artikel-Nr. BS 67.311.0050 50 Präparationen
Artikel-Nr. BS 67.311.0250 250 Präparationen

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

Chargen-Nr.:

Mindestens haltbar bis:

Aussehen: klare Flüssigkeit

Farbe: klar

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
---	--	--

Beschreibung

Säulchen basierte Extraktion von Gesamt-RNA aus den unterschiedlichsten Ausgangsmaterialien: schnell, ohne Gestank, ertragreich, günstig, kein „shreddern“.

Kit-Komponenten (Lagerung bei Raumtemperatur)

	10 Aufreinigungen	50 Aufreinigungen	250 Aufreinigungen
Lysispuffer SM	6 ml	30 ml	125 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	2 ml	6 ml	2 x 15 ml
Zentrifugationssäule E (blau)	10	50	5 x 50
Zentrifugationssäule S (viol.)	10	50	5 x 50
Sammeltubes 2,0 ml	50	5 x 50	25 x 50
Elutionstubes 1,5 ml	10	50	5 x 50

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.

	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

- Stellen Sie sicher, dass Waschpuffer IT und Waschpuffer MT durch Zugabe von Ethanol einsatzbereit sind.
- Alle Zentrifugationsschritte sollten bei Raumtemperatur durchgeführt werden
- Vermeiden Sie das Auftauen von eingefrorenem Probenmaterial

Nicht im Kit enthaltene Komponenten

- ddH₂O
- 1,5 ml Reaktionsgefäße
- 70% Ethanol, nicht denaturiert, nicht methyliert
- 96 – 99,8% Ethanol, nicht denaturiert, nicht methyliert
- Optional (Gewebeproben):
DNase I, 80%iges Ethanol, nicht denaturiert, nicht methyliert
- Optional (Bakterienprotokoll):
Lysozym (Stammlösung 10 mg/ml, 400 U/μl)
Mutanolysin (Stammlösung 0,4 U/μl)
Lysostaphin (Stammlösung 0,4 U/μl)
80%iges Ethanol, nicht denaturiert, nicht methyliert,
TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0)
2,0 ml Reaktionsgefäße

Sicherheitsanweisungen

Bitte gehen Sie mit allen Materialien und Reagenzien, die im Kit enthalten sind vorsichtig um. **Es sollten immer Handschuhe getragen und Hautkontakt vermieden werden!**

Bei Kontakt mit Augen oder Haut sofort mit viel Wasser abspülen!

Lesen Sie sich bitte jeden Abschnitt sorgfältig durch, um Ihre eigene Sicherheit und eine reibungslose Durchführung zu garantieren. Folgen Sie allen Sicherheitshinweisen wie in dieser Broschüre erklärt, sowie auch Hinweisen und Informationen.



Für den einmaligen Gebrauch

Verwenden Sie keine Komponente ein zweites Mal!

Vorsicht!

- Trinken oder Essen der Kit-Komponenten sind strikt untersagt!
- Wenn die Pufferflaschen beschädigt oder undicht sind, tragen Sie bei der Entsorgung der Flaschen Handschuhe und eine Schutzbrille, um Verletzungen zu vermeiden. Dieses Kit kann mit potentiell infektiösen Proben verwendet werden. Daher müssen alle flüssigen Abfälle als potentiell infektiös betrachtet werden und müssen entsprechend der örtlichen Sicherheitsvorschriften behandelt und verworfen werden.
- Bitte beachten Sie die Bundes-, Landes- und örtlichen Sicherheits- und Umwelt-vorschriften. Befolgen Sie die üblichen Vorsichtsmaßnahmen für die Arbeiten mit extrahierten Nukleinsäuren. Alle Materialien und Reagenzien, die für die DNA- oder RNA-Isolierung verwendet werden, sollten frei von DNasen und RNasen sein.

<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>
--	--	--

Vorsicht!

Fügen Sie nach der Probenvorbereitung dem Abfall keine Bleiche oder sauren Bestandteile hinzu.

