

Úloha: Izolace RNA fenol-chloroformem

- 3 ml bakteriální kultury centrifugovat 10 000 × g / 3 min.
- pelet resuspendovat v 800 µl lyzačního roztoku (na 1 litr deionizované vody: **octan sodný** 2,7 g, **SDS** 5 g, **EDTA** 0,34 g, pH 5,5)
- přidat **skleněné kuličky** (0,8 g, 425 – 600 µm v průměru)
- vortexovat 2 – 3 min. při 2 000 ot.
- centrifugace **10 000 × g / 3 min.**
- supernatant (500 µl) přemístěn do čerstvých 1,5 ml mikrozkuvek
- supernatant smíchat s 500 µl nasyceného **fenolu** (pH 5,5) a inkubovat **5 min. / 68°C** za pravidelného míchání
- centrifugace 10 000 × g / 3 min.
- vodnou fázi (450 µl) přemístit do čerstvých 1,5 µl mikrozkuvek a smíchat s **chloroformem** (450 µl)
- centrifugace 10 000 × g / 3 min.
- vodnou fázi (400 µl) přemístit do čerstvých 1,5 µl mikrozkuvek a smíchat se **100 % etanolem** (800 µl) a 3 M octanem sodným (1/10 objemu)
- centrifugace 10 000 × g 10 min.
- pelet promýt **70 % ledovým etanolem** a sušit ve vakuu
- suchou RNA resuspendovat v 5,5 µl dH₂O
- každý vzorek smíchat s 19,5 µl RNA denaturační směsí (50 µl 10 × **MOPS** [10 × 3-N-morpholino propanesulfonic acid: 0,2 M MOPS, 50 mM octan sodný a 10 mM EDTA], 250 µl **formamid**, 90 µl **formaldehyd**; pH 7)
- veškeré skleněné pomůcky ošetřit **diethyl pyrokarbonátem (DEPC)** k inaktivaci RNázové aktivity
- izolovanou RNA analyzovat na 1,5 % agarozo/formaldehydovém gelu (140 V 20 – 40 min.)
- nanášecí (loading) pufr: 1 × MOPS pufr