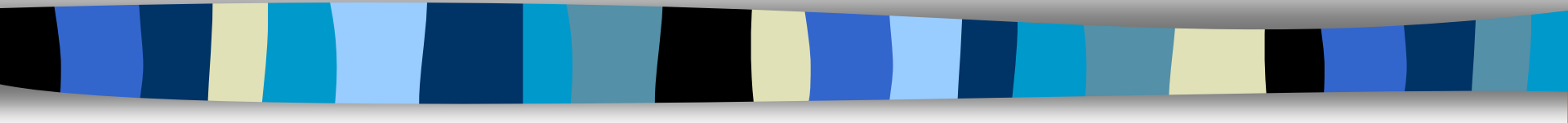


Moderní metody buněčné biologie



Izolace RNA



Extrakce a izolace RNA

Klasická metoda:

Chomczynski, P. and Sacchi, N. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate- phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159 (1987).

nevýhody - vyžaduje extenzivní používání organických rozpouštědel a je náročná na použití inhibitorů RNáz (např. e.g. guanidinium isothiocyanate (GITC))

výhoda - cena

komerčně dodávána jako ***TRI Reagent*** nebo ***TRIZol***.

Extrakce a izolace RNA

Klasická metoda:

Metoda je založena na fázové separaci - po centrifugaci vzorku ve směsi vodu nasyceného fenolu, chloroformu a GITC.

Po centrifugaci je RNA přítomná ve vodné fázi, zatímco DNA a proteiny jsou soustředěny v interfázi mezi horní vodnou a dolní organickou fází.

Po odebrání vodné fáze je získaná RNA precipitována pomocí 2-propanolu nebo ethanolu, vysušena a rozpuštěna v H_2O nebo TE pufri..