▶▶▶ Hinweis:

Notfallmedizinische Informationen in englischer und deutscher Sprache können 24 Stunden am Tag erhalten werden.

Telefonnummern der Vergiftungs-Informations-Zentralen:



München +49 (0)89 19240

Wien 01/406 43 43

Zürich + 41 44 251 51 51 (für die Schweiz: 145)

Für weitere Informationen fragen Sie bitte das Sicherheitsdatenblatt an.

GHS-Klassifikation

Komponente	Gefährdender Inhalt	GHS Symbol	H-Sätze	P-Sätze	EUH
Lysepuffer SM	Guanidinium-thiocyanat 25-50%	 Gefahr	302, 314, 412	101, 102, 103, 260, 303 + 361 + 353, 305 + 351 + 338, 310, 405, 501	032
Waschpuffer IT	Guanidinium-thiocyanat 50-100%	 Gefahr	302, 314, 412	101, 102, 103, 260, 303 + 361 + 353, 305 + 351 + 338, 310, 405, 501	

▶▶▶ **Wichtig: Keine Bleiche oder säurehaltigen Lösungen direkt zum Präparationsabfall geben!**

<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>
--	--	--

H-Sätze

- 302** Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
- 314** Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden
- 412** Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung

P-Sätze

- 101** Ist ärztlicher Rat erforderlich, Verpackung oder Kennzeichnungsetikett bereithalten
- 102** Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen.
- 103** Vor Gebrauch Kennzeichnungsetikett lesen.
- 260** Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol nicht einatmen.
- 310** Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt/... anrufen.
- 405** Unter Verschluss aufbewahren.
- 501** Inhalt/Behälter gemäß der lokalen/nationalen/internationalen Vorschriften der Entsorgung zuführen.
- 303 + 361 + 353** BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen [oder duschen].
- 305 + 351 + 338** BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.

EUH-Sätze

- 032** Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.

<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>
--	--	--

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

<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>
--	--	--

RNA Mini Kit

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.

