

Tartalom

1. DNS izolálás	2
1.1. Totál DNS kivonása fagyasztott szövetből (Qiagen)	2
Megjegyzések: Minden centrifugálási lépés szobahőn (15-25 °C), keverés: „pulse-vortexing” 5-10 mp-ig	2
1.2. Totál DNS kivonása vérből (EDTA-s cső) (Qiagen)	3
Szükséges anyagok:	3
Megjegyzések: minden CF lépés szobahőn (15-25 °C), keverés: „pulse-vortexing” 5-10 mp-ig.	3
Protokoll:	3
1.3. DNS kivonása FFPE mintából (formalin fixált, paraffinba ágyazott szövet) (Qiagen)	4
Protokoll:	4
2. RNS izolálás:	6
2.1. Totál RNS kivonása humán fagyasztott szövetből és sejtekből (Qiagen)	6
Izolálás szövetből:	6
Izolálás sejtekből:	7
2.2. RNS kivonása vérből (EDTA-s cső, buffy coat vagy RNALater) (Ambion)	7
2.3. RNS kivonása FFPE szövetből (Qiagen)	10
3. Szimultán izolálások (DNS/ RNS/ fehérje)	13
3.1. RNS/ DNS kivonása vérből (Qiagen)	13
3.2. DNS/ RNS izolálása FFPE szövetből (Qiagen)	16
Előkészületek:	16
Protokoll:	16
Totál RNS izolálás	16
Genomi DNS izolálás	17
Homogenizálás:	19
RNS izolálás:	19
Fehérje izolálás:	20
Genomi DNS izolálás:	21
Fehérje kivonás előkészítése Western Blothoz	21

1. DNS izolálás

1.1. Totál DNS kivonása fagyasztott szövetből (Qiagen)

DNeasy Blood & Tissue Kit (50) Qiagen, Cat no: 69504

DNeasy Blood & Tissue Kit (250) Qiagen, Cat no:69506

Szükséges anyagok:

- Pipetták, pipetta hegyek, centrifugacsövek (1,5 ml vagy 2 ml)
- Keverő (vortex), mikrocentrifuga kis csövekhez, melegítőblokk
- Ethanol (96–100%)
- (Opcionális: RNase A (100 mg/ml; cat. no. 19101, nincs a kitben) Ha nem kell RNS is a mintából, hogy ne gátolja a további reakciókat (PCR-t nem befolyásolja))
- *Kiindulási anyag:* 10-15 mg szövet! 2mm²-es kocka, vagy 8mm³ térfogat
- Akkor szép, ha A260/A280 értéke 1,7-1,9 között van, az abszorbancia görbe pedig szimmetrikus és 260nm-nél tetőzik.
- Előmelegíteni a melegítőblokkot, rázó vízfürdőt, rázó (rocking) platformot 56 °C-ra
- Buffer AW1 és Buffer AW2-t etanollal (96-100%) hígítani az első használat előtt
- Buffer ATL és AL kicsapódhat, megvárni, míg feloldódik, akár betenni 56 °C-ra

Megjegyzések: Minden centrifugálási lépés szobahőn (15-25 °C), keverés: „pulse-vortexing” 5-10 mp-ig

Protokoll:

1. Max 25mg szövetet apró darabokra vágni és beletenni egy 1,5 ml-s centrifugacsőbe. Hozzáadni 180 µl Buffer ATL-t.
2. 20 µl Proteinase K-t adni hozzá. Keverés, majd 56 °C-ra tenni, amíg a szövet teljesen feloldódik. Közben-közben keveréssel segíteni a lízist (kb. 1-3h).
3. (Opcionális: Ha RNS-mentes genomi DNS kell, hozzáadni 4 µl RNase A-t (100mg/ml), keverés és állni hagyni 2 percig szobahőn)
4. Keverés 15 mp-ig.
5. 200 µl Buffer AL-t adni hozzá. Azonnal alapos keverés. Hozzáadni 200 µl etanolt (96- 100%), és megint keverés (kicsi kicsapódhat, ami nem befolyásolja a reakciót).
6. A mixet DNeasy Mini Spin oszlopra pipetázni, 2ml gyűjtőcsővel. Centrifugálás 1 perc, 8000 RPM (6000g). Átfolyó levét leönteni és gyűjtőcsövet kidobni.
7. A DNeasy Mini Spin oszlopot egy új 2ml gyűjtőcsőre áthelyezni. Hozzáadni 500 µl Buffer AW1-t. Centrifugálás 1 perc, 8000 RPM (6000g). Átfolyó levét leönteni és gyűjtőcsövet kidobni.
8. A DNeasy Mini Spin oszlopot egy új 2ml gyűjtőcsőre áthelyezni. Hozzáadni 500 µl Buffer AW2-t. Centrifugálás 3 perc, 14.000 RPM (20000 g), a DNeasy membrán megszáradásáig (etanol semmiképpen ne maradjon rajta). Átfolyó levét leönteni és

gyűjtőcsövet kidobni.

Áthelyezni a DNeasy mini spint egy 1,5 ml centrifugacsőbe, és 200 µl Buffer AE-t (NGS-hez 30 µl desztvizet) pipettázni közvetlenül a membránra. Állni hagyni 1 perc szobahőn, majd centrifugálás 1 perc, 8000 RPM (6000 g).

9. Javasolt lépés: a maximális DNS hozam kinyerésére megismételni az előző lépést egy új centrifugacsővel.

1.2. Totál DNS kivonása vérből (EDTA-s cső) (Qiagen)

DNeasy Blood & Tissue Kit (50) Qiagen, Cat no: 69504
DNeasy Blood & Tissue Kit (250) Qiagen, Cat no:69506

Szükséges anyagok:

- Pipetták, pipettahegyek, centrifugacsövek (1,5 ml vagy 2 ml)
- Feliratozni: DNeasy oszlopok, 1.5 ml-s csövek és végső tárolócsövek (DNA LoBind Tube) feliratozása
- Keverő, mikrocentrifuga kisebb centrifugacsövekhez, melegítőblokk (türkiz színű)
- Etanol (96-100%)
- (Opcionális: RNase A (100 mg/ml; cat. no. 19101, nincs a csomagban) Ha nem kell RNS is a mintából, hogy ne gátolja a későbbi reakciókat (PCR-t nem befolyásolja)
- PBS, pH 7,2 (50 mM kálium foszfát, 150 mM NaCl)
- Kiindulási anyag: 100-200 µl humán vér (lehetőleg friss)
- Minták elővétele szobahőre
- Előmelegíteni a melegítőblokkot, rázó vízfürdőt, rázó (rocking) platformot 56°C-ra
- Buffer ATL-t nem kell használni a vérből való izoláláshoz
- Buffer AW1 és Buffer AW2-t etanollal (96-100%) hígítani az első használat előtt
- Buffer AL kicsapódhat -> megvárni, míg feloldódik, akár betenni 56°C-ra

Megjegyzések: minden CF lépés szobahőn (15-25°C), keverés: „pulse-vortexing” 5-10 mp-ig.