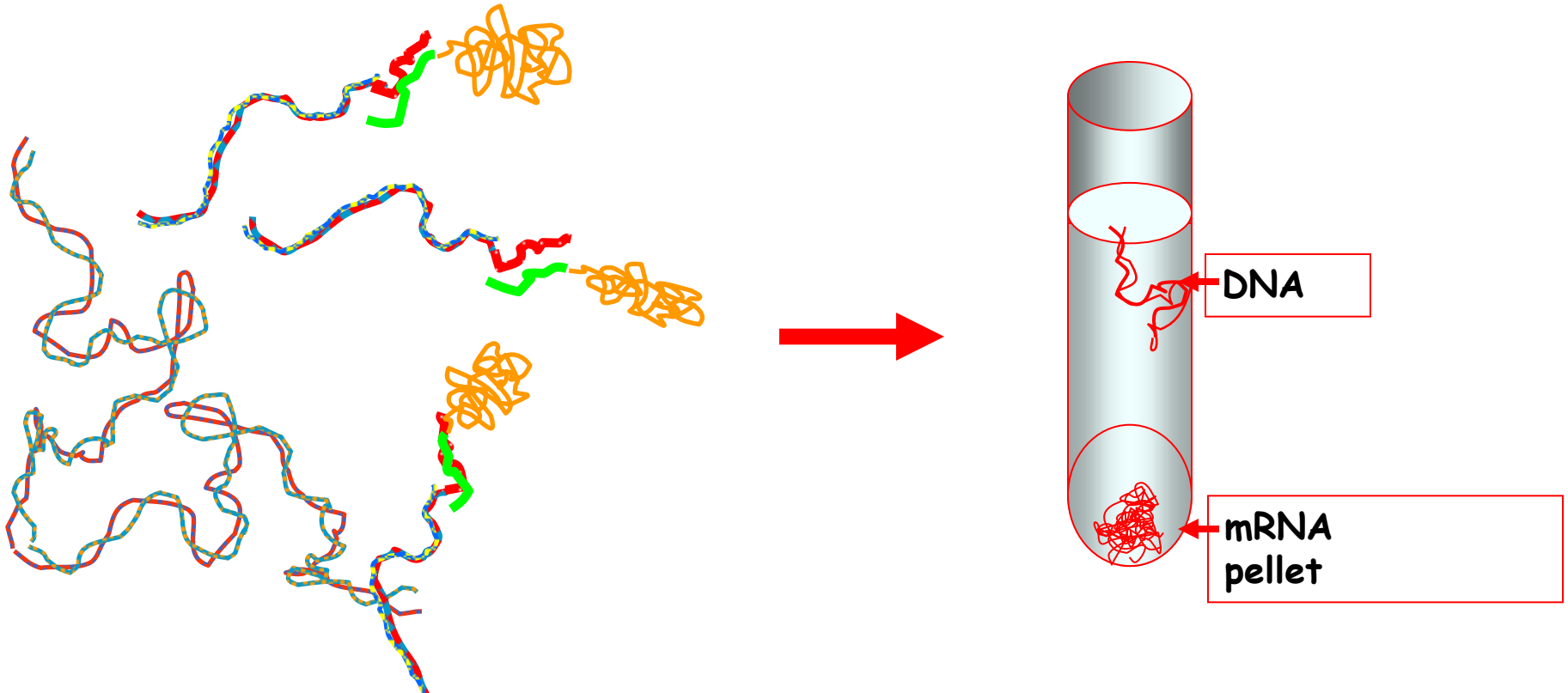


Důležité si uvědomit:

- ✓ je třeba bránit degradaci RNA prostřednictvím RNáz
 - nedotýkat se vzorků, pracovat v rukavicích
 - používat inhibitory RNáz, např. *GITC*
- ✓ odstranit kontaminující DNA (RNA)

Metody odstraňující DNA kontaminaci:

- ✓ oligo d(T) metody (použitelné pro eukaryotickou mRNA)
 - využití polyadenylovaného konce eukaryotické mRNA
 - hybridizace oligo d(T) s mRNA
 - separace vázané mRNA (centrifugací, magneticky)



Metody odstraňující DNA kontaminaci:

✓ pomocí DNázy

1. kontaminující DNA je rozložena rDNázou
2. DNáza je odstraněna



Extrakce a izolace RNA







Izolace pomocí komerčních kolonových kitů:

Buňky jsou lyzovány v roztoku s vysokou koncentrací chaotropních iontů (zároveň okamžitě denaturují RNázy), které napomáhají vazbě RNA na silika membránu.



Kontaminující DNA je odstraněna pomocí rekombinantní DNázy aplikované na membránu: membrána je poté, většinou dvoukrokově, promyta pufry, které odstraní soli, metabolity a zbylé buněčné makromolekuly.

Čistá RNA je eluována pomocí ultračisté vody bez RNáz nebo TE pufry.

Izolace RNA pomocí kitů

1 Homogenization of sample		30 mg
2 Cell Lysis		350 μ l RA1 3.5 μ l β -mercaptoethanol Mix
3 Filtration of lysate	 	1 min 11,000 x g
4 Adjust RNA binding conditions		350 μ l 70 % ethanol
5 Bind RNA	 	30 sec 11,000 x g

Izolace RNA pomocí kitů

<p>6 Desalt silica membrane</p>		<p>350 μl MDB</p> <p>1 min 11,000 x g</p>
<p>7 Digest DNA</p>		<p>95 μl DNase reaction mixture</p> <p>RT 15 min</p>
<p>8 Wash and Dry silica membrane</p>	<p></p> <p>1st and 2nd</p> <p>3rd</p>	<p>1st wash 200 μl RA2</p> <p>2nd wash 600 μl RA3</p> <p>3rd wash 250 μl RA3</p> <p>30 sec 11,000 x g</p> <p>2 min 11,000 x g</p>
<p>9 Elute highly pure RNA</p>	<p></p>	<p>60 μl RNase-free Water</p> <p>1 min 11,000 x g</p>



Stanovení koncentrace a čistoty RNA:

- spektrofotometricky

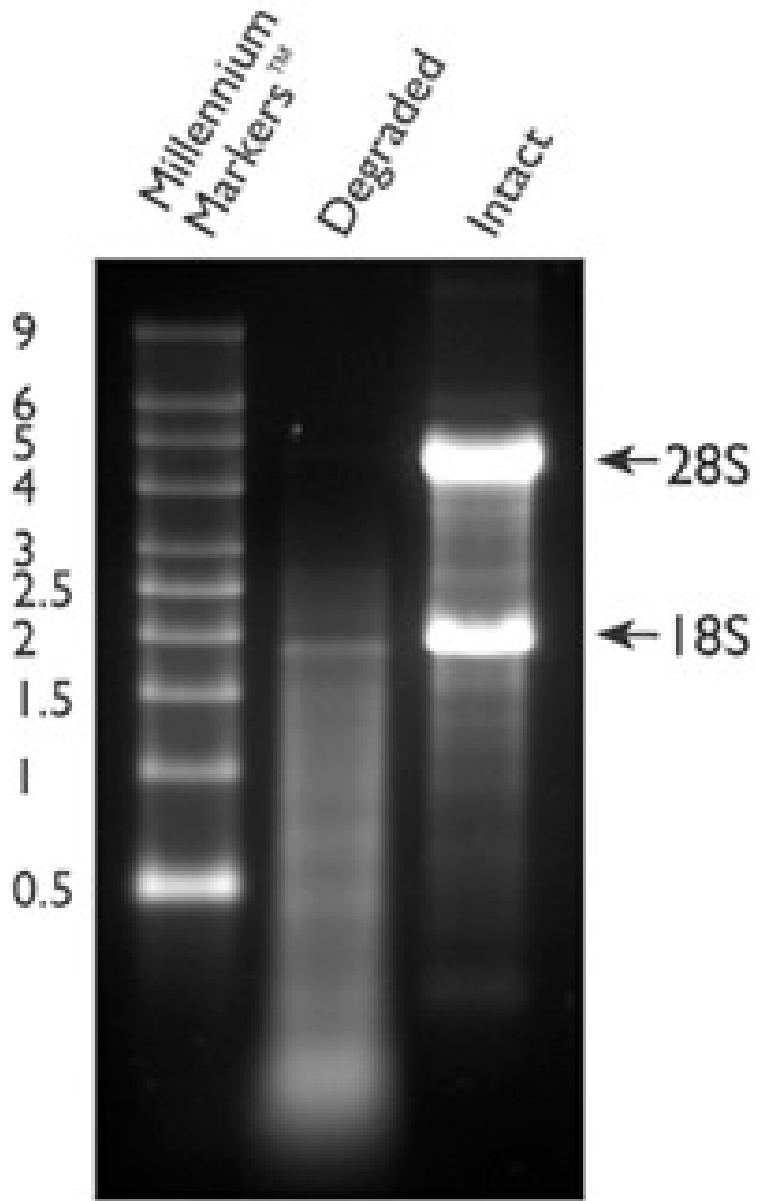
$A_{260} - 1.0 \sim 40 \mu\text{g/ml}$

$A_{260}/A_{280} \sim 2.0$

- gelová elektroforéza

- RNA analyzéry

Degradace RNA na gelové elektroforéze

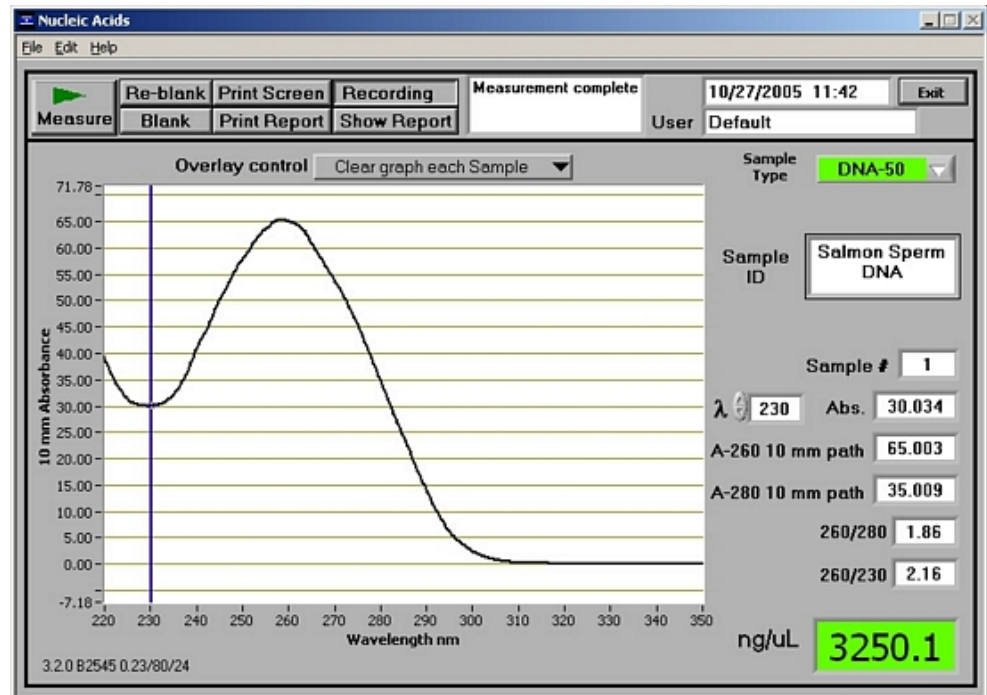


Nové technologie pro analýzu čistoty a koncentrace NK

NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer



- Small samples:** designed for 1 ul samples
- Dynamic range:** measures 2-3700 ng/ul (dsDNA) on a single sample.
- Full Spectrum** (220-750nm)
- 10 second** measurement time