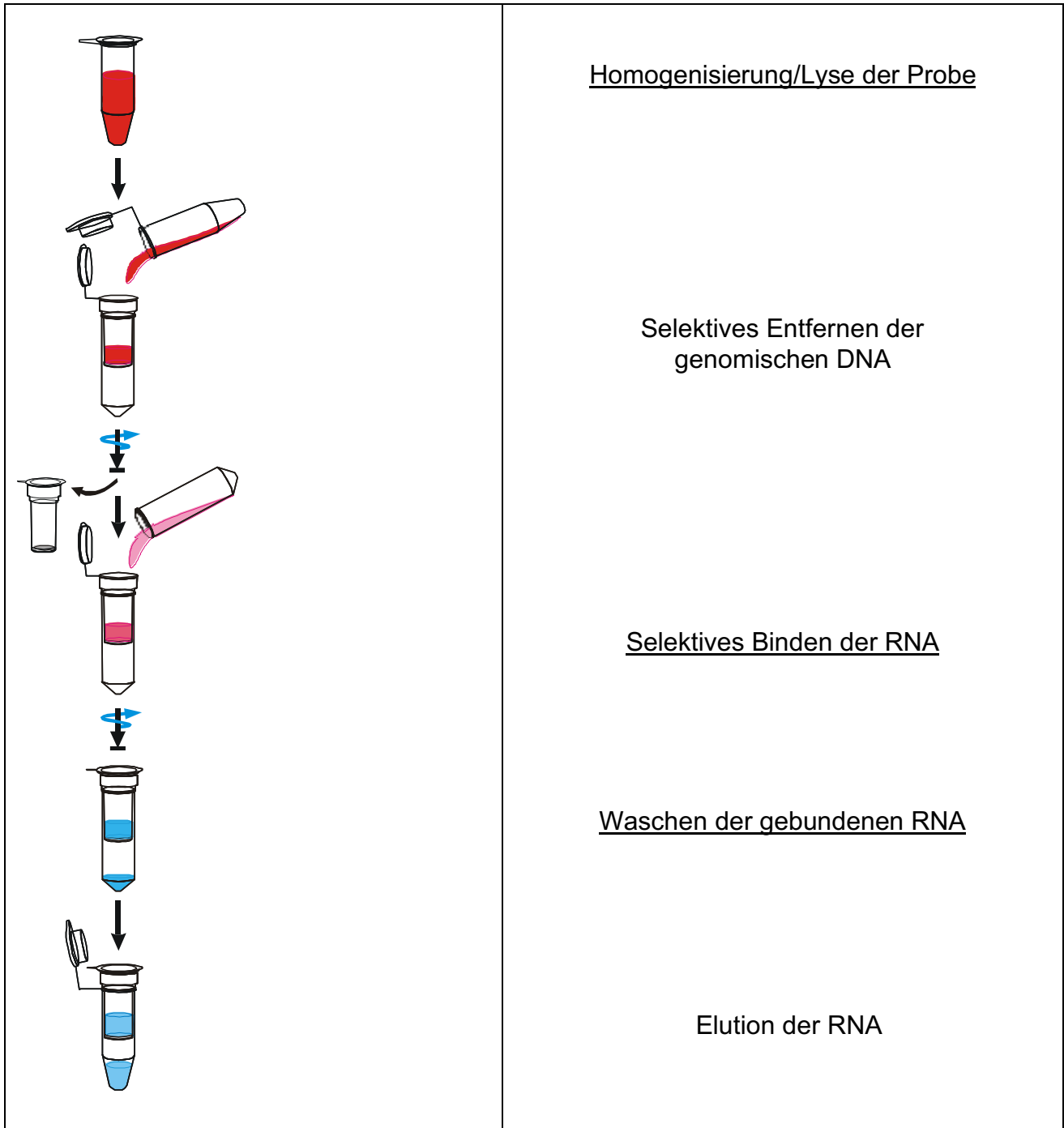
Bio&SELL

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

Funktionsweise



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

Protokoll 1: Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebeproben (bis 20 mg)

**Wichtig: Die Gesamtmenge von 20 mg Gewebe darf nicht überschritten werden!
Vermeiden Sie das Auftauen und Einfrieren Ihrer Proben!**

1. Homogenisierung des Ausgangsmaterials

Für eine maximale Ausbeute an RNA ist die vollständige Homogenisierung der Gewebeprobe sehr wichtig. Es können handelsübliche Rotor-Stator-Homogenisatoren oder Kugelmöhlen verwendet werden. Ebenso kann die Probe in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemörsert werden.

A) Homogenisierung der Gewebeprobe mit Hilfe eines handelsüblichen Homogenisators

1. Die abgewogene Menge frischer oder gefrorener Probe in ein für den Homogenisator geeignetes Reaktionsgefäß überführen.
2. **450 µl Lysepuffer SM** zugeben.
3. Probe gründlich homogenisieren.
4. Die homogenisierte Probe in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen.

Hinweis: Das Protokoll kann an dieser Stelle unterbrochen werden, um die Probe mit Lysepuffer SM für längere Zeit bei -20°C zu lagern. Für die sofortige Aufarbeitung der Probe, dem Protokoll weiter bei Schritt 2 folgen.

B) Homogenisierung der Gewebeprobe in flüssigem Stickstoff

1. Flüssigen Stickstoff zu der abgewogenen Menge frischer oder gefrorener Probe geben und das Material mit Mörser und Pistill zu einem feinen Puder mahlen.
2. Den Puder in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen. **Achtung: Die Probe darf nicht auftauen!**
3. **450 µl Lysepuffer SM** zugeben und die Probe bis zur möglichst vollständigen Lyse für einige Zeit unter ständigem Schütteln inkubieren.

<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>
--	--	--

Hinweis: Das Protokoll kann an dieser Stelle unterbrochen werden, um die Probe mit Lysepuffer SM für längere Zeit bei -20°C zu lagern. Für die sofortige Aufarbeitung der Probe, dem Protokoll weiter bei Schritt 2 folgen.

