

Brazol

Modelo: 13-BR188

Instruções de Uso

1. Uso pretendido

O **BRAZOL** é um reagente utilizado no isolamento de ácidos nucleicos, DNA, RNA e proteínas a partir de amostras de células e tecidos. O **BRAZOL** é a versão otimizada do popular método passo-único de isolamento total de RNA, baseado na metodologia desenvolvida por Chomczynski & Sachi (1, 2, 3).

2. Descrição

Esta metodologia de extração tem se mostrado altamente eficaz na **purificação de ácidos nucleicos** a partir de materiais biológicos, tais como: soro, plasma, sangue total coletado ou não com EDTA, células obtidas a partir de cultivos e/ou tecidos congelados. O protocolo a seguir foi padronizado para aplicação em protocolos de amplificação e outras técnicas comuns em laboratórios de Biologia Molecular. Esta técnica é confiável e possui bom desempenho para diferentes quantidades de amostras.

O **BRAZOL** combina as propriedades do fenol e do tiocianato de guanidina, que inibem imediata e efetivamente a atividade da enzima RNase. As células presentes na amostra biológica são lisadas através deste reagente e, após homogeneização e adição de clorofórmio e posterior centrifugação, o produto resultante é separado em duas fases visíveis: aquosa e orgânica, respectivamente.

O RNA permanece exclusivamente na fase aquosa, o DNA pode ser encontrado na interfase entre a fase orgânica e a fase aquosa e as proteínas exclusivamente na fase orgânica (azul). O RNA pode ser precipitado através da adição de isopropanol gelado seguido de lavagens com etanol 70% e dissolvido em água ou tampão TE. O DNA e as proteínas podem ser precipitados através da adição de etanol e isopropanol, seguido de lavagem com etanol.

3. Precauções especiais de manuseio

O **BRAZOL** contém fenol (tóxico) e isotiocianato de guanidina (cáustico) que podem provocar queimaduras e, se ingerido, pode ser fatal. Ao empregá-lo em rotinas laboratoriais utilize sempre luvas, avental e protetor para os olhos. Evite o contato com a pele ou com a roupa e não inale seu vapor.

Leia as notas de advertência contidas no frasco que condiciona o produto.

Em caso de contato acidental: enxágue imediatamente a região atingida com abundante água, por pelo menos 15 minutos e procure imediatamente orientação médica.

Reagentes necessários, não fornecidos:

- Clorofórmio; pode ser substituído por 1-bromo-3-cloropropano (5)
- Isopropanol
- Etanol

4. ISOLAMENTO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS:

Esta metodologia é eficaz para o isolamento de RNA de diferentes espécies e amostras, raramente observada através de outros métodos (4). Utilizando-se o BRAZOL para extração de RNA, o tempo de ensaio é em torno de uma hora. O protocolo prevê basicamente a extração de RNA total a partir de 100 µL de volume de amostra podendo ser realizado em tubos de 500 µL.

Para volumes maiores, ou outro tipo de amostras, deve-se manter a proporção entre os diferentes reagentes bem como a utilização de tubos com capacidade maior. Aconselha-se realizar todo o procedimento em ambiente controlado (15°C a 30°C), observando sempre a utilização de ponteiros e tubos RNase *free*, bem como os reagentes adicionais, acima indicados em baixa temperatura.

5. PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO:

1 - Homogeneização:

- A. Tecidos: 1 mL de Brazol para cada 50-100 mg de tecido, mecanicamente homogeneizado. O volume da amostra não deve exceder 10% do volume de Brazol usado para homogeneização,
- B. Células de crescimento em monocamadas: Lisar as células coletadas diretamente da placa de cultura adicionando 1 mL de Brazol para cada 3,5 cm de diâmetro da placa e passando o lisado de células várias vezes pela pipeta. A quantidade de Brazol adicionada é baseada na área da placa de cultura (aproximadamente 1 ml para 10 cm² e não no número de células presentes. Uma quantidade insuficiente de Brazol poderá resultar na contaminação do RNA isolado, com DNA.
- C. Células de crescimento em suspensão: Centrifugar as células até formar um *pellet*. Lisar as células com Brazol através de repetidas pipetagens *up and down*. Utilizar 1 mL do reagente para cada 5 – 10x10⁶ de células animais, de plantas ou de leveduras, ou para 1x10⁷ células bacterianas. A lavagem excessiva das células antes da adição de Brazol deve ser evitada porque aumenta a possibilidade de degradação do mRNA.
- D. Sangue total: Adicionar 1 mL de **BRAZOL** para cada 300 µL de amostra.

