

IZOLACE RNA

Izolace RNA

doc. RNDr. Jan Vondráček, PhD..

Metodiky izolace RNA

- celková buněčná RNA („total“ RNA) zahrnuje řadu typů RNA, které se mohou lišit svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi a tedy i nároky na jejich izolaci;
- více než 80 % buněčné RNA tvoří ribozomální RNA;
- zbytek tvoří mediátorová „messenger“ RNA (mRNA; cca 1 - 5 %), transferová RNA (tRNA) a různé typy nekódujících RNA, vč. miRNA, lncRNA apod.
- pro izolaci mRNA za účelem studia genové exprese se využívají jak metody vhodné pro izolaci celkové RNA, tak specifické postupy umožňující přípravu „čisté“ mRNA;

Metodiky izolace RNA

- ▶ dynamická regulace hladiny mRNA – detekce změn je zásadní pro studium změn exprese specifických genů;
- ▶ izolace celkové RNA – 2 základní metodiky:
 - ▶ extrakce pomocí organických rozpouštědel;
 - ▶ affinitní/adsorpční metody;
- ▶ izolace mRNA – pomocí oligo(dT) substrátů – kuličky, kolony apod.
 - ▶ jako zdroj – celková RNA;
 - ▶ přímo z buněčných/tkáňových lyzátů;

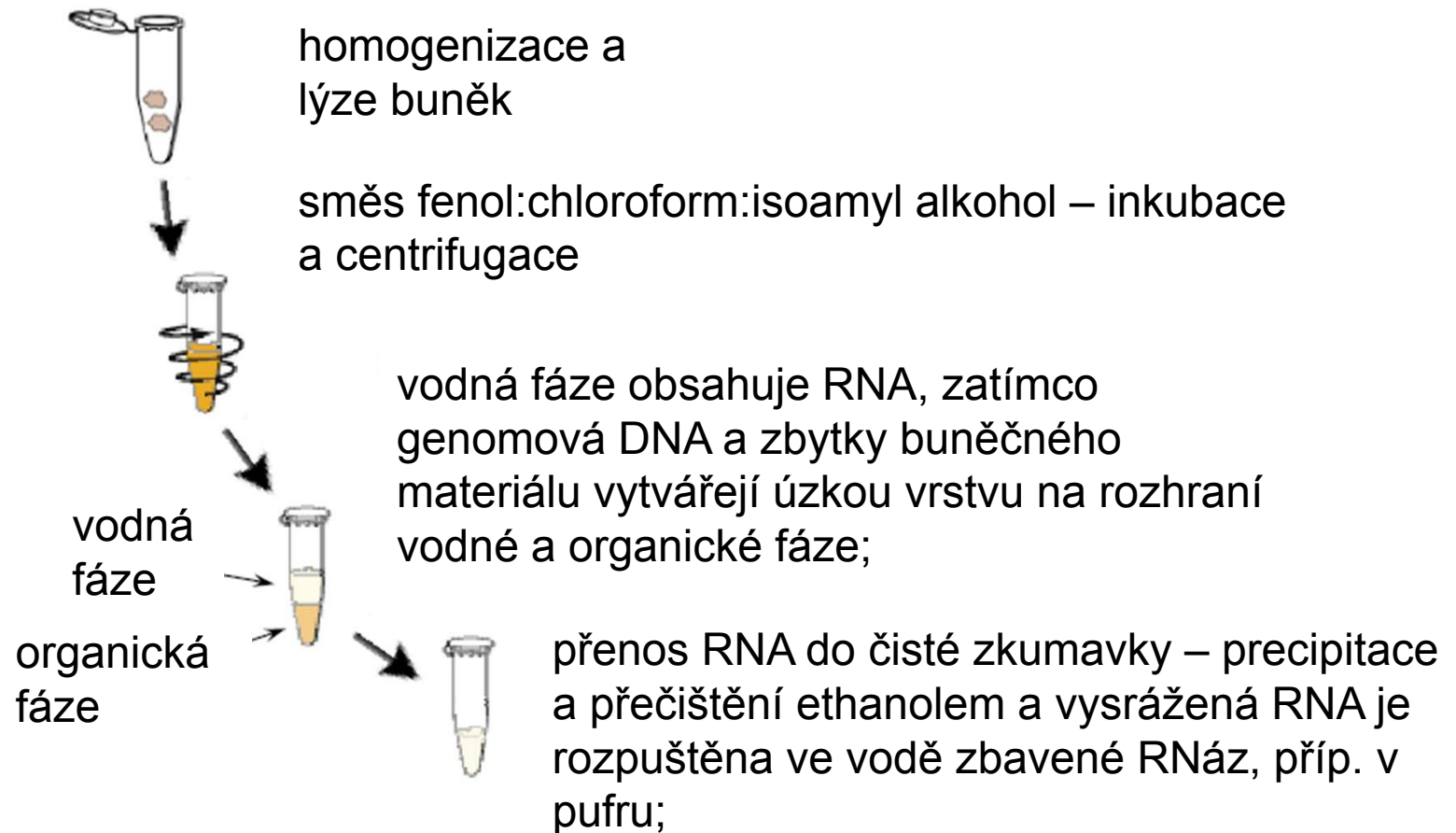
Důležité faktory ovlivňující izolaci RNA:

- ▶ je třeba bránit degradaci RNA prostřednictvím ribonukleáz (RNáz);
 - ▶ nedotýkat se vzorků, pracovat v rukavicích;
 - ▶ používat inhibitory RNáz, např. guanidin isothiokyanát (GITC);
- ▶ vedle proteinů je třeba také odstranit kontaminující DNA;
- ▶ základní kroky/cíle přípravy RNA:
 - ▶ rychlá a efektivní lýze buněk;
 - ▶ inaktivace RNáz;
 - ▶ denaturace komplexů nukleových kyselin s proteiny;
 - ▶ oddělení RNA od proteinů a DNA;

RNázy a ochrana před jejich působením

- RNázy jsou běžný laboratorní kontaminant (bakteriální a lidské zdroje) a uvolňují se během procesů vedoucích buněčné lýzi;
- ochrana: rukavice, používání RNase-free zkumavek, špiček a chemikálií;
- používání inhibitorů RNáz – především chaotropních reagensů (GITC apod.) narušujících stabilitu vodíkových můstků, hydrofobní interakce – denaturace proteinů a jejich inaktivace;

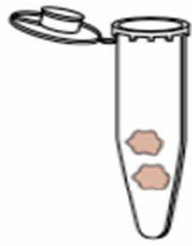
Izolace RNA pomocí organické extrakce



Výhody a nevýhody metody

- kompatibilní s různými typy vzorků a použitelná k izolaci malých i velkých množství RNA;
- nízké náklady;
- nevýhodou je nutnost používání agresivních organických rozpouštědel, časová náročnost a omezené množství vzorků (není to high-throughput metoda);
- RNA může být kontaminována DNA;

Afinitní purifikace RNA



homogenizace a lýze buněk



nanesení lyzátu na kolonu (obsahuje jak nukleové kyseliny, tak zbytky buněk);



promytí ethanolem – odstraní nečistoty, zatímco nukleové kyseliny zůstanou navázané na membránu; odstranění kontaminující DNA pomocí DNázy;



