

Bedienungsanleitung Instruction Manual

SERVA *BlueZol*

Lysis Reagent
for Cells and Tissues

SERVA

GEBRAUCHSANLEITUNG INSTRUCTION MANUAL

BlueZol

Lysereagenz für Zellen und Gewebe
Lysis reagent for cells and tissues

(Kat.-Nr./Cat. no. 39808)



Carl-Benz-Str. 7, D-69115 Heidelberg
phone +49-6221-138400, fax +49-6221-1384010

Inhalt

1. Allgemeine Information	4
1.1. Eigenschaften	4
2. Protokoll zur RNA-Isolierung	5
2.1. Benötigte Reagenzien	5
2.2. Homogenisierung	5
2.3. Phasentrennung	6
2.4. RNA-Fällung	6
2.5. Waschen der RNA	6
2.6. Auflösen der RNA	6

Content

1. General Information	13
1.1. Features	13
2. Protocol for RNA Isolation	14
2.1. Reagents required (not supplied with <i>BlueZol</i>)	14
2.2. Homogenization	14
2.3. Phase Separation	15
2.4. RNA Precipitation	15
2.5. RNA Wash	15
2.6. Re-dissolving the RNA	15

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.

GEBRAUCHSANLEITUNG INSTRUCTION MANUAL

BlueZol

Lysereagenz für Zellen und Gewebe
Lysis reagent for cells and tissues

(Kat.-Nr./Cat. no. 39808)

SERVA
■ serving scientists ■

Carl-Benz-Str. 7, D-69115 Heidelberg
phone +49-6221-138400, fax +49-6221-1384010

Inhalt

1. Allgemeine Information	4
1.1. Eigenschaften	4
2. Protokoll zur RNA-Isolierung	5
2.1. Benötigte Reagenzien	5
2.2. Homogenisierung	5
2.3. Phasentrennung	6
2.4. RNA-Fällung	6
2.5. Waschen der RNA	6
2.6. Auflösen der RNA	6

Content

1. General Information	13
1.1. Features	13
2. Protocol for RNA Isolation	14
2.1. Reagents required (not supplied with <i>BlueZol</i>)	14
2.2. Homogenization	14
2.3. Phase Separation	15
2.4. RNA Precipitation	15
2.5. RNA Wash	15
2.6. Re-dissolving the RNA	15

1. General Information

BlueZol is a ready-to-use reagent for the isolation of total RNA from various biological materials such as animal and p tissues (rich in polysaccharides and proteoglycans), cell culture and bacterial cells.

Using **BlueZol** a biological sample is homogenized or lysed before being separated into three phases: an aqueous phase (upper), an organic phase (lower) and an interphase). The RNA remains in the aqueous phase and its purification is followed by precipitation in isopropyl alcohol. The highly effective RNase inhibitory property of

BlueZol protects the integrity of the RNA during lysis and results in the isolation of high-quality material.

BlueZol contains phenol and the mixture of other reagents to ensure optimal results.

1 ml of **BlueZol** is sufficient to isolate total RNA from 1×10^7 cells or 100 mg of tissue. The isolation method is fast and easy.

1.1. Features

- Quick isolation of high-quality total RNA, DNA and/or protein from a single sample
- Performs well with either large or small amount of tissue or cells
- Ready-to-use solution

1.2. Applications

- Purified RNA is ideal for any downstream application such as RT-PCR, *in vitro* translation, Northern blotting, RNase protection assays or dot blot hybridization
- Purified DNA can be used for PCR and Southern blotting
- Purified protein can be used for Western blotting

1.3. Storage conditions: Store at + 2°C to + 8 °C.

2. Protocol for RNA, DNA and Proteins Isolation

2.1. Reagents required (not supplied with *BlueZol*)

- Chloroform
- Isopropyl alcohol (chilled)
- 75 % (v/v) ethanol (in DEPC-treated water)
- DEPC-treated water (SERVA cat. no. 39798) or PCR-grade water
- 100 % ethanol (SERVA cat. no. 39556)
- Resuspension solution for DNA isolation (100 mM sodium citrate, 10 % (v/v) ethanol, pH 8.5)
- 8 mM NaOH
- HEPES buffer
- Wash solution for protein isolation (300 mM guanidine hydrochloride, 95 % ethanol)
- 1 % (w/v) sodium dodecylsulfate (SDS) solution

2.2. Homogenization

- **Tissue**
Homogenize tissue samples in 1 ml of *BlueZol* per 50 - 100 mg of tissue. For small quantities of tissue (1 - 10 mg), add 800 µl of *BlueZol*. For samples of fat tissue, a layer of fat may accumulate at the top, which should be removed.
- **Plant tissue**
Following homogenization, insoluble material is removed by centrifugation at 12000 x g for 10 minutes at 4 °C. Transfer the cleared homogenate to a fresh tube.
- **Cells grown on monolayer**
Lyse cells directly in a culture dish or flask by adding 1ml of *BlueZol* per 10 cm² growth area, pipette the cell lysate several times to ensure sufficient cell disruption.
- **Cells grown in suspension**
Pellet cells at 200 x g for 5 minutes at room temperature. Lyse cells with 1 ml of *BlueZol* per 5x 10⁶ cells and pass the lysate several times through a pipette tip. For small quantities of cells (10² – 10⁶), lyse cells in 800 µl of *BlueZol*.

Note: At this stage, samples can be stored for at least one month at - 80 °C.

2.3. Phase Separation

- Incubate samples for 5 minutes at room temperature.
- Add 0,2 ml of chloroform per 1 ml of **BlueZol** used.
- Cap tubes securely and shake vigorously by hand for 15 seconds.
- Incubate samples for 3 minutes at room temperature.
- Centrifuge samples at 12000 x g for 15 minutes (alternatively: 2600 x g for 30 minutes) at 4 °C.
- The sample will separate into a pale yellow organic phase, an interphase (both containing DNA and proteins) and a colorless upper aqueous phase that contains the RNA.