Protokoll:

1. Sejtmag nélküli vérnél 20 µl Proteinase K-t pipettázni egy 1,5 vagy 2 ml-s tubusba. 200 µl nem megalvadott vért hozzáadni és alaposan szuszpendálni. (A protokoll max. 100 µl kiindulási vértérfogatot ír, ha ennyiből indulunk ki, adjuk még hozzá 100 µl PBS-t, hogy 220 µl végtérfogatot kapjunk. Tapasztalat alapján, ha 200 µl vérből indulunk ki, 2x olyan jó lesz a hozam is (és ez NGS- nél sokat számít), ezért a PBS elhagyható! Ha nem NGS-re kell a nukleinsav, hanem mondjuk PCR- hez, akkor nyugodtan lehet PBS-sel hígítani a 100 µl vért.)
2. (Opcionális: Ha RNS-mentes genomi DNS kell: 4 µl RNase A (100mg/ml)-t hozzáadni és

- állni hagyni 2 percig szobahőn.)
3. 200 µl Buffer AL-t adni hozzá (hozzáadott etanol nélkül!!!). Azonnal alapos keverés, vortex→homogénné, majd 56 °C, 10 perc melegítés.
 4. Rövid centrifugálás (“pulse”), hogy a kicsapódott párából megszabaduljunk
 5. 200 µl etanolt (96-100%) adni a mintához, majd alapos keverés, vortex →homogénné
 6. A mixet DNeasy Mini Spin oszlopra pipettázni, 2 ml gyűjtőcsővel. Centrifugálás 1 perc, 8000 RPM (6000 g). Átfolyó levét leönteni és gyűjtőcsövet kidobni.
 7. A DNeasy Mini Spin oszlopot egy új 2ml gyűjtőcsőre áthelyezni. Hozzáadni 500 µl Buffer AW1-t. Centrifugálás 1 perc, 8000 RPM (6000 g). Átfolyó levét leönteni és gyűjtőcsövet kidobni.
 8. A DNeasy Mini Spin oszlopot egy új 2 ml gyűjtőcsőre áthelyezni. Hozzáadni 500 µl Buffer AW2-t. CF 3 perc, 14.000 RPM (20000 g), a DNeasy membrán megszáradásáig (etanol semmiképpen ne maradjon rajta). Átfolyó levét leönteni és gyűjtőcsövet kidobni.
 9. Áthelyezni a DNeasy mini spin egy 1,5 ml centrifugacsőbe (DNA LoBind Tube), és 200 µl Buffer AE-t (NGS-hez 30 µl RNáz mentes víz!) pipettázni közvetlenül a membránra. Állni hagyni 1perc szobahőn, majd centrifugálás 1 perc, 8000 rpm (6000 g).

Tárolás: -20 °C (nem javasolt -80 °C-on)

1.3. DNS kivonása FFPE mintából (formalin fixált, paraffinba ágyazott szövet) (Qiagen)

QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50) Qiagen, Cat.no. 56404

Előkészületek:

- Xilén, 96-100% etanol
- Rakd a puffereket szobahőmérsékletre!
- Állítsd a termoblokkot 56 °C-ra!
- Ha az AL vagy az ALT puffer kicsapódott, melegítsd 70 °C-ra!
- Bizonyosodj meg róla, hogy az AW1 és AW2 pufferekhez hozzá lett adva az etanol!
- (az utolsó pillanatig maradjon a QIAamp MinElute oszlop a 4 °C-os hűtőben, hogy a minta a hideg oszlopra kerüljön!
- Ha FFPE (makro) blokk a kiindulási anyagod, az 1-2 lépéshez mikrotóm és hozzáértő segítség szükséges!

Protokoll:

1. Szike segítségével szedd le a felesleges paraffint a mintáról.
2. Vágj maximum 8 darab 5-10 µm vastag metszetet, ha a minta felszínét levegő érte, az első 2-3 metszetet ne használd fel az izoláláshoz!
3. A metszeteket azonnal tedd egy 1,5 vagy 2 ml-es centrifuga csőbe, adj 1 ml xilént a mintához. Zárd rá a kupakot és keverd erőteljesen 10 másodpercig.

4. Centrifugálás 14000 RPM, 2 perc.
5. A felülúszót pipettázd le, az üledékre vigyázva.
6. Adj 1 ml 96-100%-os etanolt az üledékhez és keverd!
7. Centrifugálás 14 000 RPM, 2 perc.
8. Pipettázd le a felülúszót a lehető legalaposabban, az üledékre vigyázva!
9. Nyisd ki a kupakot és hagyd állni 10 percig, vagy amíg a maradék etanol elpárolog szobahőmérsékleten vagy magasabb hőmérsékleten (37°C-ig)!
10. Az üledéket szuszpendáld 180 µl ATL pufferben. Adj hozzá 20 µl proteináz K-t és keverd! Hagyd állni 56°C-on 1 órán át, vagy amíg a minta teljesen fel nem oldódik. (Lehet egész éjszakán át is!)
11. Ha a melegítő blokkot használod, a mintát szobahőmérsékleten tárold a 10-es lépés után, amíg a blokk el nem éri a 90°C-ot. Hagyd állni 90°C-on 1 órán át. (pontosan betartani az időt!)
12. A 1,5 ml-es csövet centrifugálás 30 mp, 8000 RPM.
13. Ha RNS-mentes DNS-re van szükség, adj 2 µl RNáz A-t (100mg/ml) és hagyd állni 2 percig szobahőmérsékleten. Hagyd, hogy a minta lehűljön, mielőtt hozzáadod az RNáz A-t! (én ezt a lépést ki szoktam hagyni).
14. Adj a mintához 200 µl AL puffert, keverd azonnal, alaposan. Adj 200 µl 96-100%-os etanolt, keverd azonnal, alaposan! Több minta izolálása esetén előre össze lehet pipettázni a két oldatot!
15. Centrifugálás 30 mp, 8000 RPM.
16. Óvatosan pipettázd át a mintát a QIAamp MinElute oszlopra, zárd le a tetejét, anélkül hogy a széle nedvessé válna! Centrifugálás 8000 RPM, 1 perc. Helyezd az oszlopot egy tiszta 2 ml-es gyűjtőcsőbe, dobd ki a használt gyűjtőcsövet. Ha a minta nem ment át teljesen az oszlopon Centrifugálás újra magasabb fordulatszámon!
17. Óvatosan nyisd ki az oszlopot, és adj hozzá 500 µl AW1 puffert az oszlop szélének benedvesítése nélkül! Centrifugálás 8000 RPM 1 perc. Helyezd az oszlopot egy tiszta 2 ml-es gyűjtőcsőbe, dobd ki a használt gyűjtőcsövet.
18. Óvatosan nyisd ki az oszlopot, és adj hozzá 500 µl AW2 puffert az oszlop szélének benedvesítése nélkül! Centrifugálás 8000 RPM, 1 perc. Helyezd az oszlopot egy tiszta 2 ml-es gyűjtőcsőbe, dobd ki a használt gyűjtőcsövet. Ügyelj arra, hogy az oszlop ne kerüljön kontaktusba az oszlopon áthaladt folyadékkal!
19. Centrifugálás 14 000 RPM, 3 perc.
20. Helyezd az oszlopot egy tiszta 1,5 ml-es centrifugacsőbe és dobd ki a használt gyűjtőcsövet. Óvatosan nyisd ki az oszlopot, és pipettázz 20-100 µl szobahőmérsékletű ATE puffert a membrán közepére (Ha szekvenáláshoz kell a DNS, akkor 30ul-ben oldd a mintát). Hagyd állni 1 percig szobahőmérsékleten! (5 perces inkubáció esetén általában nő a kinyert DNS mennyisége - én meg szoktam várni) Centrifugálás 14 000 RPM, 2 perc. (Második eluálásra nincs szükség, az elsőben leoldódik szinte a teljes mennyiség)
21. Tárold a DNS-t -20°C alatti hőmérsékleten!

