RNA-Extraktion (flüssig)

Datenblatt

Modifizierte Guanidinisothiocyanat/Phenol-Methode für die Extraktion von RNA

Artikel-Nr.	**56.100.0010**	**10 ml**
	56.100.0100	**100 ml**

Lagerung

Lichtgeschützt bei 4°C für mindestens 6 Monate haltbar.

Beschreibung

Bio&SELL RNA Extraktion ist ein Reagenz für die effiziente Isolierung von Total-RNA aus unterschied-lichsten Ausgangsmaterialien (Gewebe, Zellen, Bakterien, Pflanzen, etc.) sowie aus unterschied-lichsten Mengen an Ausgangsmaterialien. Die Extraktionsmethode basiert auf einer besonders zeitsparenden Einschritt-Flüssigphasen-Separation.

Bio&SELL RNA Extraktion enthält ein Gemisch aus Phenol und Guanidinisothiocyanat in mono-phasischer Lösung. Nach der Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation trennt sich das Homogenat in drei Phasen auf, einer gefärbten unteren organischen Phase, einer weißlichen Interphase und einer oberen farblosen wässrigen Phase. Die RNA befindet sich in der oberen wässrigen Phase. Aus dieser wässrigen Phase wird die RNA über die Zugabe von Alkohol präzipitiert. Die RNA-Extraktion mit **Bio&SELL RNA Extraktion** kann in ca. 1 Stunde durchgeführt werden. Die RNA, die dabei extrahiert wird, ist undegradiert und von hoher Qualität. Sie kann für eine Vielzahl von downstream-Applikationen eingesetzt werden, wie Northern-Analysen, cDNA-Synthese, RT-PCR-Reaktionen, Dot-Blot-Hybridisierungen, Poly(A)+-Selektionen, *in vitro*-Translationen, Klonierungen und RNase-Assays.

Warnung

Bio&SELL RNA Extraktion enthält die gesundheitsschädlichen Stoffe Phenol und Guanidinisothiocyanat. Das Arbeiten mit dem Reagenz darf nur mit Handschuhen und Schutzbrille unter einem Abzug erfolgen. Sollte es dennoch zu einem Kontakt der Haut oder den Augen mit dem Reagenz kommen, sind die betroffenen Stellen für mindestens 15 Minuten unter fließendem Wasser zu waschen. Begeben Sie sich anschließend umgehend in ärztliche Behandlung.

Dieses Produkt ist ausschließlich für Forschungszwecke geeignet. Eine Verwendung für diagnostische Zwecke oder als Arzneimittel sowie eine Verabreichung an Menschen oder Tieren ist nicht gestattet.

Bio&SELL Lohweg 27 90537 Feucht bei Nürnberg	E-Mail: info@bio-sell.de Internet: www.bio-sell.de	Fon : +49 (0) 9128 – 724 32 32 Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33

RNA-Extraktion (flüssig)

Extraktionsprotokoll

1. Benötigte Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

- Chloroform (frei von Zusätzen, wie z.B. Isoamylalkohol!)
- Isopropanol
- 70% Ethanol
- Polypropylen-Zentrifugenröhrchen (Zentrifugation mit Phenol bei 12.000 x g!)
- RNAse-freies Wasser

2. Protokoll

2.1. Homogenisierung des Ausgangsmaterials

A. Gewebeproben
100 mg Gewebe werden mit je 2 ml **Bio&SELL RNA Extraktion** homogenisiert. Um eine gute Lyse zu erreichen, sollte ein Glas-, ein Teflon- oder ein elektrischer Homogenisator verwendet werden. Das Probenvolumen sollte nicht mehr als 10% des verwendeten **RNA Extraktion**-Volumens betragen.

B. Monolayer-Zellen
Monolayer-Zellen werden direkt in der Zellkulturschale durch Zugabe von 1 ml **Bio&SELL RNA Extraktion** pro 3,5-cm-Schale und durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette lysiert. Die Menge an benötigtem **RNA Extraktion** ist nicht von der Zellzahl, sondern von der Größe der Zellkulturschale (in der Regel 1 ml pro 10 cm^2) abhängig. Eine unzureichende Menge an **RNA Extraktion** kann zur Kontamination der extrahierten RNA mit DNA führen.

C. Zellsuspensionen
Die Zellsuspension zentrifugieren und mit 1 ml **Bio&SELL RNA Extraktion** pro 5 x10^6 Zellen (Tier-, Pflanzen-, Hefe- oder Bakterienzellen) resuspendieren. Waschen der Zellen vor der Lyse fördert den Abbau der RNA und sollte vermieden werden. Bei der Extraktion von RNA aus Hefen und Bakterien ist in einigen Fällen eine zusätzliche Homogenisierung bzw. eine enzymatische Vorbehandlung notwendig.

2.2. Phasentrennung

Zunächst die Proben für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Anschließend je eingesetztem Milliliter **Bio&SELL RNA Extraktion** 0,2 ml Chloroform zugeben und die Proben für 10 Sekunden vortexen. Für 3-10 Minuten auf Eis inkubieren. Eine Inkubation bei Raumtemperatur ist ebenfalls möglich, führt aber eventuell zu einer schlechteren Phasentrennung. Die Phasentrennung erfolgt durch Zentrifugation der Proben für 5 Minuten bei 12.000 x g (bei 4°C). Es bilden sich drei Phasen: eine untere rötliche organische Phase, eine obere farblose wässrige Phase und eine dazwischen liegende Interphase.
Die RNA ist ausschließlich in der wässrigen Phase angereichert, während sich DNA und Proteine in der Interphase und in der organischen Phase befinden. Die wässrige Phase nimmt etwa 60 % des Probenvolumens ein.

