

Instrukcja

Fenozol

Fenozol - mieszanina soli chaotropowych oraz fenolu, przeznaczona do wydajnej ekstrakcji RNA.

Fenozol inaktywuje aktywność RNAz.

numer katalogowy	wielkość
203-50	50 ml
203-100	100 ml

Produkt przeznaczony wyłącznie do badań naukowych.

Gwarancja

Firma A&A Biotechnology udziela gwarancji na niniejszy produkt.

Firma nie gwarantuje poprawnego działania produktu w przypadku:

- odstępstwa od dostarczonego wraz z produktem protokołu
- braku zalecanego w niniejszym protokole wyposażenia i materiałów
- użycia innych odczynników niż zalecane lub które nie wchodzą w skład produktu
- użycia przeterminowanych odczynników oraz elementów produktu

Spis treści

Opis	3
Wskazówki i dobra praktyka laboratoryjna	3
Przygotowanie Materiału	4
Protokół	5
Informacje bezpieczeństwa	6

Opis

- Fenozol - mieszanina soli chaotropowych oraz fenolu, przeznaczona do wydajnej ekstrakcji RNA.
- Fenozol inaktywuje aktywność RNAz.

Materiał biologiczny dokładnie zawieszony w fenozolu może być przechowywany w:

- w temp. od -20 °C do -80 °C: do jednego roku
- w temp. od +4 °C do +8 °C: do 6 miesięcy
- w temp. pokojowej: do jednego tygodnia

Wskazówki i dobra praktyka laboratoryjna

Prowadzić wszystkie czynności w temp. pokojowej, jeżeli inaczej nie zalecono.

- Stosować schłodzony (4 °C) fenozol, jeżeli materiał biologiczny może zawierać wysoki poziom endogennej aktywności RNAz, np. trzustka czy śledziona.
- Stosować zawsze sterylne tipsy i probówki jednorazowego użytku wolne od RNAz.
- Stosować rękawiczki i odpowiednie środki ochrony oraz odczynniki do usuwania RNAz z powierzchni roboczych, aby zapewnić sterylne i wolne od RNAz warunki pracy. Zmieniać rękawiczki w trakcie procedury w miarę postępowania od lizy do elucji czystych produktów.

Przygotowanie Materiału

1. Prowadź lizę i homogenizację zależnie od rodzaju materiału biologicznego:

Tkanki

- A. Dodać po **1 ml fenozolu** na każde **100 mg tkanki** i homogenizować stosując odpowiedni homogenizator. Alternatywnie rozcierać zamrożoną tkankę w ciekłym azocie i fenozolu do zamrożonego sproszkowanego materiału.

Kultury komórkowe i komórki w zawiesinie

- A. Wirować komórki i usunąć supernatant (np. 5 min/5000 RPM).
- B. Dodać do osadu po **1 ml fenozolu** na każde **250 µl próbki (5-10×10⁶ komórek pochodzenia zwierzęcego, roślinnego lub drożdży oraz 1×10⁷ komórek bakteryjnych)**.
UWAGA: Nie przemyczać komórek żadnymi buforami przed dodaniem fenozolu, aby uniknąć degradacji mRNA.
- C. Mieszać próbkę przez pipetowanie, aby uzyskać homogeniczną zawiesinę.

UWAGA: Objętość próbki nie może przekraczać 10% objętości fenozolu użytego do lizy.

Na tym etapie próbki mogą być przechowywane **przez noc (16 godz.)** w temp. **4 °C** lub **do 1 roku** w temp. **-20 °C**.

OPCJA: Jeżeli próbka zawiera dużą ilość tłuszczów, należy wirować lizat przez **5 min** przy **12 000 x g** w temp. **4-10 °C**. Następnie przenieść klarowny supernatant do nowej próbki. Inkubować przez **5 min**, aby umożliwić całkowitą dysocjację kompleksów nukleoproteinowych.

2. Dodać po **200 µl chloroformu** na każdy **1 ml fenozolu** użytego do lizy. Zamknąć probówkę wieczkiem. Mieszać próbkę przez odwracania probówki do osiągnięcia jednolitej mieszaniny fazowej. Inkubować próbkę przez **2-3 min**. Wirować przez **15 min** przy **12 000 x g** w temp. **4 °C**.

