

OttoNA-ZOL (Nükleik Asit İzolasyon Reaktifi)

Cat. No. OttoP1862

Teknik destek için bize ulaşabilirsiniz info@ottosci.com**Özet ve Açıklama**

OttoNA-Zol, insan, hayvan, bitki, maya veya bakteri kökenli hücre ve doku örneklerinden bir saat içinde yüksek kaliteli total RNA'nın (ayrıca DNA ve proteinlerin) izole edilmesi için tasarlanmış, kullanıma hazır bir reaktiftir. OttoNA-Zol fenol, guanidin izotiyosiyanat ve büyük ya da küçük moleküler boyuttaki çeşitli RNA türlerinin izolasyonunu kolaylaştıran diğer tescilli bileşenlerden oluşan monofazik bir çözeltidir. Örnek homojenizasyonu sırasında hücreleri parçalar ve hücresel bileşenleri çözerken RNaz aktivitesini çok etkili biçimde inhibe ederek RNA bütünlüğünü korur. Çok sayıda örneğin eş zamanlı işlenmesine olanak verir ve tek aşamalı RNA izolasyon yönteminin geliştirilmiş bir biçimidir.

OttoNA-Zol, tek bir örnekten RNA, DNA ve proteinlerin ardışık olarak çöktürülmesini sağlar. OttoNA-Zol ile homojenize edildikten sonra kloroform eklenir; homojenat, RNA içeren berrak üst sulu faza, interfaz tabakasına ve DNA ile proteinleri içeren kırmızı alt organik faza ayrılır. RNA sulu fazdan izopropanol ile, DNA interfaz/organik fazdan etanol ile, protein ise fenol-etanol süpernatantından izopropanol ile çöktürülür. Çöktürülen RNA, DNA veya protein safsızlıkları uzaklaştırmak için yıkanır ve sonraki uygulamalarda kullanılmak üzere yeniden çözülür.

*İzole RNA; RT-PCR, Northern blot analizi, dot blot hibridizasyonu, poly(A)+ seçimi, in vitro transkripsiyon, RNaz koruma testi ve moleküler klonlamada kullanılabilir.

*İzole DNA; PCR, restriksiyon enzimi sindirimi ve Southern blotlarda kullanılabilir.

*İzole protein; Western blotlarda, bazı enzimatik aktivitelerin geri kazanılmasında ve bazı immüno-presipitasyon uygulamalarında kullanılabilir.

OttoNa-Zol Reaktifi	Ambalaj miktarı.	Saklama koşulu
Kat No. OttoP1862-100	100ml (100test)	+4°C
Kat No. OttoP1862-200	200ml (200test)	+4°C
Ürün miadı 12 aydır		

Sağlanmayan gerekli malzemeler

12.000 × g ve 4°C'ye ulaşabilen santrifüj ve rotor, Polipropilen mikrosantrifüj tüpleri, Kloroform, 55–60°C su banyosu veya ısı bloğu, %100 İzopropanol, %75 etanol, RNaz içermeyen su veya %0,5 SDS

Güvenlik Uyarıları

- Koruyucu gözlük, laboratuvar önlüğü ve kimyasala dayanıklı eldiven kullanın.
- İşlemleri çeker ocak içinde gerçekleştirin. Atıkları uygun kimyasal atık kaplarında toplayın.
- Cilt ve göz temasından kaçının. Buhar ve aerosollerini solumayın. Kimyasalları yutmayın.
- Temas veya dökülme halinde laboratuvar güvenlik prosedürünü uygulayın.

Numune Tipi	1ml OttoNA-Zol için önerilen miktar
Doku	50mg
Monolayer kültür hücreleri	3,5 cm kültür kabında (10 cm ²) yetiştirilen 1×10^5 – 1×10^7 hücre
Süspansiyon hücreleri	Hayvan, bitki veya maya kökenli 5 – 10×10^6 hücre ya da bakteri kökenli 1×10^7 hücre

ÖNEMLİ! RNA izolasyonunu örnek alınır alınmaz yapın veya örnekleri hemen hızlı biçimde dondurup RNA izolasyonuna kadar -80°C 'de ya da sıvı azotta saklayın.