- No cuvettes** or capillaries

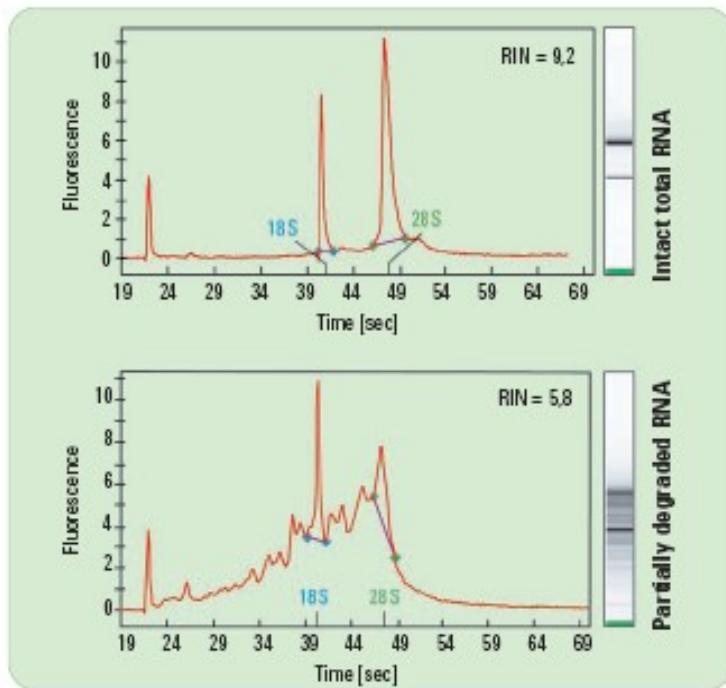


Nové technologie pro analýzu čistoty a koncentrace NK



Agilent 2100 Bioanalyzer

<http://www.chem.agilent.com/scripts/generic.asp?IPage=1565&indcol=N&prodcol=Y>





Podrobný popis:

- protokol pro izolaci celkové RNA z kultivovaných buněk pomocí kitu NucleoSpin®RNA II (cvičení Moderní metody buněčné biologie);
- úplná anglická verze protokolu:

http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/RNA%20and%20mRNA/UM_TotalRNA.pdf