

Izolace nukleových kyselin

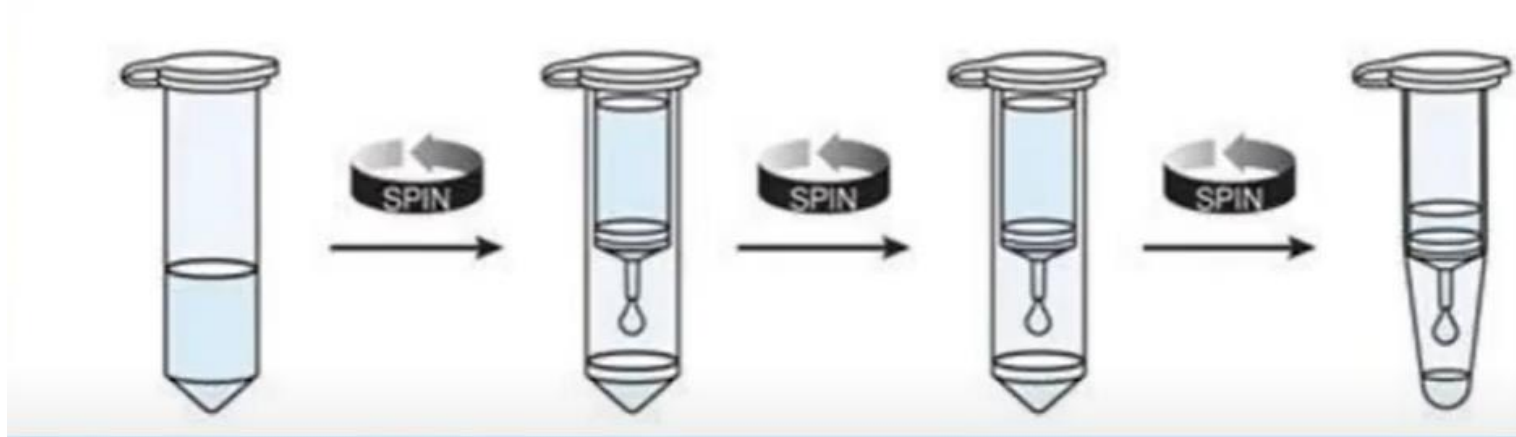


Typy metod

- Extrakční/precipitační metody
 - Využívají **rozdílné rozpustnosti**
 - Fenol-chloroformová extrakce
 - Fenol = organické rozpouštědlo
 - Po centrifugaci proteiny v organické fázi, denaturované proteiny a zbytky buněk v mezifázi, NK ve vodné fázi
 - Po přidání ethanolu k vodné fázi se NK vysráží
- Adsorpční metody
 - Využívají schopnosti NK **adsorbovat na silikátový povrch**
 - Komerční izolační soupravy (kolonky)
- Další (např. magnetická separace, centrifugace v hustotním gradientu)



Adsorpční metoda izolace NK

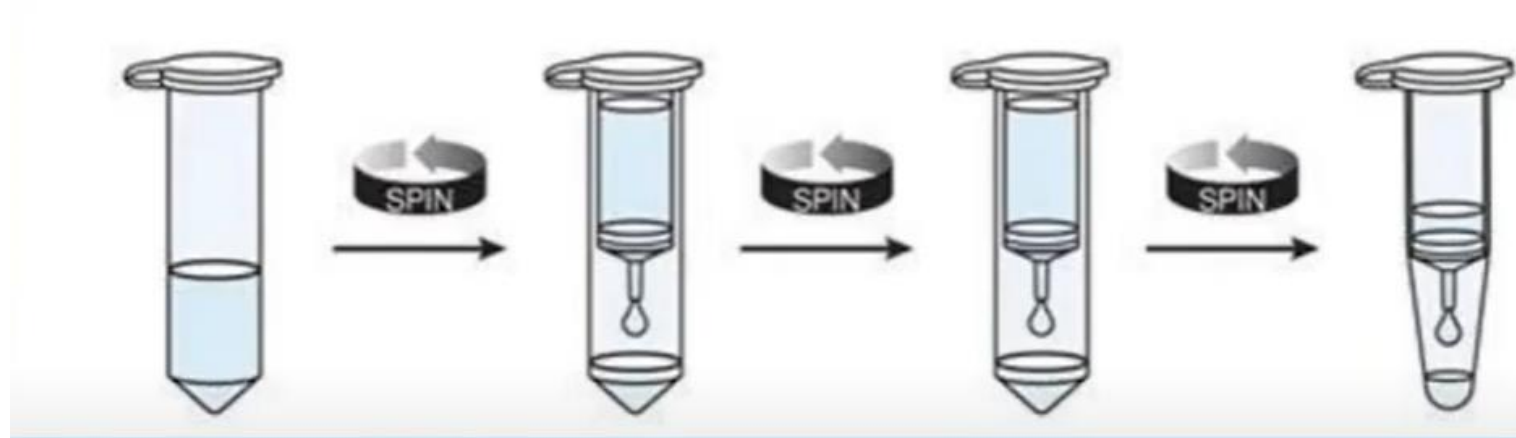


1. Lýza

- Lýza buněk → uvolnění NK (QIAzol, QIAshredder)
- Detergenty – narušují membránu buněk
- Enzymy – degradují proteiny a nukleázy



