

**Protokol pro izolaci celkové RNA z kultivovaných buček**  
**pomocí kitu NucleoSpin® RNA II**

**Obsah kitu:**

NucleoSpin® RNA II				
	10 preps	20 preps	50 preps	250 preps
Cat. No.	740955.10	740955.20	740955.50	740955.250
Lysis Buffer RA1	10 ml	10 ml	25 ml	125 ml
Wash Buffer RA2	15 ml	15 ml	15 ml	80 ml
Wash Buffer RA3 Concentrate*	5 ml	5 ml	12.5 ml	3 × 25 ml
Membrane Desalting Buffer MDB	10 ml	10 ml	25 ml	125 ml
Reaction Buffer for rDNase	3 ml	3 ml	7 ml	35 ml
rDNase, RNase-free (lyophilized)*	1 vial (size C)	1 vial (size C)	1 vial (size D)	5 vials (size D)
RNase-free Water	5 ml	5 ml	15 ml	65 ml
NucleoSpin® Filter Columns (violet ring)	10	20	50	250
NucleoSpin® RNA II Columns (light blue ring - plus Collection Tube)	10	20	50	250
Collection Tubes (2 ml)	30	60	150	750
Collection Tubes (1.5 ml)	10	20	50	250
User Manual	1	1	1	1

### **Před prvním použitím:**

- ✓ **rDNáza:** rozpustit enzym ve stanoveném objemu vody a opatrně zamíchat.  
rDNáza je vysoce citlivá k mechanické denaturaci – nemíchat pipetou!  
Připravené alikvoty jsou uloženy při teplotě  $-18^{\circ}\text{C}$ . OPakovaně nerozmrazovat.
  
- ✓ **pufir RA3:** přidat 96 – 100% ethanolu ke koncentrovanému pufiru RA3.
  
- ✓ **pufir RA1:** přidat merkaptoethanol (1:100)

## Izolace RNA:

- 1)** Adherentně rostoucí buňky (maximálně  $5 \times 10^6$ ) jsou lyzovány přímo na misce přidáním pufru RA1 (**350  $\mu$ l pufru RA1 s 3.5  $\mu$ l merkaptoethanolu**).
- 2)** Pro snížení viskozity a pročištění buněčného lyzátu jsou lyzáty čištěny pomocí fialových **NucleoSpin® Filter Columns**, umístěných do epp. zkumavek (1,5 ml) . Naneste buněčný lyzát a centrifugujte **1 min při 11000 x g**.
- 3)** Přidejte k homogenizovanému lyzátu **350  $\mu$ l ethanolu (70%)** a důkladně promíchejte opakovaným pipetováním (5 X). Případné precipitáty by měly být odstraněny.
- 4)** Naneste směs na modré NucleoSpin® RNA II kolonky umístěné ve sběracích zkumavkách.
- 5)** Centrifugujte **30 s při 11000 x g**. Vyprázdněte sběrnou zkumavku.
- 6)** Pro odstranění solí naneste na kolonu 350  $\mu$ l MDB (Membrane Desalting Buffer) a centrifugujte při **11,000 x g po 1 min** aby byla membrána vysušena. Tento krok zvýší následnou účinnost rDNázy.
- 7)** Připravte reakční směs DNázy – pro každou kolonu smíchejte 10  $\mu$ l rDNázy a 90  $\mu$ l reakčního pufru pro DNázu a protřepete.
- 8)** Pro odstranění kontaminující DNA naneste na kolonu 95  $\mu$ l reakční směsi DNázy a nechte působit 15 min při pokojové teplotě.
- 9)** Pro promytí membrány a inaktivaci DNázy přidejte **200  $\mu$ l pufru RA2** a centrifugujte **30 s při 11000 x g**. Vezměte novou sběrnou zkumavku.
- 10)** Pro promytí membrány přidejte **600  $\mu$ l pufru RA3** a centrifugujte **30 s při 11000 x g**.

- 11)** Pro promytí a vysušení membrány přidejte **250 µl pufru RA3** a centrifugujte **2 min při 11000 x g**.
- 12)** Vložte kolonu do čisté epp. zkumavky bez nukleáz (1,5 ml) a přidejte pro eluci RNA 60 µl vody bez RNáz (supplied) a centrifugujte **1 min při 11000 x g**. Pro vyšší koncentrace RNA lze použít objem 40 µl.

Izolovaná RNA je dále skladována při teplotě – 80°C. Koncentrace a přibližná čistota jsou stanoveny na spektrofotometru Nanodrop.