Mieszanina rozdzieli się na dolną, brązową fazę organiczną fenozolu z chloroformem, interfazę oraz bezbarwną, górną fazę wodną.

3. Przechylić probówkę z rozdzielonymi fazami o ok. 45° i przenieść pipetą górną fazę wodną, zawierającą RNA, do nowej próbki.

UWAGA! Należy unikać przenoszenia interfazy i fazy organicznej podczas oddzielania pipetą fazy wodnej

Protokół

OPCJA: Jeżeli próbka zawiera niewiele materiału (<10⁶ komórek lub <10 mg tkanki), dodać do fazy wodnej po 5-10 µl wzmacniacza precypitacji (nr kat. 197-1) lub po 5 µg polyA RNA jako nośnika wspomagającego izolację RNA.

1. Dodać równą objętość izopropanolu do fazy wodnej (zazwyczaj 450-500 µl izopropanolu na każdy 1 ml fenozolu zastosowanego podczas lizy).
2. Wymieszać próbkę przez kilkakrotne obracanie probówki. Inkubować przez 3 min w temp. pokojowej.
4. Wirować przez 10 min przy 12 000 x g w temp. 4 °C.
Całkowite RNA wytrąci się w formie białego osadu na dnie probówki.
5. Supernatant ostrożnie usunąć pipetą.
6. Zawiesić osad w 1 ml 75% etanolu na każdy 1 ml fenozolu zastosowanego podczas lizy.
UWAGA: RNA w 75% etanolu może być przechowywane: do jednego tygodnia w temp. -4 °C lub do jednego roku w temp. -20 °C.
7. Wymieszać próbkę przez worteksowanie i wirować przez 5 min przy 7500 x g w temp. 4 °C.
8. Supernatant ostrożnie usunąć pipetą. Suszyć osad RNA pod próżnią lub na powietrzu przez 5-10 min w temp. pokojowej.

WAŻNE!

Nie suszyć osadu przy pomocy próżniowej wirówki. Nie dopuścić do przesuszenia osadu RNA, aby zapewnić całkowite jego ponowne rozpuszczenie. Częściowo rozpuszczone próbki RNA wykazują w pomiarach absorpcji UV stosunek $A_{230/280} < 1.6$.

9. Zawiesić osad w 20-50 µl wody DEPC wolnej od RNAz (nr kat. 003-075, 003-25) lub w 0,1 mM EDTA pH 8.0.
10. Inkubować próbkę RNA w łaźni wodnej lub suchym bloku przez 10-15 min w temp. 55 °C.
11. Tak uzyskane RNA może być przechowywane do czasu dalszych analiz w temp. -70 °C.

Informacje bezpieczeństwa



NIEBEZPIECZEŃSTWO

H301+H311+H331 Działa toksycznie po połknięciu, w kontakcie ze skórą lub w następstwie wdychania.

H314 Powoduje poważne oparzenia skóry oraz uszkodzenia oczu.

H341 Podejrzewa się, że powoduje wady genetyczne.

H373 Może powodować uszkodzenia narządów poprzez długotrwałe lub wielokrotne narażenie.

H411 Działa toksycznie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki.

P261 Unikać wdychania pyłu.

P273 Unikać uwolnienia do środowiska.

P280 Stosować rękawice ochronne / odzież ochronną / ochronę oczu / ochronę twarzy.

P301+P310 W przypadku połknięcia natychmiast skontaktować się z Ośrodkiem Zatruc lub lekarzem.

P305+P351+P338 W przypadku dostania się do oczu ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.

P310 Natychmiast skontaktować się z Ośrodkiem Zatruc lub lekarzem.



A&A BIOTECHNOLOGY

innovating life science

A&A Biotechnology, al. Zwycięstwa 96/98, 81-451 Gdynia, Poland
phone +48 58 6982194, +48 883 323 761, fax +48 58 6228578
info@aabiotech.com, www.aabiotech.com