Adsorpční metoda izolace NK



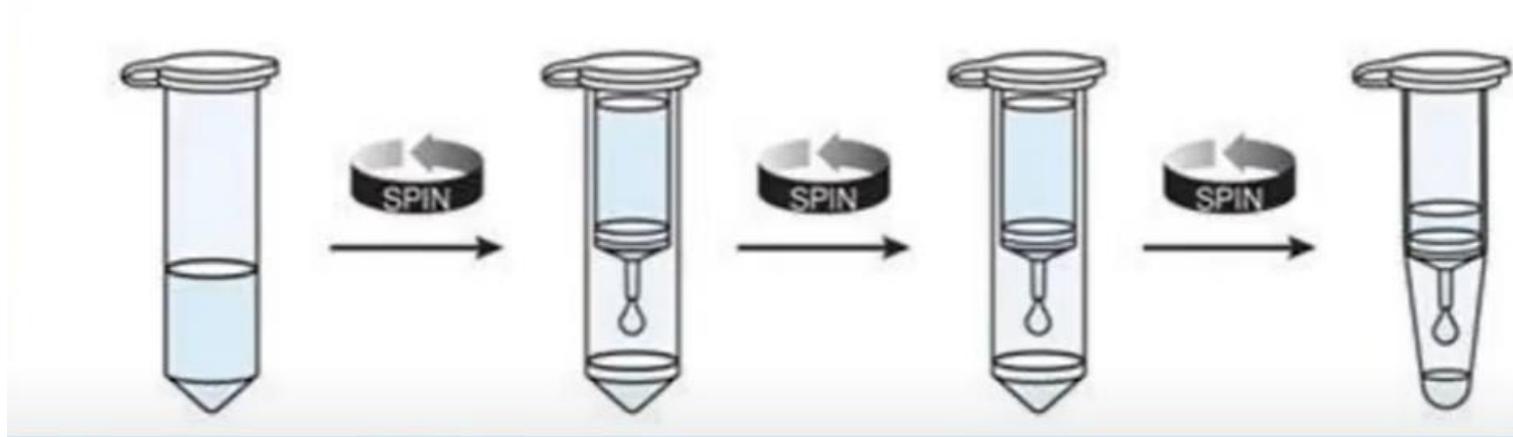
1. Lýza

2. Navázání NK

- Navázání NK na silikagel
- Pufr s chaotropními solemi – v jejich prostředí narušena vazba molekul vody na silikát → místo vody se váží NK
- Ethanol – podporuje navázání (dehydratace silikagelu)