2. RNS izolálás:

2.1. Totál RNS kivonása humán fagyasztott szövetből és sejtekből (Qiagen)

RNeasy Mini Kit (50) Qiagen, Cat.no.: 74104

Előkészületek:

- A munkaterületet, kesztyűt és Eppendorf-állványokat lefújni etanollal és RNaseZap-pel. Kesztyűt a munka közben többször is lefújni, esetleg lecserélni
- golyós homogenizátor csövek + feliratozás (ahány minta - csak szövethez)
- 1,5 ml centrifugacsövek + feliratozás (ahány minta) +alkoholos filc
- RNS izoláló kit (Qiagen) (rózsaszín cső) + feliratozás
- Pipetták (1000 µl, 200 µl, 2,5 µl), hegyek
- Spatula, csipesz, Petri csésze és szike (szövethez), mérleg, vatta, papírtörölő, alkohol
- nagy lombik / mérőhenger (hulladéknak)
- Etanol hígítása (70%-ra)
- ↳ Kikeverni:
 - Mintaszámnak megfelelő mennyiségű RLT + β-ME oldat (x db * 600 µl): 1 ml RLT-hez kell 10 µl β-ME (szövethez)
 - Ha új a kit, akkor RPE pufferhez etanol (96-100%) hozzáadása (X-szel van jelölve a tubus tetején, ha már tartalmaz etanolt). 33 ml RPE (ennyi van az eredeti tubusban) + 134 ml abs. EtOH

Izolálás szövetből:

1. Minden golyós csőbe 600 µl (RLT + β-ME) keveréket tesztek.
2. A fagyasztóból kivett mintát spatulával kiszedem, szikével lemetszek 60 mg-t.
3. Mintákat a golyós homogenizátor csövekbe, majd kettesével a homogenizátorba (2 x 90 sec, speed: 4,5)
4. Felülúszót átmérjük centrifugacsőbe (többi kuka), a golyókat összegyűjtjük egy üvegedénybe. CF 3 perc, 15.000 RPM. Innen a felülúszóval dolgozom tovább.
5. Minden mintához adok 600 µl 70 %-os etanolt, közben pipettával át is keverjük.
6. Az RNS izoláló oszlopot (rózsaszín, szűrős) ráillesztjük a 2 ml gyűjtőcsőre, majd rámérünk max. 700 µl mintát. Azután CF 15 sec-ig 10 000 RPM. Az átfolyó levet kiöntjük. Mindezt megismétlem a maradék mintával. **ÚJ GYŰJTŐCSŐ!**
7. 700 µl RW1 Buffert pipetázunk az oszlopra, CF 15 sec, 10 000 RPM. Az átfolyó levet kiöntjük.
8. 500 µl (etanollal hígított) RPE Buffert pipetázunk az oszlopra. Ezután CF 15 sec, 10 000 RPM. Az átfolyó levet kiöntjük.
9. Ismét 500 µl RPE Buffert pipetázunk az oszlopokra és CF 2 percig 10 000 RPM (a szilikamembrán száradásáig). A gyűjtőcsövet kidobjuk.
10. Az oszlopot áthelyezzük új 2 ml-es gyűjtőcsőbe, CF 1 perc, max.

sebesség 11.

- a. szövet: Az oszlopot a végleges centrifugacsőbe, majd 2x30 µl Rnase Free desztillált vizet pipettázunk közvetlen a membránra (fentről belekukkantva!), kicsit állni hagyjuk, majd centrifugálás 1 perc, 10 000 RPM. Másodszorra centrifugálás 2 perc, 10 000 RPM.
- b. sejtek: Az oszlopot a végső centrifugacsőbe helyezzük, 40 µl Rnase mentes vízzel eluáljuk CF 1 perc 10 000 RPM

12. Ezzel kész az RNS, fotometráljuk és -80 C-ra tesszük.

Izolálás sejtekből:

1. Kriocsövek/ sejtszuszpendátumot tartalmazó csöveket lecentrifugáljuk, CF: 5 perc, 5000 x g, a felülúszót egy határozott mozdulattal leöntjük, a pelletnek (sejtek) a csőben kell maradnia!
2. 350 µl RLT puffert adunk a pellettez, pipettával homogénre szuszpendáljuk!
3. A teljes térfogatot rápipettázzuk a QIAshredder oszlopra, CF 2 perc, 13 ezer rpm (átfolyóban: RNS)
4. 350 µl 70%-os etanolt adunk az átfolyóhoz, alaposan szuszpendáljuk! (A többi lépés megegyezik a szöveti izolálás lépéseivel, kezd a 6. ponttal)

2.2. RNS kivonása vérből (EDTA-s cső, buffy coat vagy RNALater) (Ambion)

RiboPure Ambion by Life Technologies (PN 1928M Rev D) Cat. No: AM1928

Háttér:

- ⌘ antikoagulánssal bevont vérvételi csőből
- ⌘ Kiindulási mennyiség: 300-500 µl minta
- ⌘ Két lépése van:
 - sejtlízis guanidinium-só alapú oldattal, majd fenol/klorofom-extrakcióval RNS kivonása, kezdeti tisztítása
 - végleges tisztítás szilárd-fázis alapú extrakcióval üvegszál-alapú szűrővel/ oszloppal
- ⌘ DNáz I kezelés opcionális
- ⌘ RNS-hozam: 0,5 ml egészséges vérből 2-4 µg
- ⌘ Buffy coat-hoz is jó

RNS munkákhoz előkészület:

- ⌘ RNaseZap oldattal áttörölni a munkafelületet, pipettákat, mintatartó állványokat stb.
- ⌘ Alternatívaként 0.1 M NaOH, 1 mM EDTA oldattal is lemoshatjuk a műanyag eszközöket felületeket, amit RNáz-mentes vízzel kell leöblíteni a végén

- ⌘ Elektroforézis tankok RNáz mentesítése: detergens (pl. 0.5% SDS) öblítés, majd RNázmentes víz, majd etanol és megszárítjuk
- ⌘ Haj összefogása
- ⌘ Köpeny, kesztyű kötelező! Kesztyűt munka közben 1x-2x lecserélni
- ⌘ Minél rövidebb idő alatt elkészülni az izolálással
- ⌘ RNáz-mentes pipettahegyek és csövek használata
- ⌘ Izolált RNS-t azonnal jégre rakni (pl. amíg lemérjük/ elrakjuk, ne szobahőn legyen)

Előkészületek:

- ⌘ 56 ml 100% etanol hozzáadása a Wash Solution 2/3 Concentrate-hoz (1 hónap szobahőn, további tárolás esetén 4°C, de használat előtt szobahőre melegíteni)
- ⌘ Elution Solution megfelelő aliquot mennyiségét 75°C-ra melegíteni (mintánként 100 µl kell, de érdemes többet kimérni, mert párolog)
- ⌘ Filter Cartidge behelyezése gyűjtőcsövekbe és feliratozás
- ⌘ Még ugyanennyi gyűjtőcső feliratozása (ebbe eluálódik majd az RNS az üvegszálakról)

Protokoll:

Ha a minta RNALater-ben lett tárolva:

1. 1 min max. sebesség (>~16 000 g). A vvt-k és plazmafehérjék egy nagy barnás/ pirosas pelletet képeznek, amik a cső falára tapadhatnak, míg a felülúszó világos rózsaszín, barna vagy átlátszó lesz.
2. Felülúszó eltávolítása (pipettával vagy leöntéssel). Teljesen távolítsuk el a felülúszót!! Ami a pellet fölött van közvetlenül és zavaros, fehér csapadékos, azt is!! Ha leöntéssel távolítjuk el, akkor papírtörlőre ráfordítva, óvatos kocogtatással távolítsuk el a maradék felülúszót. Kupakban se maradjon folyadék. Ezután adjunk 800 µl Lysis Solution-t, majd 50 µl Sodium Acetate Solution-t a pallethez.

Ha nem RNALater-ben lett tárolva:

1. Néhányszor óvatosan forgassuk át a vérvételi csövet.
2. 2 ml-s centrifuga csőbe mérjük ki 300-500 µl vért és adjunk hozzá 800 µl Lysis Solution, majd 50 µl Sodium Acetate Solution-t.

Innentől már megegyeznek a lépések:

3. Erőteljes vortex, hogy a vvt-eket lizáljuk. Forgassuk át néhányszor a csövet, hogy homogén oldatot kapjunk. Az RNALater-es minták erősebb vortexelést és reszuszpendálást kívánnak.
4. 500 µl Acid-Phenol:Chloroform kivétele a vizes fázis (réteg) alól, majd adjuk a lizátumhoz, rázzuk meg erőteljesen vagy vortexeljük 30 s-ig. (Ha az 500 µl túl sok a csőbe, 250 µl is elég.)
5. 5 min szobahőn inkubálás.
6. Centri 1 min, max sebesség (>~16 000 g) a vizes és a szerves fázis szeparálása érdekében. A vizes fázis centri után lehet zavaros, de tiszta is.