Örnek hazırlığı ve faz ayırma

- Başlangıç materyaline göre örnekleri OttoNA-Zol Reaktif i içinde parçalayın ve homojenize edin.
- Dokular: 50 mg doku başına 1 mL OttoNA-Zol Reaktif i ekleyin ve homojenizatörle homojenize edin.
- Monolayer kültür hücreleri: Besiyerini uzaklaştırın. Hücreleri parçalamak için 3,5 cm kültür kabındaki 1×10^5 – 1×10^7 hücreye doğrudan 1 mL OttoNA-Zol ekleyin. Homojenizasyon için lizati birkaç kez pipetleyin.
- Süspansiyon hücreleri: Hücreleri santrifüjle toplayıp süpernatantı atın. Pellet üzerine 0,25 mL örnek başına 1 mL OttoNA-Zol ekleyin (hayvan, bitki veya maya kökenli 5 – 10×10^6 hücre ya da bakteri kökenli 1×10^7 hücre). Hücreleri OttoNA-Zol eklemeden önce yıkamayın; bu mRNA bozulmasına yol açabilir. Lizati birkaç kez pipetleyerek homojenize edin.

Not: Örnek hacmi, lizis için kullanılan OttoNA-Zol Reaktif i hacminin %25'ini aşmamalıdır.

Saklama: Örnekler 4°C 'de bir gece veya -20°C 'de bir yıla kadar saklanabilir.

- Alternatif: Yağ içeriği yüksek örneklerde lizati $12.000 \times \text{g}$ 'de, 4 – 10°C 'de 5 dakika santrifüjleyin ve berrak süpernatantı yeni bir tüpe aktarın.
- Nükleoprotein kompleksinin tamamen ayrışması için 5 dakika inkübe edin.
- Liziste kullanılan her 1 mL OttoNA-Zol için 0,2 mL kloroform ekleyin; tüpün kapağını sıkıca kapatın ve çalkalayarak iyice karıştırın.
- 2–3 dakika inkübe edin.
- Örneği $12.000 \times \text{g}$ 'de, 4°C 'de 15 dakika santrifüjleyin. Karışım alt fenol-kloroform fazına, interfaz tabakasına ve renksiz üst sulu faza ayrılır.
- Tüpü 45° eğerek RNA içeren sulu fazı pipetle yeni tüpe aktarın. ÖNEMLİ: Sulu faz alınırken interfazın veya organik tabakanın pipete geçmesini önleyin.

Doğrudan RNA izolasyonuna geçin. DNA veya protein izolasyonu yapılacaksa interfaz ve organik fazı saklayın.

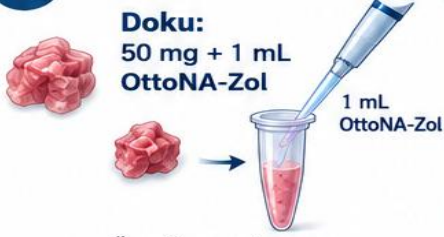
Organik faz 4°C 'de bir gece saklanabilir.

Not: DNA izolasyonu için ürünün web sitesinde bulunan protokole bakın.

Not: Protein izolasyonu için ürünün web sitesinde bulunan protokole bakın.

Örnek Hazırlığı ve Faz Ayırma

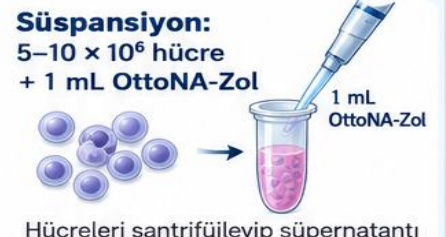
a Lizis ve homojenizasyon



Örneği parçalayın ve homojenize edin.



Besiyerini uzaklaştırın. Hücreleri parçalayın ve 1 mL OttoNA-Zol ekleyin. Homojenize edin.



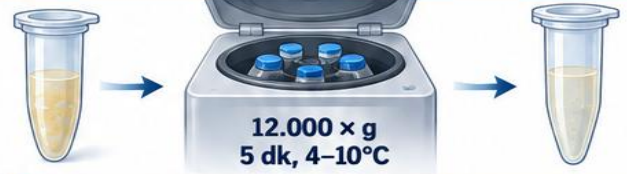
Hücreleri santrifüjleyip süpernatantı atın. Pellet üzerine 1 mL OttoNA-Zol ekleyin ve homojenize edin.

! Örnek hacmi, OttoNA-Zol hacminin %25'ini aşmamalıdır.