2. Klären der Probe

Bei maximaler Geschwindigkeit für 1 min zentrifugieren, um nicht-lysiertes Material zu entfernen. Eine **Zentrifugationssäule E** in ein **2,0 ml Sammeltube** stellen und den Überstand auf die Säule überführen. Deckel schließen. Bei 11.000 x g (~11.000 rpm) für 2 min zentrifugieren. Zentrifugationssäule E verwerfen. **Verwerfen Sie nicht das Filtrat, da dieses die RNA enthält!**

Hinweis: Falls die Lösung nicht vollständig durch die Membran zentrifugiert wurde, nochmals bei höherer Geschwindigkeit zentrifugieren oder die Zentrifugationszeit verlängern.

3. Binden der Probe

Eine **Zentrifugationssäule S** in ein neues **2,0 ml Sammeltube** stellen. Das gleiche Volumen (ca. 400 µl) **70% Ethanol zu dem Filtrat von Schritt 2 geben**. Probe durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gründlich mischen und die gesamte Lösung auf die Säule geben. Deckel verschließen und bei 11.000 x g (~11.000 rpm) für 2 min zentrifugieren.

Hinweis: Falls die Lösung nicht vollständig durch die Membran zentrifugiert wurde, nochmals bei höherer Geschwindigkeit zentrifugieren oder die Zentrifugationszeit verlängern.

Das 2,0 ml Sammeltube mit dem Filtrat verwerfen und die Zentrifugationssäule S in ein neues **2,0 ml Sammeltube** stellen.

<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>
--	--	--

4. Waschen der Probe I

500 µl Waschpuffer IT auf die Säule geben, diese verschließen und bei 11.000 x g (~11.000 rpm) für 1 min zentrifugieren. Das 2,0 ml Sammeltube mit dem Filtrat verwerfen und die Zentrifugationssäule S in ein neues **2,0 ml Sammeltube** stellen.

5. Waschen der Probe II

700 µl Waschpuffer MT auf die Säule geben, diese verschließen und bei 11.000 x g (~11.000 rpm) für 1 min zentrifugieren. Das 2,0 ml Sammeltube mit dem Filtrat verwerfen und die Zentrifugationssäule S in ein neues **2,0 ml Sammeltube** stellen.

Hinweis: Abhängig vom Probenmaterial kann ein zusätzlicher Waschschrift mit 700 µl 80%igem Ethanol die Reinheit der isolierten RNA erhöhen.

6. Trocknen der Säule

Bei 11.000 x g (~11.000 rpm) für 2 min zentrifugieren, um alle Reste von Ethanol zu entfernen. Das 2,0 ml Sammeltube verwerfen und die Zentrifugationssäule S in ein **1,5 ml Elutionstube** stellen.

7. Elution der RNA

Den Deckel der Zentrifugationssäule S vorsichtig öffnen und **30 – 80 µl RNase-freies Wasser** auf die Mitte der Säule geben. Bei Raumtemperatur für 1 min inkubieren, dann bei 11.000 x g (~11.000 rpm) für 1 min zentrifugieren. Das Eluat enthält die gereinigte RNA.

Hinweis: Die RNA kann auch mit geringeren oder mit höheren Volumina an RNase-freiem Wasser eluiert werden als oben angegeben. Bei geringeren Volumina an RNase-freiem Wasser erhöht sich die Endkonzentration der RNA, während sich bei höheren Volumina an RNase-freiem Wasser die Ausbeute erhöht, jedoch die Endkonzentration der RNA reduziert. Das minimale Elutionsvolumen sollte 20 µl nicht unterschreiten!

<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>
---	--	--

Protokoll 2: Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen (5 x 10⁶ Zellen)

Wichtig: Die Gesamtmenge von 5 x 10⁶ Zellen darf nicht überschritten werden!

