

## Brazol

Código N°:

13-BR188: 100 mL

Armazenamento: 2°C a 8°C

**Estabilidade:** 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.

**DESCRIÇÃO:** 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 & Sacchi (1, 2, 3).

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.

**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: enxágüe 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

### ISOLAMENTO DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS:

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 ponteiras e tubos RNase free, bem como os reagentes adicionais, acima indicados em baixa temperatura.

### PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO:

#### 1 – Homogeneização:

- 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,
- 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 cm<sup>2</sup>) e não no número de células presentes. Uma quantidade insuficiente de Brazol poderá resultar na contaminação do RNA isolado, com DNA.
- Células de crescimento em suspensão:** Centrifugar as células até formar um *pellet*. Lisar as células com Brazol através de repetidas pipetagens. Utilizar 1 mL do reagente para cada 5 – 10 x 10<sup>6</sup> de células animais, de plantas ou de leveduras, ou para 1 x 10<sup>7</sup> células bacterianas. A lavagem excessiva das células antes da adição de Brazol deve ser evitada porque aumenta a possibilidade de degradação do mRNA.
- 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 desnaturantes;

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

### 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.