❄ Saklama: Örnekler 4°C'de bir gece veya -20°C'de bir yıla kadar saklanabilir.

b Alternatif: Yağlı örneklerde 12.000 x g, 5 dk, 4-10°C

Yağ içeriği yüksek örneklerde 12.000 x g'de, 4-10°C'de 5 dakika santrifüjleyin ve berrak süpernatantı yeni bir tüpe aktarın.



c 5 dk inkübasyon



Nükleoprotein kompleksinin tamamen ayrışması için 5 dakika inkübe edin.

d 0,2 mL kloroform / 1 mL OttoNA-Zol



Her 1 mL OttoNA-Zol için 0,2 mL kloroform ekleyin; tüpün kapağını sıkıca kapatın ve çalkalayarak iyice karıştırın.



e 2-3 dk inkübasyon



2-3 dakika inkübe edin.

f 12.000 x g, 15 dk, 4°C



g Üst sulu fazı 45° açıyla yeni tüpe aktarın



! İnterfazı veya organik fazı pipete çekmeyin.



RNA izolasyonuna doğrudan geçin.

DNA/protein için interfaz ve organik fazı saklayın.

RNA izolasyonu

A. RNA'yı çöktürme

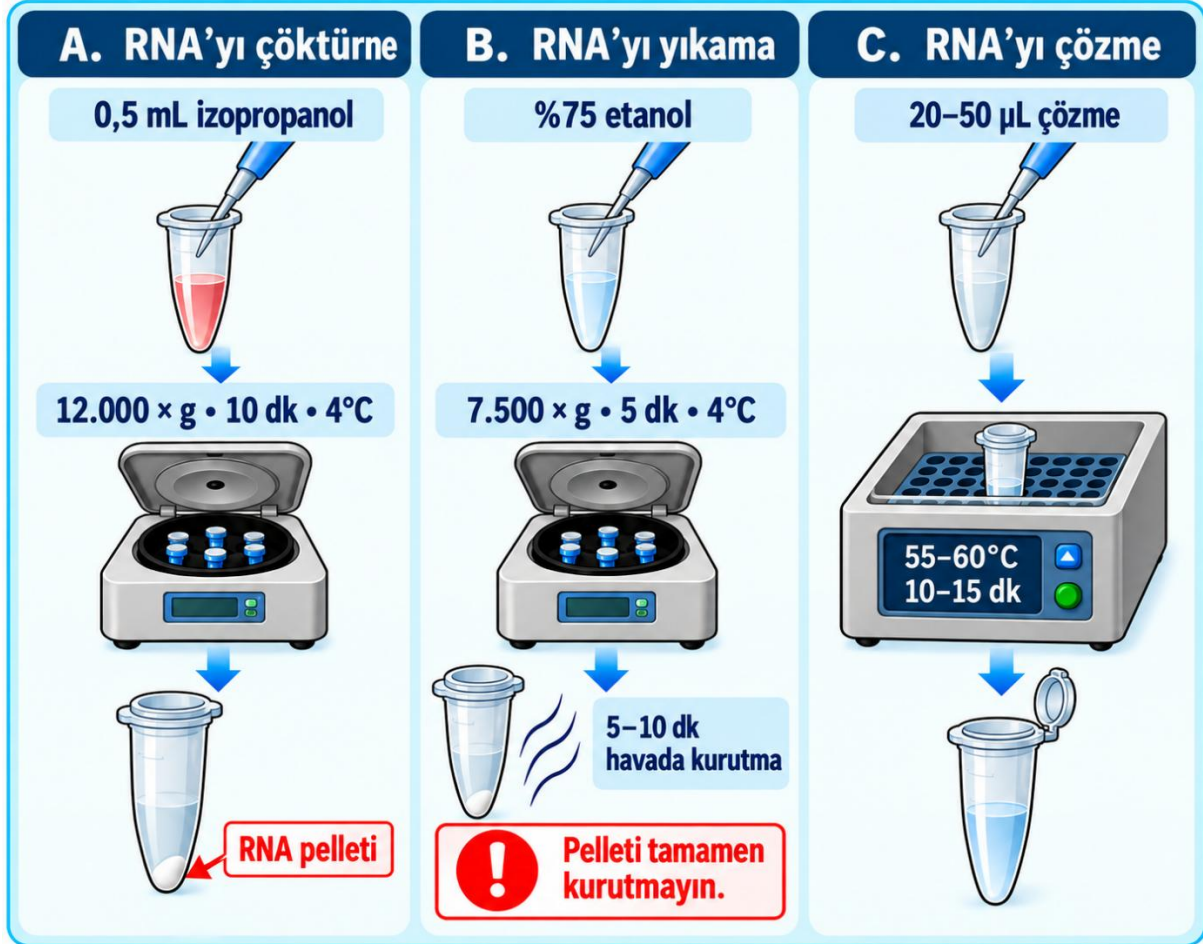
- Alternatif: Başlangıç örneği küçükse ($<10^6$ hücre veya <10 mg doku), taşıyıcı olarak sulu faza 5–10 μ g RNaz içermeyen glikojen ekleyin. Glikojen RNA ile birlikte çöker ancak sonraki uygulamaları etkilemez.
- Liziste kullanılan her 1 mL OttoNA-Zol için sulu faza 0,5 mL izopropanol ekleyin.
- Oda sıcaklığında (15–30°C) 10 dakika inkübe edin.
- $12.000 \times g$ 'de, 4°C'de 10 dakika santrifüjleyin. Total RNA, tüpün dibinde beyaz jel benzeri bir pellet oluşturur.
- Süpernatantı mikropipetle atın.