2 - Agitar os tubos por inversão ou com auxílio de agitador, tipo vórtex, por 2 minutos e adicionar 250 µL de clorofórmio gelado. Agitar novamente;

3 - Centrifugar as amostras a 12.000 x g (aproximadamente 10.000 rpm) a 4°C, por 20 minutos;

4 - Transferir o sobrenadante para novos tubos contendo 500 µL de isopropanol gelado no processo de extração de RNA ou 500 µL de etanol absoluto gelado para o DNA;

5 - Agitar os tubos por inversão durante 2 minutos;

6 - Centrifugar a 12.000 x g a 4°C, durante 15 minutos;

7 - Desprezar o sobrenadante por aspiração ou cuidadosa decantação, observando para não eliminar o *pellet* ;

8 - Lavar o *pellet* com 500 µL de etanol 70%, homogeneizar por inversão e centrifugar a 12.000 x g a 4°C, durante 10 minutos;

9 - Desprezar o sobrenadante como na etapa 7, cuidando para não aspirar o *pellet*;

10 - Dissolver o *pellet* em água estéril ou em tampão TE 1X estéril;

11 - Quantificar a concentração final dos ácidos nucleicos obtidos através de leitura em espectrofotômetro ou estimando a concentração em géis de agarose, para o RNA trabalhar em condições desnaturastes;

As amostras assim processadas estão prontas para serem utilizadas em reações de amplificação e demais aplicações da Biologia Molecular.

6. Armazenamento

Armazenamento: 2°C e 8°C

7. Validade

Estável por um ano, desde que armazenado entre 4°e 8°C. Pode ser transportado em temperatura ambiente, e no recebimento, imediatamente armazenado em geladeira.

8. Informação de Segurança

- Sempre que estiver trabalhando com soluções químicas e amostras biológicas, EPIs são necessários conforme normas de segurança regulamentadas.
- Depois de receber o produto verificar se as embalagens estão danificadas ou se há vazamento.
- Produto de uso apenas laboratorial e deverá ser armazenado em condições próprias para uso em laboratório.
- Caso sejam necessárias mais informações a respeito do produto, favor entrar em contato com a

NOVA BIOTECNOLOGIA.

9. Garantia da Qualidade

A **NOVA BIOTECNOLOGIA** fornece garantia do produto **BRAZOL** por ela fornecida contra defeitos de produção pelo período de validade do produto, salvo especificações em contrário a constar da proposta.

- A garantia abrange defeitos de produção.

Exceções na garantia:

- Todos os produtos com defeitos oriundos de mau uso, imperícia, conservação ou armazenagem inadequada.
- Quando não for utilizado de acordo com sua finalidade de aplicação.

10. Informações do Fabricante

NOVA BIOTECNOLOGIA LTDA

R. PASADENA, 235 - PARQUE INDUSTRIAL SAN JOSE
CEP: 06.715-864 - COTIA/SP - BRASIL
CNPJ: 24.096.423/0001-15

RESPONSÁVEL TÉCNICO

Dra. ELIZABETH CORTEZ HERRERA- CRBM 20.951/1

11. Atendimento ao Consumidor

Tel. +55 (11) 4243-2356
www.novabiotecnologia.com.br
e-mail: assessoria@novabiotecnologia.com.br

12. Referências bibliográficas:

1. Chomczynski P and Sacchi N (1987) Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162, 156-159.
2. Chomczynski P (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques*, 15, 532-537.
3. Mackey K and Chomczynski P (1996) Long-Term stability of RNA isolation reagents. *J NIH Res.*, 8,72.
4. Ausubel F M, Brent R. Kingston R E, Moore D D, Seidman J G, Smith J A and Struhl K (1999) Appendix 1, in: *current Protocols in Molecular Biology*, vol 2, p. A.1.5, Jon Wiley and Sons, Inc., New York, NY.
5. Chomczynski P and Mackey K (1995) Substitution of chloroform with bromochloropropane in the single-step method of RNA isolation. *Anal Biochem*, 222, 163-164.