1. Lyse der Zellen

400 µl Lysepuffer SM zu den abzentrifugierten Zellen geben. Bei Raumtemperatur für 2 min inkubieren. Das Zellpellet durch Auf- und Abpipettieren vollständig resuspendieren. Die Probe für weitere 3 min bei Raumtemperatur inkubieren.

Hinweis: Für eine maximale Ausbeute an RNA ist der vollständige Aufschluss der Zellen sehr wichtig. Nach der Lyse sollten deshalb keine Zellklumpen mehr sichtbar sein.

2. Klären der Probe

Eine **Zentrifugationssäule E** in ein **2,0 ml Sammeltube** stellen und die lysierte Probe auf die Säule überführen. Deckel verschließen und bei 11.000 x g (~11.000 rpm) für 2 min zentrifugieren. Zentrifugationssäule E verwerfen. **Verwerfen Sie nicht das Filtrat, da dieses die RNA enthält!**

Hinweis: Falls die Lösung nicht vollständig durch die Membran zentrifugiert wurde, nochmals bei höherer Geschwindigkeit zentrifugieren oder die Zentrifugationszeit verlängern.

<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>
--	--	--

3. Binden der Probe

Eine **Zentrifugationssäule S** in ein neues 2,0 ml Sammeltube stellen. Das gleiche Volumen (ca. 400 µl) **70% Ethanol** zu dem Filtrat von Schritt 2 geben. Probe durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gründlich mischen und die gesamte Lösung auf die Säule geben. Deckel verschließen und bei 11.000 x g (~11.000 rpm) für 2 min zentrifugieren.

Hinweis: Falls die Lösung nicht vollständig durch die Membran zentrifugiert wurde, nochmals bei höherer Geschwindigkeit zentrifugieren oder die Zentrifugationszeit verlängern.

Das 2,0 ml Sammeltube mit dem Filtrat verwerfen und die Zentrifugationssäule S in ein neues **2,0 ml Sammeltube** stellen.

4. Waschen der Probe I

500 µl Waschpuffer IT auf die Säule geben, diese verschließen und bei 11.000 x g (~11.000 rpm) für 1 min zentrifugieren. Das 2,0 ml Sammeltube mit dem Filtrat verwerfen und die Zentrifugationssäule S in ein neues **2,0 ml Sammeltube** stellen.

5. Waschen der Probe II

700 µl Waschpuffer MT auf die Säule geben, diese verschließen und bei 11.000 x g (~11.000 rpm) für 1 min zentrifugieren. Das 2,0 ml Sammeltube mit dem Filtrat verwerfen und die Zentrifugationssäule S in ein neues **2,0 ml Sammeltube** stellen.

Hinweis: Abhängig vom Probenmaterial kann ein zusätzlicher Waschschrift mit 700 µl 80%igem Ethanol die Reinheit der isolierten RNA erhöhen.

6. Trocknen der Säule

Bei 11.000 x g (~11.000 rpm) für 3 min zentrifugieren, um alle Reste von Ethanol zu entfernen. Das 2,0 ml Sammeltube verwerfen und die Zentrifugationssäule S in ein **1,5 ml Elutionstube** stellen.

<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>
--	--	--

7. Elution der RNA

Den Deckel der Zentrifugationssäule S vorsichtig öffnen und **30 – 80 µl RNase-freies Wasser** auf die Mitte der Säule geben. Bei Raumtemperatur für 1 min inkubieren, dann bei 11.000 x g (~11.000 rpm) für 1 min zentrifugieren. Das Eluat enthält die gereinigte RNA.

Hinweis: Die RNA kann auch mit geringeren oder mit höheren Volumina an RNase-freiem Wasser eluiert werden als oben angegeben. Bei geringeren Volumina an RNase-freiem Wasser erhöht sich die Endkonzentration der RNA, während sich bei höheren Volumina an RNase-freiem Wasser die Ausbeute erhöht, jedoch die Endkonzentration der RNA reduziert.