B. RNA'yı yıkama

- Liziste kullanılan her 1 mL OttoNA-Zol için pelleti 1 mL %75 etanol içinde yeniden süspanse edin. RNA, %75 etanol içinde –20°C'de en az 1 yıl veya 4°C'de en az 1 hafta saklanabilir.
- Kısa süre vorteksleyin; ardından $7.500 \times g$ 'de, 4°C'de 5 dakika santrifüjleyin.
- Süpernatantı mikropipetle atın.
- RNA pelletini 5–10 dakika vakumda veya havada kurutun. ÖNEMLİ: Pelleti vakum santrifüjünde kurutmayın ve tamamen kurumasına izin vermeyin. Kısmen çözünmüş RNA örneklerinde A260/A280 oranı $<1,6$ olabilir.

C. RNA'yı çözme

- Pelleti pipetleyerek 20–50 μ L RNaz içermeyen su, 0,1 mM EDTA veya %0,5 SDS içinde yeniden süspanse edin. RNA sonraki enzimatik reaksiyonlarda kullanılacaksa %0,5 SDS içinde çözmeyin.
- 55–60°C'ye ayarlanmış su banyosu veya ısı bloğunda 10–15 dakika inkübe edin. Sonraki uygulamalara geçin veya RNA'yı –70°C'de saklayın.



Başlangıç materyali	Miktar	RNA verimi
Karaciğer	1 mg	~10µg
Böbrek	1 mg	~ 4µg
Beyin	1 mg	~ 1µg
Epitel hücre	1 x 10 ⁷ cell	~ 15µg
E.coli	O.D600: 1.8	~ 60µg
Plasenta	1 mg	~ 4µg