2.4. RNA Isolation

2.4.1. RNA Precipitation

- Transfer the aqueous phase very carefully, without disturbing the interphase to another tube.
Please note: The remaining organic and interphase can be used for DNA and protein isolation.
- Precipitate the RNA by mixing with cold isopropyl alcohol. Use 0.5 ml of isopropyl alcohol per 1 ml of **BlueZol** used.
- Incubate the sample for 10 minutes at room temperature.
- Centrifuge at 12000 x g for 10 minutes (or 2600 x g for 30 minutes) at 4 °C.

2.4.2. RNA Wash

- Remove the supernatant.
- Wash the pellet once with 75 % (w/w) ethanol, adding at least 1 ml of ethanol per 1 ml of **BlueZol** used.
- Vortex the sample and centrifuge at 7500 x g for 5 minutes at 4 °C.

2.4.3. Re-dissolving the RNA

- Air-dry the pellet and dissolve in PCR water or DEPC-treated water by pipetting the solution up and down.
- Incubate for 10 minutes at 60 °C if necessary.
- Store RNA at - 80 °C.

2.5. DNA Isolation

2.5.1. DNA Precipitation

- For subsequent DNA and protein isolation, use the organic and the interphase (see 2.3. and 2.4.) and remove any remaining aqueous phase.
- Precipitate the DNA by addition of 100 % ethanol (0.3 ml per 1 ml of *BlueZol* used).
- Mix well by inverting the tube several times and incubate 2 - 3 min.
- Centrifuge at 2000 x g for 5 minutes at 4 °C.
- Remove the supernatant and transfer it to a new tube for further protein isolation, if needed. The supernatant can be stored at - 80 °C.

2.5.2. DNA Wash

- Resuspend the DNA pellet in the resuspension solution (1 ml per 1 ml of *BlueZol* used).
- Incubate 30 min at room temperature, mix occasionally by gentle inversion.
- Centrifuge at 2000 x g for 5 minutes at 4 °C.
- Remove and discard the supernatant.
- Repeat this washing step once.
For large DNA amounts (> 200 µg) it is recommended to repeat it twice.
- Resuspend the DNA pellet in 1.5 – 2 ml 75 % (v/v) ethanol (1 ml per 1 ml of *BlueZol* used).
- Incubate 10 - 20 min at room temperature, mix occasionally by gentle inversion.
- Centrifuge at 2000 x g for 5 minutes at 4 °C.
- Remove and discard the supernatant.
- Air-dry the DNA pellet for 5 -10 min.

Please note:

Do not dry the pellet by vacuum centrifuge.
Otherwise it is very hard to solubilize the DNA.

2.5.3. Re-dissolving the DNA

- Resuspend the DNA pellet in 0.3 – 0.6 ml of 8 mM NaOH.
- Centrifuge at 12,000 x g for 10 minutes at 4 °C.
- Transfer the supernatant to a new tube and adjust the pH to 7 - 8 with HEPES.

The DNA sample is now ready for further downstream applications.

2.6. Protein Isolation

2.6.1. Protein Precipitation

- For further protein isolation, transfer the phenol-ethanol supernatant (section 2.5.1.) in a new tube.
- Add isopropyl alcohol (1.5 ml per 1 ml of *BlueZol* used).
- Incubate 10 min at room temperature.
- Centrifuge at 12,000 x g for 10 minutes at 4 °C.
- Remove and discard the supernatant.

2.6.2. Protein Wash

- Resuspend the protein pellet in the wash solution (2 ml per 1 ml of *BlueZol* used).
- Incubate 20 min at room temperature.
- Centrifuge at 7500 x g for 5 minutes at 4 °C.
- Remove and discard the supernatant.
- Repeat the washing step twice.
- Add 2 ml 100 % ethanol and mix by vortexing briefly.
- Incubate 20 min at room temperature.
- Centrifuge at 7500 x g for 5 minutes at 4 °C.
- Remove and discard the supernatant.
- Air-dry the protein pellet 5 – 10 minutes.

2.6.3. Re-dissolving the protein

- Resuspend the air-dried protein pellet in 200 µl 1 % (w/v) SDS solution.

Please note:

To ensure complete resuspension, it is possible to incubate the protein sample at 50 °C.

- Centrifuge at 10,000 x g for 10 minutes at 4 °C.
- Transfer the supernatant to a new tube.

The protein sample is now ready for further downstream applications.



Headquarters
SERVA Electrophoresis
GmbH
Carl-Benz-Str. 7
D-69115 Heidelberg
Germany

E-Mail: info@serva.de
Internet: www.serva.de



German Customers

To place orders
Phone: 06221 13840-0
Fax: 06221 13840-10

Customer Care
Phone: 06221 13840-46
Fax: 06221 13840-10

Technical Service
Phone: 06221 13840-44
Fax: 06221 13840-54
E-Mail: tech.service@serva.de

Technical Service Collagenase
Phone: 04122 712-413
Fax: 04122 712-286

Free Phone: 0800 737 8246
Free Fax: 0800 737 8247

International Customers

To place orders
Please contact your local
Distributor
(please visit www.serva.de)

Customer Care
Phone: +49 6221 13840-47
Fax: +49 6221 13840-10

Technical Service
Phone: +49 6221 13840-44
Fax: +49 6221 13840-54
E-Mail: tech.service@serva.de

Technical Service Collagenase
Phone: +49 4122 712-413
Fax: +49 4122 712-286

Free Phone: 00800 737 82462
(within Europe, only)