

GEBRAUCHSANLEITUNG

BlueZol

Lysereagenz für Zellen und Gewebe

Art.-Nr. 39808



SERVA Electrophoresis GmbH • Carl-Benz-Str. 7 • D-69115 Heidelberg
Telefon: +49-6221-138400 • E-Mail: info@serva.de • Internet: www.serva.de

Version 07/24

Inhalt

1.	Allgemeine Information.....	2
1.1.	Eigenschaften	2
2.	Protokoll zur RNA-Isolierung	3
2.1.	Benötigte Reagenzien	3
2.2.	Homogenisierung	3
2.3.	Phasentrennung	4
2.4.	RNA-Isolierung	4
2.5.	DNA-Isolierung	5
2.6.	Protein-Isolierung	6

1. Allgemeine Information

BlueZol ist ein gebrauchsfertiges Reagenz zur Isolierung von Gesamt-RNA aus verschiedenen biologischen Materialien wie tierischen und p-reichen Geweben (reich an Polysacchariden und Proteoglykanen), Zellkultur- und Bakterienzellen.

Unter Verwendung von **BlueZol** wird eine biologische Probe homogenisiert oder lysiert, bevor sie in drei Phasen getrennt wird: eine wässrige Phase (oben), eine organische Phase (unten) und eine Interphase. Die RNA verbleibt in der wässrigen Phase und wird mit 2-Propanol ausgefällt.

Die hochwirksame RNase - hemmende Eigenschaft von **BlueZol** schützt die Integrität der RNA während der Lyse, so dass nach Isolierung hochwertige RNA vorliegt.

BlueZol enthält Phenol und die Mischung anderer Reagenzien, um optimale Ergebnisse zu gewährleisten.

1 ml **BlueZol** ist ausreichend, um die Gesamt-RNA aus 1×10^7 Zellen oder 100 mg Gewebe zu isolieren.

1.1. Eigenschaften

- Schnelle Isolierung von hochwertiger Gesamt-RNA, DNA und / oder Protein aus einer einzigen Probe
- Funktioniert gut mit großen oder kleinen Mengen an Gewebe oder Zellen
- Gebrauchsfertige Lösung

1.2. Anwendungsbeispiele

- Gereinigte RNA ist ideal für jede nachfolgende Anwendung wie RT-PCR, *In-vitro*-Translation, Northern-Blotting, RNase-Protection-Assays oder Dot-Blot-Hybridisierung
- Gereinigte DNA kann für PCR und Southern Blotting verwendet werden
- Gereinigtes Protein kann für Western Blot verwendet werden

1.3. Lagerungsbedingungen: Bei + 2 ° C bis + 8 °C lagern

2. Protokoll zur RNA-Isolierung

2.1. Benötigte Reagenzien

- Chloroform
- 2-Propanol (Isopropanol), gekühlt
- 75 % (v/v) Ethanol (in DEPC-behandeltem Wasser)
- DEPC-behandeltes Wasser (SERVA Kat.-Nr. 39798) or PCR-grade water
- 100 % Ethanol (SERVA Kat.-Nr. 39556)
- Resuspensionlösung für DNA
(100 mM Natriumcitrat, 10 % (v/v) Ethanol, pH 8,5)
- 8 mM NaOH
- HEPES Puffer
- Waschlösung für die Proteine
(300 mM Guanidinhydrochlorid, 95 % (v/v) Ethanol)
- 1 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung

2.2. Homogenisierung

- **Gewebe**
Gewebestücke in 1 ml **BlueZol** per 50-100 mg Gewebe homogenisieren. Für kleine Mengen (1 – 10 mg Gewebe) werden 800 µl **BlueZol** zugegeben. Bei fetthaltigem Gewebe kann sich das Fett an der Oberfläche sammeln und sollte vom Homogenat abgetrennt werden.
- **Pflanzen**
Nach dem Homogenisieren wird das unlösliche Material durch Zentrifugation (1200 x g, 10 min, + 4 °C) abgetrennt. Das geklärte Homogenat (Überstand) wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt.
- **Adherente Zellen**
Die Zellen werden direkt im Kulturgefäß durch Zugabe von 1 ml **BlueZol** pro 10 cm² Kulturfläche lysiert. Durch mehrmaliges Pipettieren des Lysats kann ein ausreichender Zellaufschluss sichergestellt werden.
- **Suspensionszellen**
Die Zellen werden bei 200 x g (5 min, Raumtemperatur) sedimentiert. Durch Zugabe von 1 ml **BlueZol** pro 5x 10⁶ Zellen erfolgt die Lyse. Das Lysat wird für einen ausreichenden Zellaufschluss mehrmals durch eine Pipettenspitze pipettiert. Für kleinere Zellmengen (10² – 10⁶), erfolgt die Lyse mit 800 µl **BlueZol**.

Wichtig: Das Protokoll kann hier bei Bedarf unterbrochen werden. Die Proben können für mindestens 1 Monat bei - 80 °C gelagert werden.

2.3. Phasentrennung

- Inkubation der Proben (5 min bei Raumtemperatur)
- Zugabe von 0,2 ml Chloroform pro ml eingesetztem **BlueZol**.
- Reaktionsgefäß verschließen und 15 s kräftig schütteln.
- Probe 3 min bei Raumtemperatur inkubieren.
- Zentrifugation: 15 min bei 12000 x g (alternativ 30 min bei 2600 x g), jeweils bei + 4 °C.
- Die Probe trennt sich in eine hellgelbe organische Phase, eine Interphase und eine farblose obere wässrige Phase, die die RNA enthält.