7. A vizes (felső) fázis tartalmazza az RNS-t, ezt a fázist (~1-1,2 ml) pipettázzuk át egy új 2 ml-s csőbe. Ha a minta több csőbe lett szétosztva, egy csőbe gyűjtjük most össze. A szerves fázis színes, ennek átvitelét el kell kerülni (hem és fehérjék).
8. Egy vizes fázist tartalmazó cső mennyiségéhez képest kb. 1,5-öd annyi 100%-os etanolt adjunk a mintához, majd rövid ideig, de alaposan vortexeljük. Tehát pl. ha egy cső vizes fázisunk volt, abban volt kb. 1 ml fázis, amit elraktunk, akkor $1000/1,5=666,6$ μ l etanol kell az 1 ml mintához. Ha több csőből mértünk össze vizes fázist, akkor arányosan pl. 3 cső esetén ~2000 μ l etanol.
Tehát egy csőnek megfelelő vizes fázishoz olyan 600-800 μ l etanolt adjunk. Ha kell, 1 mp-s centrifugálással össze lehet gyűjteni a cső oldaláról a folyadékot.
9. Kb. 700 μ l etanolos-vizes fázisos minta pipettázása Filter Cartridge-ba, centri 5-10 s, max sebesség. Átfolyó kiöntése, majd visszahelyezzük a Filter Cartridge-t ugyanabba a gyűjtőcsőbe.
10. Maradék ~700 μ l minta rámerése, előző lépés ismétlése. Ha még maradt minta, még egyszer megismételjük.
11. 700 μ l Wash Solution 1 bemérése a Filter Cartridge-ra, majd 5-10 s centri, max sebességen. Átfolyó kiöntése, oszlop visszahelyezése.
12. 700 μ l Wash Solution 2/3 bemérése a Filter Cartridge-ra, majd 5-10 s centri, max sebességen. Átfolyó kiöntése, oszlop visszahelyezése.
13. Még 700 μ l Wash Solution 2/3 bemérése a Filter Cartridge-ra, majd 5-10 s centri, max sebességen. Átfolyó kiöntése, oszlop visszahelyezése.
14. Centri 1 min, max sebesség, hogy a maradék nedvességet is eltávolítsuk.
15. Feliratozott gyűjtőcsőbe áthelyezzük a Filter Cartridge-t, majd 75°C-os ~50 μ l Elution Solution-t mérünk az oszlop közepére. Kupakot lezárjuk és kb. 20 s-ig inkubáljuk szobahőn, majd ~20-30 s-ig „lehúzzuk” (spin) max. sebességen. Az RNS az átfolyóban lesz.
16. Még ~50 μ l Elution Solution bemérése az oszlopra. 1 min, max sebesség, hogy minden RNS-t kinyerjük az oszlopról.

Opcionális DNáz I kezelés RNS elúció után:

- ⚡ A DNase Inactivation Reagent csapadékos, zavaros („slurry”), ezért használat előtt erőteljes vortexeléssel lehet újra oldatba vinni. Az oldat kivétele során a pipettahegyet jól a kolloid felület alá kell bevinni és csak a fehér oldatot felszívni (ami tiszta, átlátszó, azt nem, az csak a közeg, nem a reagens!). Ha több mintát is kezelünk, annyiszor vortexeljük, ahányszor csak szükséges, hogy a részecskéket oldatba vigyük. Ha már sokat használtuk, egy idő után nehéz lesz pipettázni, mert a részecskék közötti átlátszó folyadék mennyisége csökken. Ekkor a „bed” (ez a csapadékos kolloid felület/ reagens) térfogatához képest 10-20%-nyi Elution Solution-t adjunk hozzá és alaposan vortexeljük, hogy újra pipettázható oldatot kapjunk.
1. 1/20-ad mennyiségű 20x DNase Buffer és 1 μ l DNase I (8 U/ μ l) bemérése az eluált RNS-hez. Alapos, de gyengéd szuszpendálás. Tehát, ha pl. az RNS 100 μ l Elution Solution-ben lett kinyerve, akkor 5 μ l 20x DNase Buffer és 1 μ l DNase I kell.



2. A kezelni kívánt RNS térfogatához képest 20%-nyi DNase Inactivation Reagent kimérése. Tehát, ha 100 µl RNS lett kezelve az előző lépésben DNázzal, akkor 20 µl DNase Inactivation Reagent kell. Vortex rövid ideig, de teljesen. Inkubálás szobahőn 2 percig, de közben 1-2x átvortexelni vagy megpöckölni a csövet, hogy az inaktiváló reagens homogén legyen.
3. Centri 1 min max. sebesség, majd a felülúszót (RNS) egy új RNáz-mentes csőbe átmérni.

2.3. RNS kivonása FFPE szövetből (Qiagen)

RNEasy FFPE Kit (50) Qiagen, Cat. no.: 73504

Infók:

- ✦ Max. 20 µm -es metszetek. Maximum 4x10 µm metszet, tehát 250 mm² felszín egy preparáláshoz. Több, mint 4 darab kombinálható, ha az összvastagság kisebb 40 µm -nél, tehát pl. 8x5 µm.
- ✦ Ha ismeretlen a minta előkészítése, akkor érdemes először 2 metszetből kiindulni preparálásonként, majd ezt növelni 4-re.
- ✦ Érkezés után az izoláló csöveket és a DNáz I-et 4°C-on kell tárolni
- ✦ A deparaffinizáláshoz használt oldatok belelegezve és lenyelve halálosak! Megfelelő óvintézkedések betartása kötelező!

RNS munkákhoz előkészület:

- ✦ RNaseZap oldattal áttörölni a munkafelületet, pipettákat, mintatartó állványokat stb.
- ✦ Alternatívaként 0.1 M NaOH, 1 mM EDTA oldattal is lemoshatjuk a műanyag eszközöket felületeket, amit RNáz-mentes vízzel kell leöblíteni a végén
- ✦ Elektroforézis tankok RNáz mentesítése: detergens (pl. 0.5% SDS) öblítés, majd RNázmentes víz, majd etanol és megszáritjuk
- ✦ Haj összefogása
- ✦ Köpeny, kesztyű kötelező! Kesztyűt munka közben 1x-2x lecserélni
- ✦ Minél rövidebb idő alatt elkészülni az izolálással
- ✦ RNáz-mentes pipettahegyek és csövek használata
- ✦ Izolált RNS-t azonnal jégre rakni (pl. amíg lemérjük/ elrakjuk, ne szobahőn legyen)

Előkészületek:

- ✦ DNáz I stock készítése:
 - liofilizált formában érkezik, be kell oldani, ezért üresnek tűnhet a cső
 - ne nyissuk ki a csövet, hanem fecskendővel és tűvel oldjuk be 550 µl RNáz mentes vízben anélkül, hogy kinyitnánk a csövet (tehát közvetlen befecskendezzük a vizet)
 - ne vortexeljünk, ne szuszpendáljuk, csak óvatosan forgassuk meg a csövet, mert a DNáz I nagyon érzékeny a fizikai behatásokra
 - beoldás után is lehetnek még benne csomók, ez nem befolyásolja a minőséget

- ezt követően porciózzuk ki 1 használatnak megfelelő adagokra, majd -15°C -on tároljuk max. 9 hónapig. A kiolvadt csöveket 6 hétig lehet használni $2-6^{\circ}\text{C}$ -os hűtőben (TILOS újból lefagyasztani)
- ⌄ Buffer RPE készítése:
 - 4 térfogat (44 ml) 96-100% etanol a 11 ml Buffer RPE-hez
 - használat előtt felrázni
- ⌄ Melegítőblokk bekapcsolása 56°C -ra
- ⌄ Ha van másik termoblokk is, akkor az 80°C -ra

Protokoll:

1. Paraffin lemetszése a blokkról boncpenge segítségével
2. 5-20 μm vastag blokkok metszése (ha a minta felszíne levegőhöz ért, akkor az első 2-3 metszetet dobjuk el)
3. Azonnal rakjuk ▲ 1.5 ml-s vagy ■ 2 ml-s csövekbe és zárjuk le a tetejüket
4. ▲ 160 μl vagy ■ 320 μl Deparaffinization Solution hozzáadása a csövekhez, majd erőteljes vortex 10 s-ig és lehúzni centrifugával az oldatot a cső aljára (alternatívaként használható heptán, metanol, xilén, limonén, CitriSolv vagy melegítés - ezeknek a protokollja a kit leírásában megtalálható)
5. 56°C 3 min inkubálás, majd hűtés szobahőmérsékletűre (ha hűtés után túl waxos, szilárd a minta, akkor valószínűleg kevés volt a deparaffinizációs oldat vagy túl sok paraffin maradt a mintán, ezért még kell hozzáadni Deparaffinization Solution-t és 56°C -on 3 min-et újból inkubálni)
6. ▲ 150 μl vagy ■ 240 μl Buffer PKD hozzáadása és vortex
7. 1 min 11,000 g (10,000 RPM)
8. 10 μl Proteinase K hozzáadása az alsó, tiszta fázishoz. Óvatos szuszpendálás.
9. 56°C 15 min, majd 80°C 15 min inkubálás rázatással. Ha nincs rázó funkciója a termoblokknak, akkor rövid vortexelést kell végrehajtani minden 3-5. percben. Ha csak 1 termoblokk van, akkor az 56°C -os inkubálás után maradhat szobahőn a minta, amíg 80°C -ra nem melegszik a készülék. A 80°C -os lépés kritikus a maximális RNS hozam eléréséhez, mert a formaldehid által okozott keresztkötéseket ez állítja vissza. Bizonyosodjunk meg arról, hogy a melegítő valóban elérte a 80°C -ot. A 80°C -os inkubálás Buffer PKD-ban részlegesen visszaállítja a nukleinsavakat ért módosulásokat. A hosszabb inkubációs idő vagy a magasabb hőmérséklet jobban fragmentált RNS-hez vezethet, de alacsonyabb Ct értékekhez is qPCR-nél.
10. Az alsó, szintelen fázis átvitele egy új 2 ml-s csőbe
11. Inkubálás jégen 3 min
12. 15 min 20,000 g (13,500 RPM)
13. Felülúszó átvitele egy új eppendorf-csőbe a pellet megzavarása nélkül. A pellet az oldhatatlan sejttörmelékeket tartalmazza, pl. keresztkötött DNS-t. Ha több, mint 2 metszetből indultunk ki, egy nagyobb cső kellhet.
14. A teljes mintatérfogathoz képest tizedannyi DNase Booster Buffer hozzáadása (kb. ▲ 16 μl vagy ■ 25 μl), majd 10 μl DNase I. A cső ÓVATOS megforgatása. Vortexelni TILOS! A Dnáz I

nagyon érzékeny fizikai behatásokra. Rövid centri, hogy a cső oldalán maradt folyadék és az aljára kerüljön.

15. 15 min RT inkubálás
16. ▲ 320 µl vagy ■ 500 µl Buffer RBC hozzáadása, hogy optimális kötődést biztosítsunk, majd a lizátum alapos szuszpendálása, cső megforgatása
17. ▲ 720 µl vagy ■ 1200 µl etanol (96-100%) hozzáadása, majd alapos szuszpendálás (precipitátum előfordulhat, ez nem baj), azonnal folytassuk a következő lépéssel
18. Max. 700 µl minta (precipitátummal együtt) átpipettázása az RNeasy MinElute oszlopra egy 2 ml-s gyűjtőcsővel az alján. Cső tetejét zárjuk le.
19. ≥8,000 g (≥ 10,000 RPM) 15 s. Átfolyó kiöntése. Gyűjtőcső maradhat.
20. Folyamat megismétlése addig, amíg van minta.
21. 500 µl Buffer RPE (etanolos!) hozzáadása az oszlophoz. Cső tetejét zárjuk le.
22. ≥8,000 g (≥ 10,000 RPM) 15 s. Átfolyó kiöntése. Gyűjtőcső maradhat.
23. 500 µl Buffer RPE (etanolos!) hozzáadása az oszlophoz. Cső tetejét zárjuk le.
24. ≥8,000 g (≥ 10,000 RPM) 2 min. Átfolyó kiöntése. A gyűjtőcsövet óvatosan vegyük le, nehogy hozzáérjen a membránhoz az átfolyó.
25. Új 2 ml-s gyűjtőcső ráakasztása az oszlopra.
26. A cső tetejét nyissuk ki és maximális sebességen centrifugáljuk 5 min-ig. (Úgy helyezzük be a csöveket, hogy legalább 1 hely maradjon a centrifugában közöttük és a cső teteje ellentétes irányba nézzen a centrifuga forgásával). Fontos, hogy a membrán teljesen megszáradjon, ne maradjon benne etanol, ez a lépés ezt szolgálja. Átfolyó kiöntése a gyűjtőcsővel együtt.
27. Az oszlop áthelyezése egy új 1.5 ml-s csőbe.
28. 14-30 µl RNase-free water pipettázása a membrán közepére. A cső tetejét becsukjuk. (Ha kevesebb vízzel eluálunk, magasabb RNS koncentrációt kapunk, de alacsonyabb hozamot. Ha 14 µl vizet használunk, 12 µl eluátum fog lejönni az oszlopról. Ha 15 µl-t, akkor 13 µl és így tovább.)
29. Centrifugálás 1 min maximális sebesség.



3. Szimultán izolálások (DNS/ RNS/ fehérje)

3.1. RNS/ DNS kivonása vérből (Qiagen)

QIAamp® RNA Blood Mini Kit (50) HB-0322-004 Cat. No. / ID: 52304

- ⌘ Ennek a kitnek a kiegészítő protokolljai:
 - Purification of genomic DNA and total RNA from human whole blood using the QIAamp RNA Blood Mini Kit and additional Buffer AW1; spin procedure (HB-2658-001)
 - Purification of genomic DNA and Total RNA from cultured cells and tissue using the QIAamp® RNA Blood Mini Kit and additional Buffer AW1; Spin Procedure (HB-2735-001)
- ⌘ Antikoagulánst (pl. EDTA, de heparin, citrát vagy ACD is jó) tartalmazó vérvételi csőből
- ⌘ Lehetőleg friss vér (néhány óra levétel után), fagyasztott teljes vér nem használható
- ⌘ Egészséges egyének esetén max. 1,5 ml vér (max. 10 millió leukocita/spin column). Ha ennél többel dolgozunk, az oszlop telítődik, a fehérvérsejtek lízise csökken és a szennyeződések nem lehet teljes mértékben eltávolítani, ezért a hozam lecsökken. Várt, maximális hozam: 3 ug RNS/ml
- ⌘ Homogenizált lizátumok (6. lépés után) -80°C-on hónapokig tárolhatók (felolvasztás: gyorsan, 37 fokos vízfürdőben)
- ⌘ 2 lépése van: eritrocita (vörösvérsejt) lízis hipotóniás pufferrel, majd leukocita lízis (fehérvérsejtek, vagyis monociták, limfociták és granulociták). Az eritrociták enukleáltak, tehát nincs DNS-ük és RNS-ük, a lízisük, eltávolításuk egyszerűen csak elősegíti a fehérvérsejtek bekonzentrálását, mivel vvt-ből 1000x több van, mint fehérvérsejtből.
 - Ficoll denzitás-gradiens-centrifugálással létrehozott sejtoldat (mononukleáris sejtek) is használható ezzel a kittel. Ficoll esetén csak monociták és leukociták maradnak, granulociták nem.