Adsorpční metoda izolace NK



1. Lýza

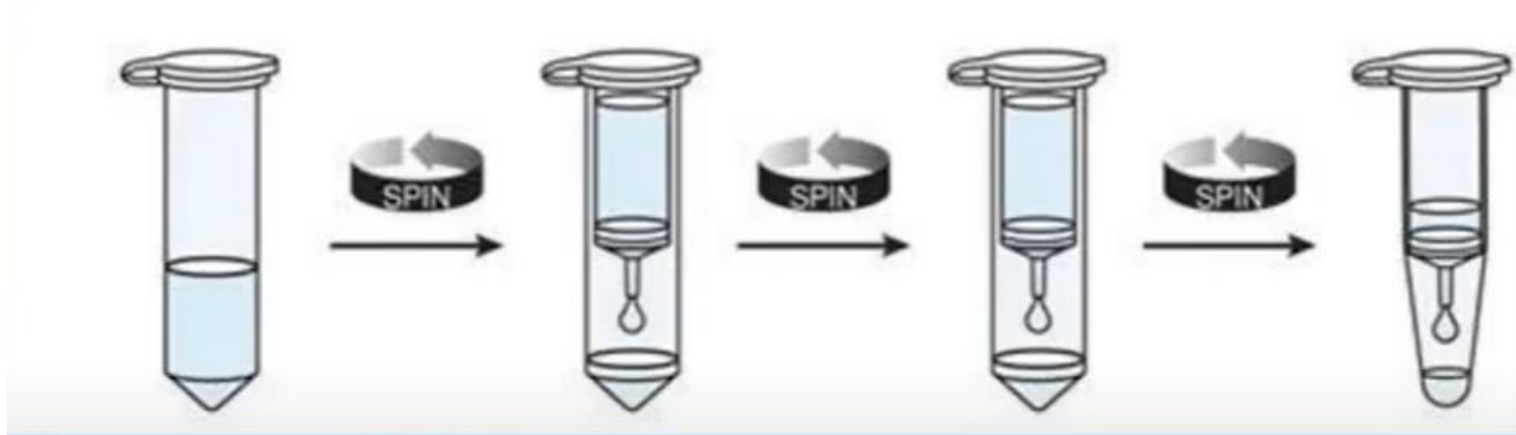
2. Navázání NK

3. Promývání

- Zbavení se nečistot
- Pufr s chaotropními solemi → odstraní proteiny
- Ethanol → odstraní soli



Adsorpční metoda izolace NK



1. Lýza

2. Navázání NK

3. Promývání

4. Eluce

- Eluce NK ze silikagelu
- U RNA voda bez RNáz (DNA pufr)



Comparative Study > [Sci Rep.](#) 2020 Jan 21;10(1):825. doi: 10.1038/s41598-020-57659-7.

Comparison of methods for miRNA isolation and quantification from ovine plasma

Kathryn Wright ¹, Kumudika de Silva ², Auriol C Purdie ¹, Karren M Plain ¹

Affiliations + expand

PMID: 31964966 PMCID: [PMC6972740](#) DOI: [10.1038/s41598-020-57659-7](#)

[Free PMC article](#)

[Full text links](#)

[Cite](#)

Abstract

microRNA (miRNA) are promising candidates for disease biomarkers as they are abundant in circulation, highly stable in biological fluids and may yield diagnostic biomarker signatures. The reported issues with miRNA isolation using traditional RNA reagents necessitates the optimisation of miRNA isolation from challenging samples. In this study we compared six commercial RNA extraction kits to evaluate their ability to isolate miRNA from ovine plasma. We also compared three methods for quantification of small RNA extracted from plasma to determine the most reliable. Using minimal sample inputs of fresh and frozen plasma from five sheep, we compared the six kits (Kit A-F) using quantitative PCR. Operational factors were also assessed for each kit. Kits A and B provided the best detection of the miRNA qPCR reference genes across fresh and frozen samples ($p < 0.001$) followed by Kit C. The Qubit and microRNA assay provided the least variation (% CV 5.47, SEM \pm 0.07), followed by the NanoDrop (% CV 7.01, SEM \pm 0.92) and Agilent Bioanalyzer (% CV 59.21, SEM \pm 1.31). We identify Kit A to be optimal for isolating miRNA from small volumes of fresh and frozen ovine plasma, and Kit B the top performing kit taking into consideration miRNA detection and operational factors. The Qubit fluorometer using a microRNA assay was the most reliable miRNA quantification method.



Babak Myeloma Group
Department of Pathophysiology
Faculty of Medicine, Masaryk University

> [Biotechniques.](#) 2020 Mar;68(3):159-162. doi: 10.2144/btn-2019-0093. Epub 2019 Dec 24.

Isolation of DNA-free RNA from human bone marrow mononuclear cells: comparison of laboratory methods

Tawakalitou Alabi ¹, Sweta B Patel ², Smita Bhatia ¹, Julie A Wolfson ¹, Purnima Singh ¹

Affiliations + expand

PMID: 31870171 DOI: [10.2144/btn-2019-0093](#)

[Free article](#)

[Full text links](#)

[Cite](#)

Abstract

RNA quality (purity and integrity) and quantity are of critical importance to ensure reliable gene expression analysis, reproducibility of RNA sequencing and microarray data and validation by RT-PCR. Currently available methods for isolating RNA either are labor intensive (requiring the use of toxic organic solvents and separate DNase treatment) or require automation (with extensive setup and startup costs). To optimize both the quality and quantity of RNA from bone marrow, we recommend stabilization and storage of bone marrow mononuclear cells in RNAprotect[®] Cell Reagent, followed by extraction using the RNeasy[®] Protect Cell Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). This method achieves optimal quantity and high-quality RNA for sequencing and RT-PCR while remaining efficient and cost effective.