Das verwendete Chloroform sollte frei von Zusätzen, wie z.B. Isoamylalkohol, sein!

Bio&SELL Lohweg 27 90537 Feucht bei Nürnberg	E-Mail: info@bio-sell.de Internet: www.bio-sell.de	Fon : +49 (0) 9128 – 724 32 32 Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33

2.3. RNA-Präzipitation

Die wässrige Phase sorgfältig in ein frisches Röhrchen überführen. Ein Verschleppen von Teilen der Interphase ist unbedingt zu vermeiden, da damit auch eine Verschleppung von DNA und letztlich eine Kontamination der RNA mit DNA erfolgt. Es wird empfohlen, nicht den gesamten Teil der wässrigen Phase zu überführen.
Die Präzipitation der RNA erfolgt mit dem gleichen Volumen an Isopropanol pro Volumen der überführten wässrigen Phase. Proben für 15 Minuten bei 4°C inkubieren und anschließend für 10 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit ebenfalls bei 4°C zentrifugieren. Das RNA-Präzipitat ist von gelartiger Konsistenz und befindet sich an der unteren Außenseite des Röhrchens.

2.4. Waschen der RNA

Den Überstand vorsichtig abnehmen und das Pellet zweimal mit 1 ml 70 %igem Ethanol waschen und anschließend für 10 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugieren.

2.5. Lösen der RNA

Das RNA-Pellet kurz an der Luft oder durch Anlegen eines leichten Vakuums trocknen lassen. Ein vollständiges Trocknen des Pellets verschlechtert die Löslichkeit der RNA und sollte deshalb vermieden werden. **Die RNA nicht durch Vakuumzentrifugation trocknen!!!**
Die RNA durch mehrmaliges Auf- und Abziehen mit der Pipette in deionisiertem Formamid, RNase-freiem Wasser oder in 0,5 %igem SDS lösen. Ein Erhitzen der RNA-Lösung auf 55 - 60°C verbessert die Löslichkeit.
Um eine Kontamination mit RNasen zu verhindern, sollten Wasser und SDS-Lösungen, die zum Lösen der RNA eingesetzt werden, vorher mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt werden. Empfohlen werden kann auch die Verwendung von kommerziell angebotenem RNase-freiem Wasser.

Bemerkungen

1. Um RNase-Kontaminationen zu vermeiden, sollten während der gesamten Extraktion Handschuhe getragen und ausschließlich RNase-freie Lösungen und Geräte verwendet werden.
2. Erwartet man nur geringe Mengen von RNA (< 10 µg), sollten 70 µg Glykogen pro 1 ml **Bio&SELL RNA Extraktion** als Carrier für die Präzipitation zugesetzt werden.
3. Nach der Homogenisierung und vor der Zugabe von Chloroform können die Proben einige Monate bei – 70°C gelagert werden. Das RNA-Präzipitat kann nach dem Waschen der RNA für 1 - 3 Wochen bei 4°C in 75%igem Ethanol oder für 1 Jahr bei – 20°C gelagert werden.
4. Für die RNA-Extraktion mit **Bio&SELL RNA Extraktion** können auch Table-Top-Zentrifugen verwendet werden, wenn sie ein Maximum von 2.600 x g erreichen. In diesem Fall müssen lediglich die Zentrifugationszeiten in den Schritten 2 und 3 auf 30 - 60 Minuten verlängert werden.
5. Bei Verwendung von Proben mit hohem Gehalt an Proteinen, Polysacchariden, Fetten oder anderen Bestandteilen ist ein extra Reinigungsschritt ratsam. Vor der Phasentrennung mit Chloroform können unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation für 10 Minuten bei Maximalgeschwindigkeit und 4°C entfernt werden. Der Überstand enthält die RNA, während im Pellet die Polysaccharide, extrazellulären Membranbestandteile und hochmolekularen DNAs lokalisiert sind. Bei Proben aus fettreichem Gewebe kommt es zur Bildung einer schaumartigen Fettschicht, die entfernt werden sollte. Der klare, RNA-haltige Überstand wird in ein neues Röhrchen überführt und die Chloroform-Extraktion wie beschrieben durchgeführt.

Bio&SELL

Lohweg 27
90537 Feucht bei Nürnberg

E-Mail: info@bio-sell.de
Internet: www.bio-sell.de

Fon : +49 (0) 9128 – 724 32 32
Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33

RNA-Extraktion (flüssig)

Trouble-Shooting Guide

Mögliche Fehlerquelle	Fehlerbeseitigung
RNA-Menge zu gering	Auf vollständige Homogenisierung bzw. vollständige Lyse des Ausgangsmaterials achten RNA-Pellet vollständig lösen; nicht zu stark trocknen
A 260/280-Quotient zu gering	Probe in größerem Volumen homogenisieren Probe nach Homogenisierung bei RT inkubieren Wässrige Phase war mit der Phenolphase kontaminiert; auf vorsichtiges Abnehmen der oberen wässrigen Phase achten RNA-Pellet vollständig lösen
Degradierte RNA	Unsachgemäße Lagerung der Ausgangsprobe Vermeidung einer Kontamination mit RNasen während der Präparation
Kontamination der RNA mit DNA	Probe in größerem Volumen homogenisieren Proben dürfen keine organischen Lösungen (z.B. Ethanol, DMSO, konzentrierte Puffer) oder einen alkalischen pH-Wert aufweisen

Bio&SELL

Lohweg 27
90537 Feucht bei Nürnberg

E-Mail: info@bio-sell.de
Internet: www.bio-sell.de

Fon : +49 (0) 9128 – 724 32 32
Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33