



RNA Micro Kit

Datenblatt

Artikel-Nr. BS 77.411.0010 10 Präparationen
Artikel-Nr. BS 77.411.0050 50 Präparationen
Artikel-Nr. BS 77.411.0250 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

Beschreibung

Säulchen basierte Extraktion von micro RNAs (20-25 Nukleotide) aus den unterschiedlichsten Ausgangsmaterialien.

Kit-Komponenten

	10 Präparationen	50 Präparationen	250 Präparationen
Lysepuffer 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)
Bindepuffer TSC	6 ml	30 ml	125 ml
RNase-freies Wasser	2 ml	6 ml	2 x 15 ml
Zentrifugationssäule E (blau)	10	50	5 x 50
Zentrifugationssäule S (violett)	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

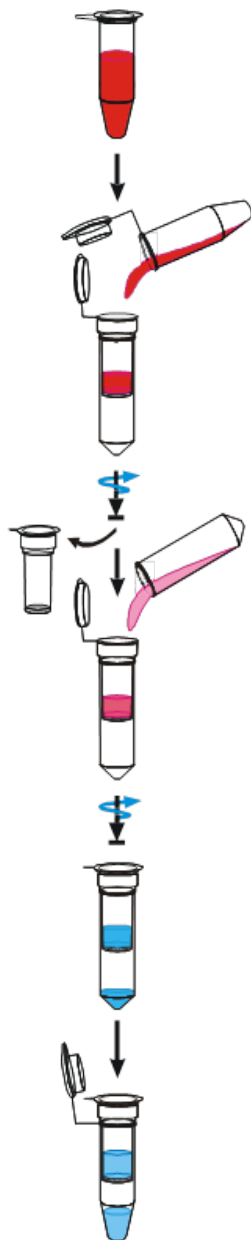
- Alle Zentrifugationsschritte sollten bei Raumtemperatur durchgeführt werden
- Vermeiden Sie das Auftauen von eingefrorenem Probenmaterial

Nicht im Kit enthaltene Komponenten

- Optional: DNase I
- Optional: Lysozym
- Optional: TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0)
- ddH₂O
- Reaktionsgefäße
- 96 – 99,8% Ethanol

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



Homogenisierung/Lyse der Probe

Selektives Entfernen der genomischen DNA mit Zentrifugationssäule E (blau)

Selektives Binden der RNA und kleiner RNA-Moleküle an Zentrifugationssäule S (violett)

Waschen der gebundenen RNA

Elution der RNA

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

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

RNA Micro Kit

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.





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

GHS-Klassifikation

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

H-Sätze

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

<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 Micro Kit

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.

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 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>
--	--	--

RNA Micro Kit

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 (blau)** in ein **2,0 ml Sammeltube** stellen und den Überstand auf die Säule überführen. Deckel schließen. Bei 10.000 x g (12.000 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 (violett)** in ein neues **2,0 ml Sammeltube** stellen. Das gleiche Volumen (ca. 400 µl) **Bindepuffer TSC** 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 10.000 x g (12.000 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>
--	--	--



RNA Micro Kit

4. Waschen der Probe I

500 µl Waschpuffer IT auf die Säule geben, diese verschließen und bei 10.000 x g (12.000 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 10.000 x g (12.000 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. Trocknen der Säule

Bei 10.000 x g (12.000 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 6.000 x g (8.000 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
---	--	--



RNA Micro Kit

Protokoll 2:

Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen (5×10^6 Zellen)

Wichtig: Die Gesamtmenge von 5×10^6 Zellen darf nicht überschritten werden!

1. Lyse der Zellen

400 μ l 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 (blau)** in ein **2,0 ml Sammeltube** stellen und die lysierte Probe auf die Säule überführen. Deckel verschließen und bei $10.000 \times g$ (12.000 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.

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
---	--	--



RNA Micro Kit

3. Binden der Probe

Eine **Zentrifugationssäule S (violett)** in ein neues **2,0 ml Sammeltube** stellen. Das gleiche Volumen (ca. 400 µl) **Bindepuffer TSC** 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 10.000 x g (12.000 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 10.000 x g (12.000 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 10.000 x g (12.000 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. Trocknen der Säule

Bei 10.000 x g (12.000 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.

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
---	--	--



RNA Micro Kit

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 6.000 x g (8.000 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 1×10^9 Zellen)

Wichtig: Eine Vorinkubation der Bakterienzellen mit Lysozym oder ähnlichen Enzymen wird empfohlen. Die Gesamtmenge von 1×10^9 Zellen darf nicht überschritten werden!

- Vorratslösung an Lysozym für gram(-)-Bakterien:
20 mg/ml in Wasser; aliquotiert bei -20°C aufbewahren
- Vorratslösung an Lysozym für gram(+)-Bakterien:
50 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

Bakterienzellen bei $5.000 \times g$ (7.500 rpm) für 2 – 5 min abzentrifugieren. Überstand möglichst vollständig abnehmen.

A) Gram(-)-Bakterien: Zellpellet in **100 μl TE-Puffer** resuspendieren und **2 μl der 20 mg/ml Lysozym** Vorratslösung zugeben. Mehrmals Auf- und Abpipettieren. Die Lösung sollte klar oder viskös werden.

B) Gram(+)-Bakterien: Zellpellet in **100 μl TE-Puffer** resuspendieren und **6 μl der 50 mg/ml Lysozym** Vorratslösung zugeben. Mehrmals Auf- und Abpipettieren. Inkubieren, bis die Lösung klar oder viskös wird.

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.

<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 Micro Kit

2. Lyse der Zellen

450 µl Lysepuffer SM zu der 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 (blau)** in ein **2,0 ml Sammeltube** stellen und die lysierte Probe auf die Säule überführen. Deckel verschließen und bei 10.000 x g (12.000 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 (violett)** in ein neues **2,0 ml Sammeltube** stellen. Das gleiche Volumen (ca. 600 µl) **Bindepuffer TSC** zu dem Filtrat von Schritt 2 geben. Probe durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gründlich mischen und 650 µl der Lösung auf die Säule geben. Deckel verschließen und bei 10.000 x g (12.000 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 10.000 x g (12.000 rpm) für 1 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.

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
---	--	--



RNA Micro Kit

5. Waschen der Probe I

500 µl Waschpuffer IT auf die Säule geben, diese verschließen und bei 10.000 x g (12.000 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 10.000 x g (12.000 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.

7. Trocknen der Säule

Bei 10.000 x g (12.000 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.

8. 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 6.000 x g (8.000 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
---	--	--

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>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 R 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 Nachfolganwendungen (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>Sicherstellen, dass die Waschlösungen IT und MT Raumtemperatur haben. Falls Kristalle in den Waschlösungen zu finden sind, diese durch vorsichtiges Erwärmen lösen.</p>



RNA Micro Kit

**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



RNA Micro 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 RNA micro Kit wurden in der Isolierung von RNA aus Gewebeproben getestet und die extrahierte RNA auf dem Agilent Bioanalyser analysiert.

Versand: bei Raumtemperatur

Lagerung: Das Bio&SELL RNA micro 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
---	--	--