2.4. RNA-Isolierung

2.4.1. RNA-Fällung

- Die wässrige Phase wird vorsichtig, ohne die Interphase zu zerstören, in ein anderes Reaktionsgefäß überführt.
- Durch Zugabe von gekühltem 2-Propanol wird die RNA gefällt.
Pro ml eingesetztem **BlueZol** werden 500 µl 2-Propanol zugegeben.
- Anschließend wird die Probe 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.
- Zentrifugation: 12000 x g, 10 min (alternativ: 2600 x g, 30 min) jeweils bei + 4 °C.

2.4.2. Waschen der RNA

- Den Überstand vorsichtig vom Pellet abnehmen.
- Das Pellet einmal mit 75 % (w/w) Ethanol waschen.
Hierzu mind. 1 ml Ethanol pro ml eingesetztem **BlueZol** verwenden.
- Proben gut mischen und bei 7500 x g, + 4 °C 5 min zentrifugieren.

2.4.3. Auflösen der RNA

- Das luftgetrocknete Pellet wird in DEPC-behandeltem Wasser (alternative PCR-Wasser) aufgenommen und durch mehrmaliges Pipettieren gelöst.
- Bei Bedarf für 10 min bei 60 °C inkubieren.
- Lagerung der RNA bei - 80 °C.

2.5. DNA-Isolierung

2.5.1. DNA-Fällung

- Für die nachfolgende DNA- und Protein-Isolierung werden die organische und die Interphase verwendet (siehe 2.3. und 2.4.). Reste der wässrigen Phase werden entfernt.
- Durch Zugabe von 100 % Ethanol (0,3 ml pro 1 ml verwendeten **BlueZols**) erfolgt die DNA-Fällung, danach gut mischen und 2 – 3 min inkubieren.
- 5 min Zentrifugation bei 2000 x g (4 °C).

- Überstand abnehmen und für die Protein-Isolierung in ein neues Reaktionsgefäß überführen. Der Überstand kann bei - 80 °C gelagert werden.

2.5.2. Waschen der DNA

- DNA Pellet in 1 ml Resuspendierungslösung aufnehmen (1 ml pro 1 ml verwendeten **BlueZols**).
- Inkubation 30 min bei Raumtemperatur mit gelegentlichem Mischen
- Zentrifugation bei 2000 x g 5 min, 4 °C.
- Überstand abnehmen und verwerfen
- Waschschrift einmal wiederholen.
Bei großen DNA-Mengen (> 200 µg) sollte der Waschschrift 2x wiederholt werden.
- DNA Pellet in 1,5 – 2 ml 75 % (v/v) Ethanol (1 ml pro 1 ml verwendeten **BlueZols**) resuspendieren.

- 10 - 20 min Inkubation bei Raumtemperatur mit gelegentlichem Mischen.
- Zentrifugation bei 2000 x g 5 min, 4 °C.
- Überstand abnehmen und verwerfen
- DNA Pellet für 5 -10 min lufttrocknen.

Wichtig:

Pellet nicht mittels Vakuumzentrifuge trocknen.

Ansonsten lässt sich die DNA nur schwer wieder lösen.

2.5.3. Auflösen der DNA

- DNA Pellet in 0,3 – 0,6 ml 8 mM NaOH resuspendieren.
- Zentrifugation bei 12.000 x g 10 min, 4 °C.
- Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführen und mit HEPES pH-Wert von 7 - 8 einstellen.

Die DNA Probe ist nun fertig für nachfolgende Applikationen.

2.6. Protein-Isolierung

2.6.1. Protein-Fällung

- Zur Protein-Isolierung wird der Phenol-Ethanol-Überstand (Abschnitt 2.5.1.) in ein neues Reaktionsgefäß überführt.
- Zugabe von 2-Propanol (Isopropanol): 1,5 ml pro 1 ml verwendeten **BlueZols**
- Inkubation: 10 min Raumtemperatur
- Zentrifugation: 12.000 x g 10 min, 4 °C
- Überstand abnehmen und verwerfen

2.6.2. Waschen der Proteine

- Proteinpellet in Waschlösung resuspendieren (2 ml pro 1 ml verwendeten **BlueZols**).
- Inkubation: 20 min bei Raumtemperatur
- Zentrifugation: 7500 x g 5 min, 4 °C.
- Überstand abnehmen und verwerfen
- Waschschrift zweimal wiederholen
- Zugabe von 2 ml 100 % Ethanol und gründlich Mischen.
- Inkubation: 20 min bei Raumtemperatur
- Zentrifugation: 7500 x g 5 min, 4 °C.
- Überstand abnehmen und verwerfen
- Proteinpellet 5 – 10 min lufttrocknen

2.6.3. Auflösen der Proteine

- Resuspendieren des getrockneten des Proteinpellets in 200 µl 1 % (w/v) SDS-Lösung.

Wichtig:

Zum vollständigen Lösen des Proteins, kann die Probe auch bei 50 °C inkubiert werden.

- Zentrifugation: 10.000 x g 10 min, 4 °C.
- Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführen.

Die Proteinprobe ist nun fertig für nachfolgende Applikationen.