SORUN GİDERME

Gözlenen durum	Muhtemel kaynak	Düzeltilici yaklaşım
RNA miktarı beklenenden düşük	- Örnek tam olarak parçalanmamış veya lizis homojen değil - Başlangıç materyali OttoNA-Zol kapasitesini aşmış - Küçük örnekte çökelti görünmeden kaybedilmiş - RNA pelleti aşırı kurutulduğu için tam çözünmemiş	- Doku tamamen dağılana kadar kontrollü aralıklarla homojenize edin; işlem sırasında ısınmayı sınırlayın - Doku, hücre ve reaktif oranlarını protokoldeki sınırlar içinde tutun <10 mg doku veya <10⁶ hücre için sulu faza 5–10 µg RNaz içermeyen glikojen ekleyin - Pelleti tamamen kurutmayın; 20–50 µL RNaz içermeyen suda pipetleyin ve 55–60°C’de 10–15 dakika bekletin
A260/A280 oranı düşük	- Lizis için yetersiz OttoNA-Zol hacmi kullanılmış - Homojenizasyon sonrası 5 dakikalık ayırma süresi uygulanmamış - Pellet aşırı kurumuş veya yalnızca kısmen çözünmüş - Fenol ya da kloroform kalıntısı sulu faza taşınmış	- Örnek miktarına uygun reaktif hacmi kullanın - Kloroform eklemeyen önce homojenatı 5 dakika oda sıcaklığında bekletin - RNA’yı tekrarlı pipetleme ve 55–60°C inkübasyonu ile tamamen çözün - Faz ayrımını 4°C’de gerçekleştirin; sınır tabakasına yaklaşımdan sulu fazı alın. Gerekirse RNA’yı yeniden çöktürüp %75 etanol ile yıkayın
A260/A230 oranı düşük	- Guanidin, fenol, tuz veya etanol kalıntısı - Yıkama yetersiz veya pellet çevresinde sıvı kalmış - Polisakkarit/proteoglikan içeriği yüksek örnek	- Pelleti %75 etanol ile ilave bir kez yıkamayı değerlendirin - Son yıkamadan sonra etanolü dikkatlice uzaklaştırın; pelleti aşırı kurutmaktan kaçının - Zor matrislerde laboratuvar doğrulaması yapılarak yüksek tuzlu çöktürme seçeneğini değerlendirin
RNA bütünlüğü zayıf	- Örnek alındıktan sonra geç işlenmiş veya hızlı dondurulmamış - RNaz kontaminasyonu oluşmuş - Hücreler OttoNA-Zol eklenmeden önce yıkanmış - Homojenizasyon sırasında örnek ısınmış	- Numuneyi hemen işleyin veya hızla dondurun; izole RNA’yı –70°C’de saklayın - RNaz içermeyen sarf kullanın, eldivenleri sık değiştirin ve çalışma yüzeylerini dekontamine edin - Hücre pelletini ön yıkama yapmadan doğrudan OttoNA-Zol ile parçalayın - Homojenizasyonu kısa aç-kapa döngüleriyle ve soğuk koşullarda yürütün

SORUN GİDERME

Gözlenen durum	Muhtemel kaynak	Düzeltilici yaklaşım
Genomik DNA kontaminasyonu	- Sulu faz alınırken interfazdan materyal çekilmiş - Örneğe göre yetersiz OttoNA-Zol kullanılmış - Kloroform miktarı önerilen orandan fazla olmuş - İlk homojenizasyondan sonra çözünmeyen materyal uzaklaştırılmamış	- Sulu fazın tamamını almaya çalışmayın; interfaz üzerinde güvenli bir hacim bırakın - Örnek/reaktif oranını düzeltin 0,2 mL kloroform / 1 mL OttoNA-Zol oranını koruyun - Gerekli örneklerde kloroformdan önce $12.000 \times g$'de berraklaştırma yapın; hassas RT-qPCR uygulamalarında RNaz içermeyen DNaz işlemi düşünün
RNA pelleti çözünmüyor	- Pellet tamamen kurumuş - Çözme hacmi yetersiz - Pellet tüp duvarına yapışmış veya yoğun biçimde sıkışmış	- Havada kurutmayı 5–10 dakika ile sınırlayın; vakum santrifüjü kullanmayın 20–50 μL RNaz içermeyen su veya uygun tampon ekleyin - Pelleti nazikçe ve tekrarlı pipetleyin; 55–60°C'de 10–15 dakika inkübe edin
Fazlar net ayrılmıyor	- Örnek hacmi reaktif hacminin %25'ini aşmış - Kloroform oranı veya karıştırma süresi uygun değil - Yağlı ya da partiküllü örnek doğrudan faz ayırımına alınmış	- Başlangıç örneği hacmini OttoNA-Zol hacminin en fazla %25'i olacak şekilde ayarlayın 1 mL OttoNA-Zol başına 0,2 mL kloroform ekleyin; tüpü iyice çalkalayıp 2–3 dakika bekletin - Yağlı örneklerde lizati $12.000 \times g$'de, 4–10°C'de 5 dakika berraklaştırıp üst fazı yeni tüpe aktarın
Pellet yıkama sırasında kayboluyor	- Pellet çok küçük veya gevşek - Süpernatant dökülerek uzaklaştırılmış - Etanol doğrudan pelletin üzerine basınçla verilmiş	- Küçük örneklerde glikojen taşıyıcı kullanın - Süpernatantı dökmek yerine mikropipetle kontrollü biçimde alın %75 etanolü tüp duvarından yavaşça ekleyin; pellet bölgesine doğrudan pipetleme yapmayın

Teknik destek için bize ulaşabilirsiniz info@ottosci.com

