



Navodilo za pripravo in shranjevanje citoloških vzorcev za izolacijo RNA

Ozadje: RNA je neobstojna pri sobni temperaturi in razpade v nekaj minutah zaradi delovanja encimov. Zato je pomembno pri odvzemu citoloških vzorcev, namenjenih za molekularno-genetske preiskave na nivoju RNA, ravnati v skladu s sledečimi navodili.

Priprava vzorca za izolacijo RNA:

- Najmanj **1x10⁵ celic** v testiranem vzorcu - prosimo napišite število celic v vzorcu na napotnico.
- Ocena **deleža (%) tumorskih celic** (priporočljivo najmanj 50% v testiranem vzorcu) – podatek prosimo napišite na napotnico.

I. PRIPOROČEN NAČIN PRIPRAVE:

Priprava in dostava citološkega vzorca z dodatkom reagenta za stabilizacijo RNA (RNAlater):

Reagent za stabilizacijo RNAlater (Invitrogen) je vodna, netoksična raztopina, ki prodre v celice in stabilizira ter zaščiti RNA. Z uporabo reagenta RNAlater minimaliziramo potrebo po takojšnjem procesiranju ali zamrzovanju vzorca.

Postopek:

1. Vzorec centrifugirajte pri **1500 rpm, 5 minut** in odstranite tekočino za ohranjanje celic.
2. Celični pelet resuspendirajte v **200 - 500 µl PBS**, nato dodajte **5 do 10-kratni volumen (1-5 ml)** raztopine **RNAlater** (glej navodila proizvajalca).
3. Tako pripravljene vzorce lahko hranimo en teden pri sobni temperaturi, en mesec pri T=4°C in dalj časa (več mesecev ali let) zamrznjene pri T=-20°C.

V tem primeru vzorce lahko dostavite na Oddelek za molekularno diagnostiko tako kot velja za ostale citološke vzorce za molekularno-genetske preiskave (standardni način preko Dispečerske službe OIL).

II. IZJEMOMA (v izrednih primerih):

Priprava in dostava citološkega vzorca brez dodatka reagenta za stabilizacijo RNA (RNAlater):

Postopek:

1. Vzorec **TAKOJ** po odvzemu prenesite v standardno epruveto (rdeč pokrov) z **200 – 500 µl raztopine za ohranjanje celic**.
2. Vzorec **na ledu** čim prej dostavite na Oddelek za molekularno diagnostiko. Če dostava vzorca ni mogoča takoj po odvzemu, vzorec lahko shranite za 1-2h v hladilniku (T=4°C) ali na ledu. Tako pripravljene vzorce sprejemamo **do 14h**. Prosimo, da se za pravilno in pravočasno dostavo vzorcev dogovorite z Dispečersko službo OIL.
3. Če dostave vzorca na Oddelek za molekularno diagnostiko ni mogoče zagotoviti do 14h, je vzorec potrebno zamrzniti. Pred zamrzovanjem je celice potrebno **posesti (speletirati)** s centrifugiranjem pri **1500 rpm, 5 minut**.
 - Za krajši čas (1-2 dni) vzorce lahko zamrznete pri T=-20°C v standardnih epruvetah in v standardni tekočini za ohranjanje celic.
 - Za daljši čas je vzorce potrebno zamrzniti pri T=-80°C, in sicer v kriovialah v mediju za krioprezervacijo (pripravite 900 µl medija, ki vsebuje 80% fetal bovine serum + 20% RPMI-1640; tik pred zamrzovanjem dodajte 100 µl sterilnega DMSO). RNA bo obstojna nekaj tednov.