



1. DNS / RNS / FEHÉRJE KIVONÁS

Totál DNS kivonás fagyasztott szövetből

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:* 10-15mg szövet! 2mm-es kocka, vagy 8mm³ térfogat
- Akkor szép, ha A260/A280 értéke 1,7-1,9 között van, az abszorbanciagörbe 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 szoba hőn (15-25°C)

Keverés: „pulse-vortexing” 5-10mp-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 pipettázni, 2ml gyűjtőcsővel. Centrifugálás 1 perc, 8000 RPM (6000g). Átfolyó levet 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 levet leönteni és gyűjtőcsövet kidobni.
8. A DNeasy Mini Spin oszlopot egy új 2ml gyűjtőcsőre áthelyezni. Hozzáadni 500 µl Buffer AW2-t. Centrifugálás 3 perc, 14.000RPM (20000g), a DNeasy membrán megszáradásáig (etanol semmiképpen ne maradjon rajta). Átfolyó levet leönteni és gyűjtőcsövet kidobni.

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

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

Totál DNS (genomi, mitokondriális, patogén stb.) kivonás vérből

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 emlősvér: 100 µl, kutyából ez kb 4-5µg DNS-t eredményez. Kecskéből 50µl (nincs nagyobb hozam, ha több), madárból/csirkéből 5 µl (sejtmagos vörösvérsejtjeik vannak) FRISS VÉR vagy azonnal -20°C,-70°C-on lefagyasztott vér.
- Minták elővétele szobahőre
- Akkor szép, ha A260/A280 értéke 1,7-1,9 között van, az abszorbanciagörbe pedig szimmetrikus és 260nm-nél tetőzik.



- 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” 5-10mp-ig

Protokoll:

1. Sejtmag nélküli vérnél 20 µl Proteinase K-t pipettázni egy 1,5 vagy 2 ml-s tubusba. 200 µl nem megalvadt 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, 10perc 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 (6000g). Átfolyó levet 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 levet leönteni és gyűjtőcsövet kidobni.
8. A DNeasy Mini Spin oszlopot egy új 2 ml gyűjtőcsőre áthelyezni. Hozzáadni 500 µl Buffer AW2-t. CF 3perc, 14.000RPM (20000g), a DNeasy membrán megszáradásáig (etanol semmiképpen ne maradjon rajta). Átfolyó levet leönteni és gyűjtőcsövet kidobni.
9. Áthelyezni a DNeasy mini spint egy 1,5 ml centrifugacsőbe (DNA LoBind Tube), és 200µl Buffer AE-t (NGS-hez 30µl RNáz mentes víz!) pipettázni közvetlenül a membránra. Állni hagyni 1perc szobahőn, majd centrifugálás 1 perc, 8000rpm (6000g).

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



DNS izolálás Qiagen QIAamp kittel formalin fixált, paraffinba ágyazott szövetből

Előkészület:

- Szerezd be a kitet (Biomarkertől Cat.no. 56404), xilént, 96-100% etanolt
- 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! (Csilla))
- 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!

DNS / RNS / fehérje izolálása szövetből AllPrep Mini Kittel (Qiagen)

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 Eppendorfork 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 sorszámanak és az általunk adott azonosítóknak jegyzőkönyvben való rögzítése (ép - tumor)



Homogenizálás:

1. 2 ml-es csövekbe 4 db fémgyöngy helyezése
2. Minden csőbe 600 μ l (RLT + β -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 másnapra 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 felülúszó átmérése (max. 700 μ l 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 μ l 96-100% etanol hozzáadása a 9. lépésben kapott átfolyóhoz, szuszpendálás
12. Max (!) 700 μ l 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 μ l) az etanolos lizátumból újból rápipettázom az RNEasy oszlopra és lecentrizem, majd az átfolyót átpipettázom a 1,5 ml-es centrifugacsőbe, amiben már ott a fehérje
14. 700 μ l RW1 pipettázása az RNS oszlopra
 - a. CF: 15 mp, 10 000 rpm
 - b. átfolyó kiöntése (a centrálból 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 μ l RPE pipettázása az RNS oszlopra
 - a. CF: 15 mp 10 000 rpm
 - b. átfolyó kiöntése (a centrálból 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 centribé)
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 pellettez
 - 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 DNA LoBind 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 μ l -> 10 μ l vagy 45 μ l -> 10 μ l. A protokoll 100 - 200 μ l-t ír, de ez NGS-hez nagyon híg/

Totál RNS izolálása humán szövetből és sejtekből RNEasy Kittel

Előkészületek:

- A munkaterületet, kesztyűt és Eppendorf-állványokat lefűjni etanollal. Kesztyűt a munka közben többször is lefűjni, 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 μ l, 200 μ l, 2,5 μ l), 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 μ l): 1 ml RLT-hez kell 10 μ l 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 μ l (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 μ l 70 %-os etanolt, közben pipettával át is keverjük.
6. Az RNS izoláló oszlopot (rózsaszín, szűrős) ráillesztjük a 2 ml gyűjtőcsőre, majd rámérünk max. 700 μ l mintát. Azután CF 15 sec-ig 10 000 RPM. Az átfolyó levet kiöntjük. Mindezt megismétlem a maradék mintával. ÚJ GYŰJTŐCSŐ!
7. 700 μ l RW1 Buffert pipetázunk az oszlopra, CF 15 sec, 10 000 RPM. Az átfolyó levet kiöntjük.
8. 500 μ l (etanollal hígított) RPE Buffert pipetázunk az oszlopra. Ezután CF 15 sec, 10 000 RPM. Az átfolyó levet kiöntjük.
9. Ismét 500 μ l 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 pipetázunk 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 pellethez, pipettával homogénre szuszpendáljuk!
3. A teljes térfogatot rápipetázzuk 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)

DNS/RNS izolálása FFPE szövetből AllPrep Mini Kittel

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 rázogatóva, 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 óraminták 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 rápipetázása 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 pipetázása az oszlopra,
 - a. CF: 10 000 rpm, 15mp
 - b. átfolyó kiöntése
32. 700 µl AW2 pipetázása az oszlopra
 - a. CF: 10 000 rpm, 15 mp
 - b. átfolyó kiöntése
33. 700 µl 96-100%-os etanol pipetázása 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 pipetázása a membránra (NGS-hez 30 µl deszt. víz)
 - a. inkubáció: 1 perc szobahőn
 - b. CF: 1 perc max sebességen

Fehérje kivonás előkészítése Western Blothoz

Teljes sejt kivonás:

1. Tripszinezés és sejtszámlálás
2. Centrifugálás és feloldás PBS-ben.
3. Sejtek szétoztása 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.

Izolátumok tárolása

RNS, DNS minőségi és mennyiségi ellenőrzése NanoDrop-pal/ Qubit-tal/ Fragment Analyzer-rel (felhasználási területeket, használati útmutatójukat lásd később) és adatok elmentése.

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