RNS munkákhoz előkészület:

- ⌘ RNaseZap oldattal áttörölni a munkafelületet, pipettákat, mintatartó állványokat stb.
- ⌘ Alternatívaként 0.1 M NaOH, 1 mM EDTA oldattal is lemoshatjuk a műanyag eszközöket felületeket, amit RNáz-mentes vízzel kell leöblíteni a végén
- ⌘ Elektroforézis tankok RNáz mentesítése: detergens (pl. 0.5% SDS) öblítés, majd RNázmentes víz, majd etanol és megszárítjuk
- ⌘ Haj összefogása
- ⌘ Köpeny, kesztyű kötelező! Kesztyűt munka közben 1x-2x lecserélni
- ⌘ Minél rövidebb idő alatt elkészülni az izolálással
- ⌘ RNáz-mentes pipettahegyek és csövek használata
- ⌘ Izolált RNS-t azonnal jégre rakni (pl. amíg lemérjük/ elrakjuk, ne szobahőn legyen)

Előkészületek:

- ↳ 10 µl β-ME hozzáadása 1 ml Buffer RLT-hez (RT, 1 hónapig eláll) VAGY 20 µl 2M-os DTT hozzáadása 1 ml RLT-hez (1 hó, RT, a 2 M-os DTT-t frissen kell készíteni vízzel vagy lefagyasztani aliquotokban)
- ↳ RPE-hez 4 térfogategység 96-100%-os etanol hozzáadása
- ↳ Ha csapadékos a Buffer RLT, akkor felmelegíteni

Protokoll:

1. 1 TE (térfogategység) vér (*pl. 1 ml*) feloldása 5x annyi Buffer EL-ben (*5 ml*). Olyan csövet válasszunk, hogy az elegy a cső 75%-át foglalja csak el, hogy jól el tudjuk szuszpendálni. Max. 1,5 ml vér használható.
2. 10-15 perc inkubálás jégen. Vortex-szel 2x átkeverni inkubálás közben. Felhős, zavaros oldat inkubálás alatt átlátszó lesz, ami az eritrociták lízisét jelenti. Ha kell, 20 percre növelhető az inkubálási idő.
3. 400 g, 10 min, 4°C, felülúszó teljes eltávolítása, a pelletnek fehér kell lennie. Ha piros, 5-10 perc további inkubálás jégen, majd folytassuk a következő lépéssel.
4. Buffer EL hozzáadása a pellethez: 2x annyi TE Buffer EL kell (*2 ml*), mint a kiindulási vér mennyisége volt. Rövid vortex.
5. 400 g, 10 min, 4°C, felülúszó teljes eltávolítása (ha marad felülúszó, az zavarhatja a lízist és RNS kötődést az oszlophoz)
6. Buffer RLT hozzáadása a pellethez (leukociták) az alábbi mennyiségben, majd szuszpendálni/ vortexelni (*350-600 µl*):

Table 3. Volumes of Buffer RLT used for sample lysis

Buffer RLT* (µl)	Healthy whole blood (ml)	No. of leukocytes
350	Up to 0.5	Up to 2×10^6
600	0.5 to 1.5	2×10^6 to 1×10^7

* Ensure β-ME (or DTT) is added to Buffer RLT (see "Things to do before starting").

Ha nem egészséges a donor, a leukociták száma alapján következtessünk az RLT mennyiségére. Daganatos betegekben (kivéve limfomák) a leukocitaszám drasztikusan lecsökken, tehát elvileg 350 µl RLT elég lesz. Az RLT szétrombolja a sejteket, ezért ezután a lépés után nem szabad sejtcsomókat látni. A csomók eltávolítását alapos szuszpendálással vagy vortexeléssel is elősegíthetjük. Ezután a lépés után el lehet rakni a lizátumot -80°C-ra néhány hónapig.

1. Lizátum átvitele QIAshredder oszlopra egy 2 ml-s gyűjtőcsővel az alján (a pipettát nagyobbra állítani, mint, ami a mintamennyiség, hogy egy felszívással át tudjuk vinni a lizátumot az oszlopra), majd 2 min centrifuga maximális sebességen a homogenizálás elősegítéséhez. Oszlop kidobása, homogenizátum megtartása a következő lépésekhez. (Ha túl sok a sejt, akkor a homogenizálás után a lizátum túl viszkózus lesz, nehezen pipetázható. Ekkor osszuk 2 felé az



oldatot és egészítsük ki a térfogatukat 600 µl-re Buffer RLT-vel, majd ezzel a két aliquot-tal folytassuk a protokollt.)

1. 1 térfogat (350 µl vagy 600 µl - előző lépéseknek megfelelően) 70%-os etanol hozzáadása a homogenizátumhoz és szuszpendáljuk. Precipitátum képződhet, ami nem baj.

1. Max 700 µl minta (és a precipitátum is, ha van) óvatos átvitele egy új QIAmp oszlopra, új gyűjtőcsővel, (anélkül hogy a szűrőhöz érne a gyűjtőcső, illetve a minta az oszlop oldalához). 15 s >8000 g (>10,000 rpm). Nagyobb térfogat esetén a lépést megismételni. Gyűjtőcső eldobása. (Ha DNáz kezelést is alkalmazunk, akkor D1-D4 lépéseket kell ezután elvégezni - ld. protokoll).

Ha DNS-t is ki akarunk vonni, akkor ennél a lépésnél a mintát kétfelé kell osztani, még mielőtt felvisszük a QIAmp oszlopra - pl. 700 µl minta esetén (350 µl RLT-ben szuszpendált pellet + 350 µl etanol) menjen 350 µl az RNS kivonásra, 350 µl a DNS kivonásra. De célszerű minél több mintából kiindulni (600-600 µl)

1. QIAmp oszlop átvitele egy új gyűjtőcsőbe. 700 µl RW1 az oszlopra, majd 15 s >8000 g. Gyűjtőcső eldobása.

1. QIAmp oszlop átvitele egy új gyűjtőcsőbe. 500 µl Buffer RPE (etanolos) az oszlopra, majd 15 s 8000 g, gyűjtőcső eldobása.

1. 500 µl Buffer RPE hozzáadása az oszlophoz, centri maximális sebességen 3 min. Kivétel során ügyeljünk rá, hogy az oszlop alja (szűrő) ne érjen a gyűjtőcső falához, ne legyen nedves. Gyűjtőcső eldobása.

1. QIAmp oszlop átvitele egy új gyűjtőcsőbe. Centri maximális sebességen 1 min. Ez a lépés elősegíti a Buffer RPE maradványok eltávolítását.

1. QIAmp oszlop átvitele egy új, 1.5 ml-s Eppendorf-csőbe és 30-50 µl RNáz-mentes víz (RNase-free water) rámerése az oszlopra, középre, úgy, hogy a pipetta hegye ne érjen a szűrőhöz. 1 min 8000 g. Ha több, mint 0.5 ml teljes vérből (>2x10⁶ leukocita) indultunk ki, a lépést ismételjük meg.

Kiegészítő protokollok (RNS és DNS szimultán izolálása vérből):

Purification of genomic DNA and total RNA from human whole blood using the QIAamp RNA Blood Mini Kit and additional Buffer AW1; spin procedure (HB-2658-001)

Lépések ugyanazok, mint a normál RNS izolálásnál (ld. előző bekezdés), azonban a 9. pontnál a mintát ketté kell venni és utána nem RW1, hanem AW1 Buffer-rel eluálni.

1-8. Ugyanaz

9. Minta kettéosztása: pl. 700 µl minta esetén (350 µl RLT-ben szuszpendált pellet + 350 µl etanol) menjen 350 µl az RNS kivonásra, 350 µl a DNS kivonásra. De célszerű minél több mintából kiindulni (600-600 µl). Minták felvitele új QIAmp oszlopra (max 700 µl). Óvatosan, anélkül, hogy a szűrőhöz érne a gyűjtőcső, illetve a minta az oszlop oldalához). 15 s >8000 g (>10,000 rpm). Nagyobb térfogat esetén a lépést megismételni. Gyűjtőcső eldobása.