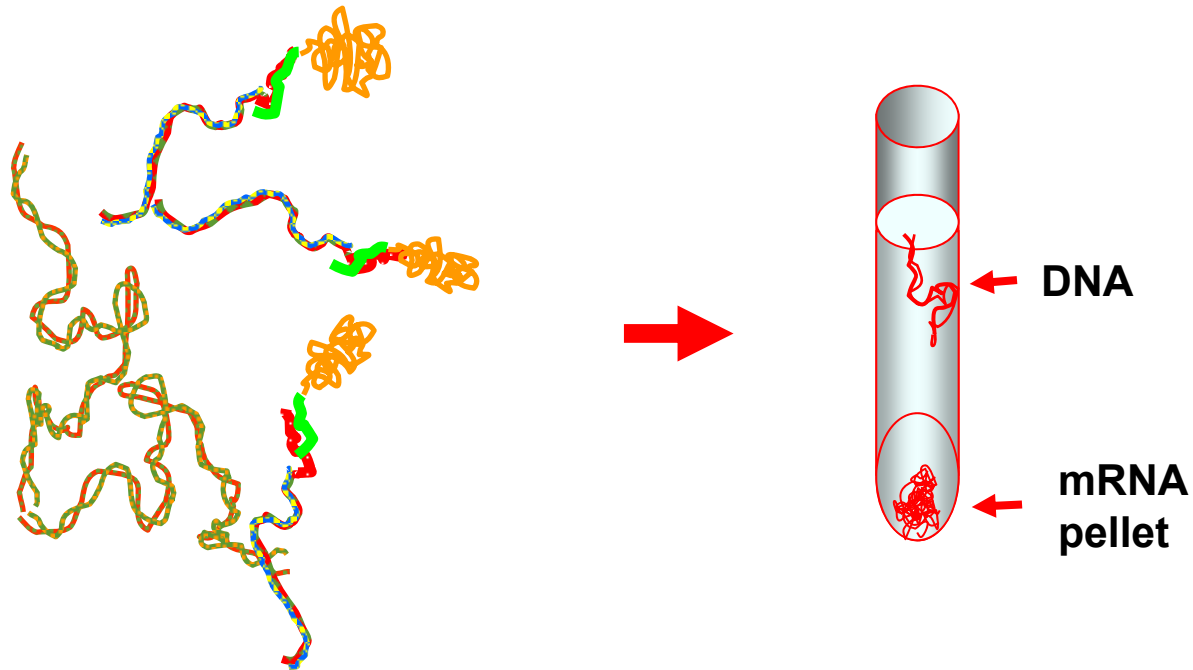
rozpuštění RNA ve vodě – další zpracování;

Výhody a nevýhody metody







- ▶ nepotřebujeme organická rozpouštědla; varianty kompatibilní se širokým spektrem vzorků;
 - ▶ pomocí DNázy eliminujeme kontaminující DNA;
 - ▶ vysoce kvalitní RNA;
 - ▶ nevýhoda: nákladnější;
-
- ▶ v rámci cvičení – afinitní purifikace RNA pomocí kolonek;

Izolace mRNA





- mRNA obsahuje polyA konec na 3' konci molekuly;
- to umožňuje využít oligo(dT) próby v různé formě k izolaci mRNA;
- hybridizace oligo d(T) s mRNA - separace vázané mRNA (centrifugací, magneticky);



Izolace RNA pomocí kitu

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

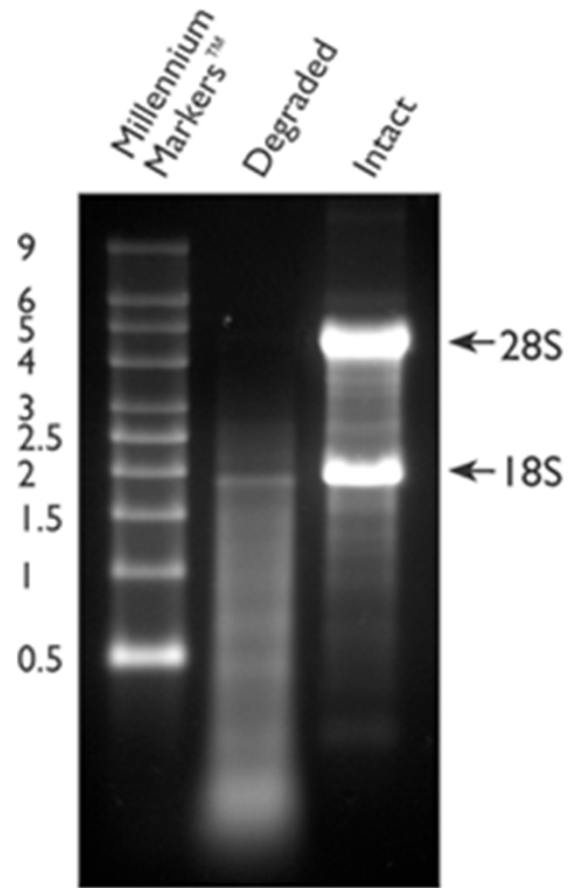
Izolace RNA pomocí kitu

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

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:

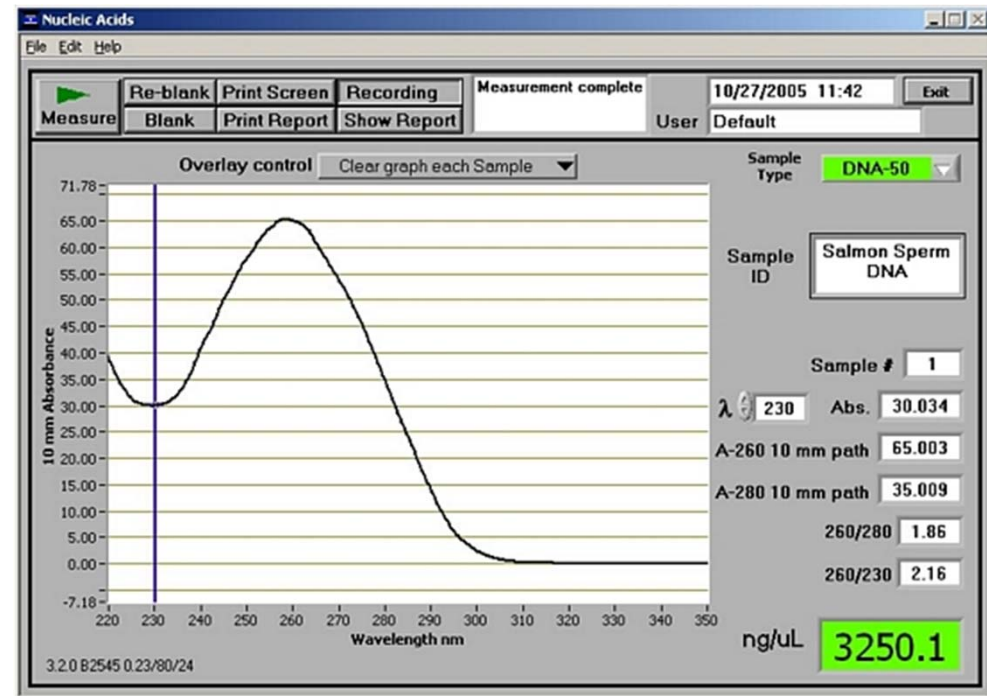


➤ ribozomální RNA;

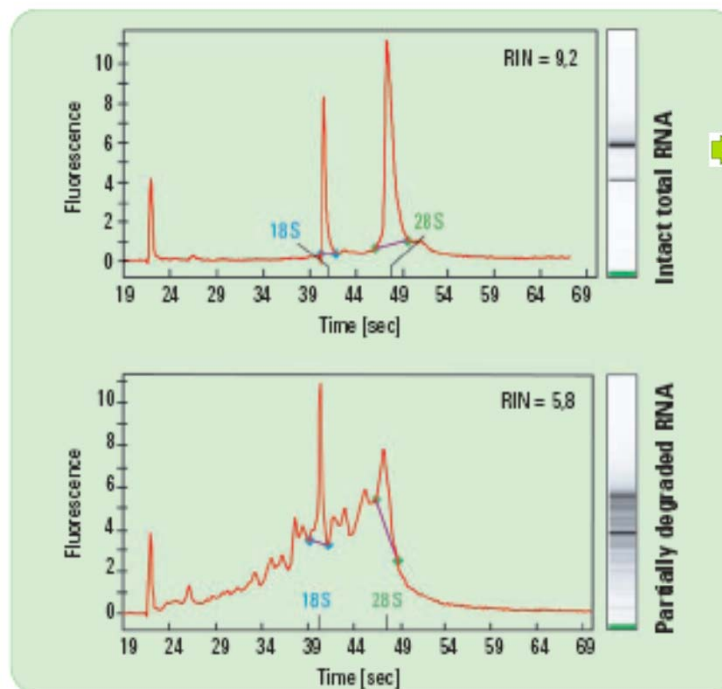
Nové technologie pro analýzu čistoty a koncentrace NK



- ▶ malý objem vzorku (1-2 mikroL);
- ▶ velký dynamický rozsah (jednotky – tisíce ng NK/mikroL);
- ▶ kompletní spektrum (220 -750 nM);
- ▶ rychlé měření, nepotřebujeme specif. kapiláry/kyvety;



Nové technologie pro analýzu čistoty a koncentrace NK



→ ribozomální RNA

příklad: Agilent 2100 bioanalyzer