Das minimale Elutionsvolumen sollte 20 µl nicht unterschreiten!

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
---	--	--

Protokoll 3: Isolierung von Gesamt-RNA aus Bakterien-Zellen

(bis 1 x 10⁹ Zellen)

Wichtig: Eine Vorinkubation der Bakterienzellen mit Lysozym oder ähnlichen Enzymen wird empfohlen. Die Gesamtmenge von 1 x 10⁹ Zellen darf nicht überschritten werden!

- Vorratslösung an Lysozym: 10 mg/ml in Wasser; aliquotiert bei -20°C aufbewahren
- **Vor Arbeitsbeginn TE-Puffer vorbereiten (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0)**

1. Vorbereiten der Zellen und Prä-Lyse

Bakterienzellen **in ein 2,0 ml Reaktionsgefäß geben**. Bei für die Zellen geeigneten Reaktionsbedingungen zentrifugieren z.B. 3.000 x g für 10 min. Überstand möglichst vollständig abnehmen. Zellpellet in **100 µl TE-Puffer** resuspendieren.

A) **Gram(-)-Bakterien:**

20 µl der 10 mg/ml Lysozym Vorratslösung zugeben. Mehrmals Auf- und Abpipettieren. Die Lösung sollte klar oder viskös werden.

Hinweis: Obwohl Gram-negative Bakterien keinen Prä-Lyse-Schritt benötigen, kann der Einsatz von Lysozym die Lyse-Effizienz erhöhen.

B) **Gram(+)-Bakterien:**

20 µl der 10 mg/ml Lysozym Vorratslösung **und/oder 5 µl Mutanolysin (0,4 U/µl)** zugeben und bei 37 °C für 30 Minuten unter kontinuierlichem Schütteln inkubieren. Inkubieren, bis die Lösung klar oder viskös wird.

Hinweis: Lysozym und Mutanolysin können zusammen eingesetzt werden und erhöhen dann in vielen Fällen die Lyse-Effizienz

C) **Staphylokokken: 10 µl Lysostaphin (0,4 U/µl)** zugeben und bei 37 °C für 30 Minuten unter kontinuierlichem Schütteln inkubieren.

<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>
--	--	--

Hinweis: Je nach verwendetem Bakterienstamm müssen unter Umständen die Menge an Lysozym und die nötige Inkubationszeit angepasst werden. Beachten Sie hierzu auch die Empfehlungen des Lysozym-Herstellers. Wichtig zur erfolgreichen RNA-Isolierung ist die komplette Zerstörung der bakteriellen Zellwand.

2. Lyse der Zellen

450 µl Lysepuffer SM zu der Enzym behandelten Probe geben. Gründlich vortexen oder mehrmals Auf- und Abpipettieren. Für 3 min bei Raumtemperatur inkubieren.

Hinweis: Für eine maximale Ausbeute an RNA ist der vollständige Aufschluss der Zellen sehr wichtig. Nach der Lyse sollten deshalb keine Zellklumpen mehr sichtbar sein.

3. Klären der Probe

Eine **Zentrifugationssäule E** in ein **2,0 ml Sammeltube** stellen und die lysierte Probe auf die Säule überführen. Deckel verschließen und bei 11.000 x g (~11.000 rpm) für 2 min zentrifugieren. Zentrifugationssäule E verwerfen. **Verwerfen Sie nicht das Filtrat, da dieses die RNA enthält!**

Hinweis: Falls die Lösung nicht vollständig durch die Membran zentrifugiert wurde, nochmals bei höherer Geschwindigkeit zentrifugieren oder die Zentrifugationszeit verlängern.

4. Binden der Probe

Eine **Zentrifugationssäule S** in ein neues 2,0 ml Sammeltube stellen. Das gleiche Volumen (ca. 600 µl) **70% Ethanol** zu dem Filtrat von Schritt 3 geben. Probe durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gründlich mischen und **650 µl** der Lösung auf die Säule geben. Deckel verschließen und bei 11.000 x g (~11.000 rpm) für 2 min zentrifugieren. Das 2,0 ml Sammeltube mit dem Filtrat verwerfen und die **Zentrifugationssäule S in ein neues 2,0 ml Sammeltube** stellen. Die restliche Probe auf die Säule überführen und nochmals bei 11.000 x g (~11.000 rpm) für 1 min zentrifugieren.