10. QIAmp oszlop átvitele egy új gyűjtőcsőbe. 700 µl AW1 az oszlopra, majd 15 s >8000 g. Gyűjtőcső eldobása.

11-14. Ugyanaz

3.2. DNS/ RNS izolálása FFPE szövetből (Qiagen)

Qiagen AllPrep DNA/RNA FFPE Kit (Cat No./ID: 80234)

Előkészületek:

- FRN puffer előkészítése: 42ml izopropanol hozzáadása a teljes (14ml) puffer térfogathoz
- DNáz I oldat készítése: 550 µl RNáz mentes víz hozzáadása a liofilizátumhoz - ne vortexeld!
- RPE, AW1, AW2 bekeverése 96-100%-os etanollal

■ totál RNS, kis RNS-ek nélkül ▲ totál RNS kis RNS-ekkel

Protokoll:

1. Max 4 db 10 µm és 2 db 20 µm metszet áthelyezése 1,5ml vagy 2ml-es centrifuga csőbe
2. 1 ml xilén hozzáadása a mintához, vortex 10mp-ig
 - a. CF: 2 perc, max sebességen
 - b. Felülúszó eltávolítása pipettával (pelletre ügyelve!)
3. 1 ml 96-100%-os etanol hozzáadása az üledékhez, vortex
 - a. CF: 2 perc, max sebességen
 - b. Felülúszó eltávolítása pipettával (pelletre ügyelve!)
4. Inkubáció nyitott kupakkal 10 percig, vagy amíg a maradék etanol elpárolog szobahőmérsékleten vagy magasabb hőmérsékleten (37°C-ig)!
5. 150 µl PKD puffert hozzáadása pellethez, a csövet rázogatva, fel-le fordítva fellazítani a pelletet
6. 10 µl proteináz K hozzáadása a pellethez, vortex
7. Inkubáció: 56°C-on 15 perc, majd jégen visszahűteni max. 3 perc alatt
 - a. CF 20 000 g, 15 perc
 - b. felülúszó: RNS
 - c. pellet: DNS
8. Felülúszó áthelyezése ■ 1,5 ml-es vagy ▲ 2ml-es safe-lock centrifugacsőbe, a pellet megtartása DNS izoláláshoz

Totál RNS izolálás

9. A 14. lépésben kapott felülúszó inkubálása 80°C-on 15 percig (szobahőn tárolni a mintákat, amíg a gép fel nem melegszik)
 - a. csövek lepörgetése, hogy a falukon ne maradjon folyadék
10. 320 µl RLT puffer hozzáadása, összekeverni vortex-szel vagy pipettával

11. ■ 750 µl vagy ▲ 1120 µl etanolt (96-100%) hozzáadása, összekeverni vortex-szel vagy pipettával
12. max 700 µl mintát pipettázása az RNEasy MinElute oszlopra
 - a. CF: 10 000 rpm, 15 mp
 - b. az átfolyó kiöntése
13. 12. lépés megismétlése, amíg a minta teljes térfogatát át szűrjük az RNEasy oszlopon
14. 350 µl FRN pipettázása az RNEasy MinElute oszlopra
 - a. CF: 10 000 rpm, 15 mp
 - b. az átfolyó kiöntése
15. 10 µl DNáz I oldat hozzáadása 70 µl RDD pufferhez, a csöveket óvatosan fel-le forgatni, lepörgetni, hogy a falán ne maradjon folyadék. Nem szabad vortexelni, a DNáz érzékeny a fizikai behatásokra!
16. 80 µl DNáz-RDD mix pipettázása RNEasy MinElute oszlop membránjára
 - a. inkubálni szobahőn (20-30 °C-on) 15 percig
17. 500 µl FRN puffer pipettázása az oszlopra
 - a. CF: 10 000 rpm, 15 mp
 - b. az átfolyót megtartani!
18. Oszlop áthelyezése új 2ml-es csőbe, rápipettázni az előző lépésben kapott átfolyót
 - a. CF: 10 000 rpm, 15 mp
 - b. az átfolyó kiöntése
19. 500 µl RPE pipettázása az RNEasy MinElute oszlopra
 - a. CF: 10 000 rpm, 15mp
 - b. az átfolyó kiöntése
20. Újra 500 µl RPE pipettázása az oszlopra
 - a. CF: 10 000 rpm, 15 mp
 - b. átfolyó kiöntése, gyűjtőcsővel együtt
21. Oszlop áthelyezése új gyűjtőcsőbe
 - a. CF: nyitott kupakkal, 5 percig max sebességen
 - b. átfolyó kiöntése, gyűjtőcsővel együtt
22. Oszlop áthelyezése 1,5 ml-es centrifuga csőbe
23. 14-30 µl RNáz mentes víz pipettázása membránra
 - a. inkubáció: 1 perc szobahőn,
 - b. CF: max sebesség, 1 perc

Genomi DNS izolálás

24. 180 µl ATL pufferben szuszpendálni a 14. lépésben kapott pelletet
25. 40 µl proteináz K hozzáadása, vortex
 - a. inkubáció: 56 °C 1 óra
 - b. inkubáció: 90 °C 2 óra
 minták tárolása szobahőn, amíg a készülék fel nem melegszik a kívánt hőfokra
 - c. Csövek lepörgetése, hogy a falukon ne maradjon folyadék
26. Ha RNS mentes izolátumot szeretnénk, megvárni, míg szobahőre visszahűl a minta, 4 µl

- RNáz A hozzáadása (100mg/ml).
- a. inkubáció: 2 perc szobahőn
27. 200 µl AL puffer hozzáadása, vortex
 28. 200 µl 96-100%-os etanol hozzáadása, azonnal összekeverni vortex-szel vagy pipettával
 29. A teljes térfogat rápipettázása a QIAmp MinElute oszlopra
 - a. CF: 10 000 rpm, 1 perc
 - b. átfolyó kiöntése, gyűjtőcsővel együtt
 30. Oszlop áthelyezése új 2ml-es gyűjtőcsőbe
 31. 700 µl AW1 pipettázása az oszlopra,
 - a. CF: 10 000 rpm, 15mp
 - b. átfolyó kiöntése
 32. 700 µl AW2 pipettázása az oszlopra
 - a. CF: 10 000 rpm, 15 mp
 - b. átfolyó kiöntése
 33. 700 µl 96-100%-os etanol pipettázása az oszlopra
 - a. CF: 10 000 rpm, 15 mp
 - b. átfolyó kiöntése, gyűjtőcsővel együtt
 34. Oszlop áthelyezése új 2ml-es gyűjtőcsőbe
 - a. CF: nyitott kupakkal 5 perc max sebességen
 35. Oszlop áthelyezése 1,5 ml-es gyűjtőcsőbe
 36. 60 µl ATE puffer pipettázása a membránra (NGS-hez 30 µl deszt. víz)
 - a. inkubáció: 1 perc szobahőn
 - b. CF: 1 perc max sebességen

Izolátumok tárolása

RNS, DNS minőségi és mennyiségi ellenőrzése NanoDrop-pal/ Qubit-tal/ Fragment Analyzer-rel (felhasználási területeket, használati útmutatójukat lásd később) és adatok elmentése. NanoDrop: akkor szép, ha A260/A280 értéke 1,7-1,9 között van, az abszorbanciagörbe pedig szimmetrikus és 260nm-nél tetőzik.

- ↓ RNS: -80 °C
- ↓ DNS: -20 °C
- ↓ Fehérje: -80 °C

3.3. DNS/ RNS/ fehérje kivonása fagyasztott szövetből (Qiagen AllPrep)

AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit (50) Cat. No. / ID: 80004

Előkészületek:

- ↓ Kikeverni:
 - Mintaszámnak megfelelő mennyiségű RLT + β-ME oldat (x db * 600 µl): 1 ml RLT-hez kell 10 µl β-ME

- Dithiothreitol (DTT) hozzáadása ALO pufferhez (8 mg DTT 1 ml ALO pufferhez)
- RPE, AW1, AW2 pufferekhez etanol (96-100%) hozzáadása (X-szel van jelölve a tubus tetején, ha már tartalmaz etanolt). RPE keverése: 33 ml RPE (ennyi van az eredeti tubusban)
+ 134 ml abs. EtOH

↓ Melegítőt bekapcsolni, majd a “Genomi DNS izolálása” c. rész előtt az EB puffert 70°C-ra felmelegíteni

↓ ALO puffert 95°C-ra melegíteni

↓ Munkaterület, kesztyű és Eppendorf-állványok lefújása etanollal. Kesztyűt a munka közben többször is lefújni, esetleg lecserélni

↓ Csövek feliratozása (1,5 ml-s Eppendorfozok a fehérjének és RNS-nek, valamint DNALoBind Tube- ok a DNS-nek: minta sorszáma, minta típusa, dátum plusz a DNEasy és RNEasy oszlopok és homogenizáláshoz speciális csövek feliratozása: minta sorszáma)