**MUNI
MED**

Izolace DNA

- Izolace nebuněčné cfDNA
 - QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen)
 - Ze séra (plazmy)
- Izolace DNA z buněk
 - QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)
- Izolace DNA z malých množství buněk
 - QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen)



Izolace DNA/RNA

- Izolace DNA/RNA/miRNA z buněk a tkání
 - Allprep DNA/RNA/miRNA Universal Kit
- Izolace DNA/RNA z parafínových bločků
 - Allprep DNA/RNA FFPE
- Izolace DNA/RNA z buněk a tkání
 - Allprep DNA/RNA
 - Micro, Mini, 96 well



Izolace RNA

- Izolace celkové RNA
 - RNeasy Mini Kit (Qiagen)
 - Materiál: buňky, tkáně
 - Micro, Mini QIAcube, Midi, Maxi, 96 well



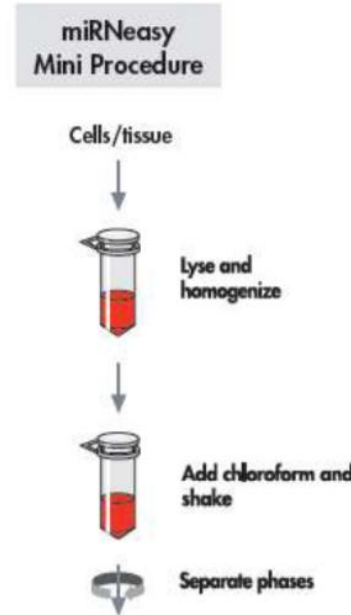
Izolace miRNA

- Izolace celkové RNA obohacené o krátké RNA
 - Ze séra/plazmy
 - miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen)
 - Z buněk a tkání
 - miRNeasy Mini Kit (Qiagen) – 50 mg tkáně nebo 1×10^7 buněk
 - miRNeasy Micro Kit (Qiagen) – 5 mg tkáně nebo 1×10^6 buněk
 - I 96 well



miRNeasy Mini Kit (Qiagen)

- Obsah skladujeme při pokojové teplotě (15-25°C) až 9 měsíců
- 1) K peletu buněk přidat 700 μ l Qiazol pořádně třepat a vortexovat 30 s!!! (>3 x 10⁶ buněk QIAshredder)
 - Fenol a guanidin thiokyanát- lýze, inhibice RNáz, odstranění buněčné DNA a proteinů
 - 2) Inkubovat 5 minut při pokojové teplotě. (i déle)
 - 3) Přidat 140 μ l chloroformu a pořádně třepat a vortexovat 30 s!!!
 - 4) Inkubovat 2,5 min při pokojové teplotě.
 - 5) Centrifugovat 15 min / 12 000 g / 4°C.
 - Vodní (RNA) a organická fáze(proteiny)



miRNeasy Mini Kit (Qiagen)

- 6) Odebrat 350 (2x 150+50) μ l horní vodní fáze.
- 7) !Pozn.: Odebíráme opatrně pomalu od hladiny raději vícekrát po menších objemech.
- 8) Přidat 1,5 objemu (525 μ l) 99,8% etanolu a promíchat opatrně pipetou.
 - Snižuje rozpustnost RNA a zvyšuje její dehydrataci -> lepší vazba na silikát
- 9) Přenést 700 μ l směsi na RNeasy Mini Spin kolonku a centrifugovat 1 min / max. rychlost. Supernatant slít a provést ještě jednou se zbytkem vzorku. (Možnost přidat Dnázů)



Add ethanol to aqueous phase



Bind total RNA including small RNAs



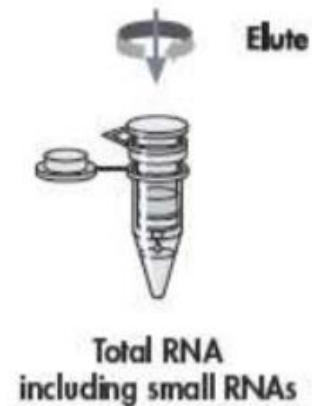
miRNeasy Mini Kit (Qiagen)

- 10) Promýt 700 μ l RWT pufru a centrifugovat 1 min / max. rychlost.
Supernatant slít.
- 11) Promýt 500 μ l RPE pufru a centrifugovat 1 min / max. rychlost.
Supernatant slít.
 - Pufry vymyjí nečistoty.
- 12) Opakovat krok 9, ale centrifugovat 2 min / max .rychlost.
- 13) Přenést RNeasy Mini Spin kolonku do nové 2 ml eppendorfky a centrifugovat 1 min / max. rychlost.



miRNeasy Mini Kit (Qiagen)

- 14) Přenést kolonku do nové 1,5 ml RNase-free eppendorfky a přidat 30 μ l RNase-free vody do středu kolonky.
- 15) Nechat stát cca 1 min a centrifugovat 1 min / max. rychlost.
 - Uvolní se vazba RNA-silikát
- 16) Ihned přemístit na led a změřit koncentraci a čistotu izolované RNA obohacené o krátké miRNA pomocí spektrofotometru Nanodrop-ND1000 a vzorek uskladnit při -80°C .



Co se může pokazit

- Neúplné rozdělení fází
- Velké množství vstupného materiálu -> přehlcení kolonky
- Kontaminace Rnázami
- Špatně odebraná vodní fáze