<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>
---	--	--

Hinweis: Falls die Lösung nicht vollständig durch die Membran zentrifugiert wurde, nochmals bei höherer Geschwindigkeit zentrifugieren oder die Zentrifugationszeit verlängern.

Das 2,0 ml Sammeltube mit dem Filtrat verwerfen und die Zentrifugationssäule S in ein neues **2,0 ml Sammeltube** stellen.

5. Waschen der Probe I

500 µl Waschpuffer IT auf die Säule geben, diese verschließen und bei 11.000 x g (~11.000 rpm) für 1 min zentrifugieren. Das 2,0 ml Sammeltube mit dem Filtrat verwerfen und die Zentrifugationssäule S in ein neues **2,0 ml Sammeltube** stellen.

6. Waschen der Probe II

700 µl Waschpuffer MT auf die Säule geben, diese verschließen und bei 11.000 x g (~11.000 rpm) für 1 min zentrifugieren. Das 2,0 ml Sammeltube mit dem Filtrat verwerfen und die Zentrifugationssäule S in ein neues **2,0 ml Sammeltube** stellen.

Hinweis: Abhängig vom Probenmaterial kann ein zusätzlicher Waschschrift mit 700 µl 80%igem Ethanol die Reinheit der isolierten RNA erhöhen.

7. Trocknen der Säule

Bei 11.000 x g (~11.000 rpm) für 2 min zentrifugieren, um alle Reste von Ethanol zu entfernen. Das 2,0 ml Sammeltube verwerfen und die Zentrifugationssäule S in ein **1,5 ml Elutionstube** stellen.

8. Elution der RNA

Den Deckel der Zentrifugationssäule R vorsichtig öffnen und **30 – 80 µl RNase-freies Wasser** auf die Mitte der Säule geben. Bei Raumtemperatur für 1 min inkubieren, dann bei 11.000 x g (11.000 rpm) für 1 min zentrifugieren. Das Eluat enthält die gereinigte RNA.

<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>
--	--	--



RNA Mini Kit

Hinweis: Die RNA kann auch mit geringeren oder mit höheren Volumina an RNase-freiem Wasser eluiert werden als oben angegeben. Bei geringeren Volumina an RNase-freiem Wasser erhöht sich die Endkonzentration der RNA, während sich bei höheren Volumina an RNase-freiem Wasser die Ausbeute erhöht, jedoch die Endkonzentration der RNA reduziert. Das minimale Elutionsvolumen sollte 20 µl nicht unterschreiten!

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
---	--	--

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</p> <p>Ungenügender Zellaufschluss oder unvollständige Homogenisierung</p> <p>Schlechte Elution</p>	<p>Geringere Menge an Ausgangsmaterial einsetzen.</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>
---	--	--

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

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

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

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

$$\text{RCF} = 10.710$$

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

Technische Daten

Alle Produkte von Bio&SELL GmbH werden umfassenden Qualitätskontrollen unterzogen. Dadurch wird gewährleistet, dass sie bei vorschriftsmäßiger Anwendung einwandfrei funktionieren. Die Komponenten jedes Bio&SELL RNA Mini Kit 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 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.

<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>
---	--	--

Weitere Produkte, die Sie interessieren könnten:

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

Bio&SELL

„RevTrans QPCR One-Step EvaGreen® No Rox“-Kit

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

Bio&SELL

„RevTrans QPCR One-Step 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

„RevTrans QPCR One-Step Labeled Probes No Rox“-Kit

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

Bio&SELL

„RevTrans QPCR One-Step 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**

Bio&SELL für effektives Forschen

<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>
--	--	--