↓ Minták eredeti sorszámának és az általunk adott azonosítóknak jegyzőkönyvben való rögzítése (ép- tumor)

Homogenizálás:

1. 2 ml-es csövekbe 4 db fémgönggy helyezése
2. Minden csőbe 600 µl (RLT + B-ME) keveréket tenni
3. Mérleget az adott csőre letárazni
4. A fagyasztóból kivett mintából 20-25 mg-ot (0.020 - 0.025 g, ez körülbelül egy gyufafejnyi) óvatosan, lassan lemetszeni egy Petri-csészében steril szikével. Több minta esetén a Petri-csésze más-más részébe rakni a mintákat. Kerüljük a véres és zsíros részből való mintavételt.
5. Csövet a homogenizátorba tenni (180 sec, speed: 280)
6. (Amíg ez lejár, a másik mintát el is kezdhethetjük lemetszeni egy új csőbe. Minták között a csipeszt töröljük át majd alkohollal fertőtlenítjük és vegyünk új szikét)
7. - - - Ezután meg lehet állni és elrakni a mintákat -80°C-ra másnapi felhasználásra (a golyók miatt először a hűtőbe, utána a -20°C-ra, majd -80°C-ra rakjuk el, nehogy szétpattanjanak a csövek) - - -
8. CF 3 perc, max sebesség
9. A felülúzó átmérése (max. 700 µl fér el anélkül, hogy a szűrőhöz érne az átfolyó) AllPrep DNEasy oszlopra (kék), CF: 30 mp, 10 000 rpm
 - a. oszlopon: DNS
 - b. átfolyóban: RNS, fehérje
10. DNEasy oszlop áthelyezése új 2 ml-es gyűjtőcsőbe, DNS eluálásig 4°C-on tárolni, viszonylag rövid időn belül folytatni a DNS izolálást

RNS izolálás:

11. 430 µl 96-100% etanol hozzáadása a 9. lépésben kapott átfolyóhoz, szuszpendálás

12. Max (!!) 700 µl átpipettázása RNEasy oszlopra (rózsaszín)
 - a. CF: 15 mp, 10 000 rpm
 - b. átfolyót 1,5 ml-es centrifugacsőbe átpipettázni a fehérje izoláláshoz (ha tömegspektrometriához kell a fehérje, akkor ez az utolsó lépés, ez a cső lesz a végső tároló, amit elrakunk -80° C-ra)
 13. 12. lépés megismétlése: a fennmaradó térfogatot (330 µl) az etanos lizátumból újból rápipettázom az RNEasy oszlopra és lecentrizem, majd az átfolyót átpipettázom a 1,5 ml-es centrifugacsövekbe, amiben már ott a fehérje
 14. 700 µl RW1 pipettázása az RNS oszlopra
 - a. CF: 15 mp, 10 000 rpm
 - b. átfolyó kiöntése (a centriből kivéve a gyűjtőcsövet egyből lehet is kiöntögetni, majd visszatenni rájuk az RNS-oszlopot, DE az oszlopot óvatosan, lassan vegyük ki a gyűjtőcsőből, ne érjen hozzá a folyadékhoz vagy a cső falához a membrán)
 15. 500 µl RPE pipettázása az RNS oszlopra
 - a. CF: 15 mp 10 000 rpm
 - b. átfolyó kiöntése (a centriből kivéve a gyűjtőcsövet egyből lehet is kiöntögetni, majd visszarakni az RNS-oszlopot rájuk, DE az oszlopot óvatosan, lassan vegyük ki a gyűjtőcsőből, ne érjen hozzá a folyadékhoz vagy a cső falához a membrán)
 16. Megint 500 µl RPE pipettázása az RNS oszlopra
 - a. CF: 2 min 10 000 rpm
 - b. átfolyó kiöntése (miután kiöntöttük, rakhatjuk vissza egyből az oszlopot és mehet a centribe)
 17. Centrifugálás megismétlése: 1 perc, max sebességen
 18. RNS oszlop áthelyezése a végleges, feliratozott 1,5ml-es gyűjtőcsőbe
 19. 30 µl RNáz mentes víz pipettázása a membránra (A MEMBRÁN KÖZEPÉRE, FELÜLRŐL MÉRJÜK RÁ AZ OLDATOT, NE A FALÁRA. NE ÉRJÜNK A MEMBRÁNHOZ A PIPETTAHEGGYEL.)
 - a. CF: 1 perc, 10 000 rpm
 20. 15 µl RNáz mentes víz pipettázása az oszlopra (MEMBRÁN KÖZEPÉRE, FELÜLRŐL MÉRJÜK RÁ AZ OLDATOT, NE A FALÁRA ÉS NE ÉRJÜNK A MEMBRÁNHOZ A PIPETTAHEGGYEL)
 - a. CF: 1 perc, 10 000 rpm
- / 19-20. lépések: RNS eluálásnál érdemes 2x oldani az oszlopról, először nagyobb majd kisebb térfogattal. A protokoll 50-100 µl-t ajánl, de ez NGS-hez nagyon híg. /*

Fehérje izolálás:

1. 1000 µl APP hozzáadása az RNS izolálás 12. lépésében félretett átfolyóhoz
 - a. összekeverni, majd inkubáció 10 perc, szobahő
 - b. CF: 10 perc, max sebességen, felülúszó eltávolítása pipettával
2. 500 µl 70%-os alkohol hozzáadása a pellethez
 - a. CF: 1 perc max sebességen, felülúszó eltávolítása pipettával
 - b. pellet szárítása 10 percig szobahőn
3. 50 µl ALO puffer hozzáadása, vortex-szel összekeverni,
 - a. inkubáció: 5 perc, 95° C-on (hogy az összes protein oldatba kerüljön.)

- b. a mintákat visszahűtjük szobahőre
4. Centrifugálás 1 percig max sebességen, felülúszó felhasználása SDS-PAGE / Western blot

Genomi DNS izolálás:

1. 500 µl AW1 pipettázása a homogenizálás után a 10. lépésből kapott DNS oszlopra
 - a. CF: 15 mp, 10 000 rpm
 - b. átfolyó kiöntése (centriből kivéve már önthető is ki)
 2. 500 µl AW2-t pipettázása a DNS oszlopra
 - a. CF: 2 perc, max sebesség
 - b. átfolyó kiöntése a gyűjtőcsővel együtt
 3. A DNS oszlop áthelyezése a végleges, feliratozott DNALoBind 1,5 ml-s csőbe
 4. 50 µl, 70°C-ra előmelegített EB puffer (VAGY NGS-nél 30 µl deszt. víz) pipettázása a membránra, kupak lezárása. **KÖZÉPRE, FELÜLRŐL PIPETTÁZZUK!**
 - a. inkubáció: 2 perc, szobahő
 - b. CF 1 perc, 10 000 rpm
 5. Ismétlés 10 µl, 70°C-ra előmelegített EB puffer pipettázása (KÖZÉPRE, FELÜLRŐL PIPETTÁZVA) a membránra, kupak lezárása
 - a. inkubáció: 2 perc, szobahő
 - b. CF 1 perc, 10 000 rpm
- /4-5. lépések: vagy 50 µl -> 10 µl vagy 45 µl -> 10 µl. A protokoll 100 - 200 µl-t ír, de ez NGS-hez nagyon híg!*

Fehérje kivonás előkészítése Western Blothoz

Teljes sejt kivonás:

1. Tripszinezés és sejtszámlálás
 2. Centrifugálás és feloldás PBS-ben.
 3. Sejtek szétosztása 500000 sejt/ 1,5 ml centrifugacső, centrifugálás 1 perc, 3000 RPM-en
 4. Felülúszó leöntése
 5. 20 µl 1x Laemmli puffer hozzáadása
 6. Állni hagyni 100°C 5 percig termőblokkban
 7. Termék tárolása -20°C-on
- 2x Laemmli puffer: (1x-esre hígítás vízzel)
 - 4% SDS
 - 10% 2-mercaptoethanol
 - 20% glycerol
 - 0.004% bromofenol kék

- 0.125 M Tris-HCl
- pH ellenőrzése és szükség szerint beállítása 6.8-ra.