

## **Izolace RNA**

prof. RNDr. Jan Vondráček, Ph.D.

## 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;

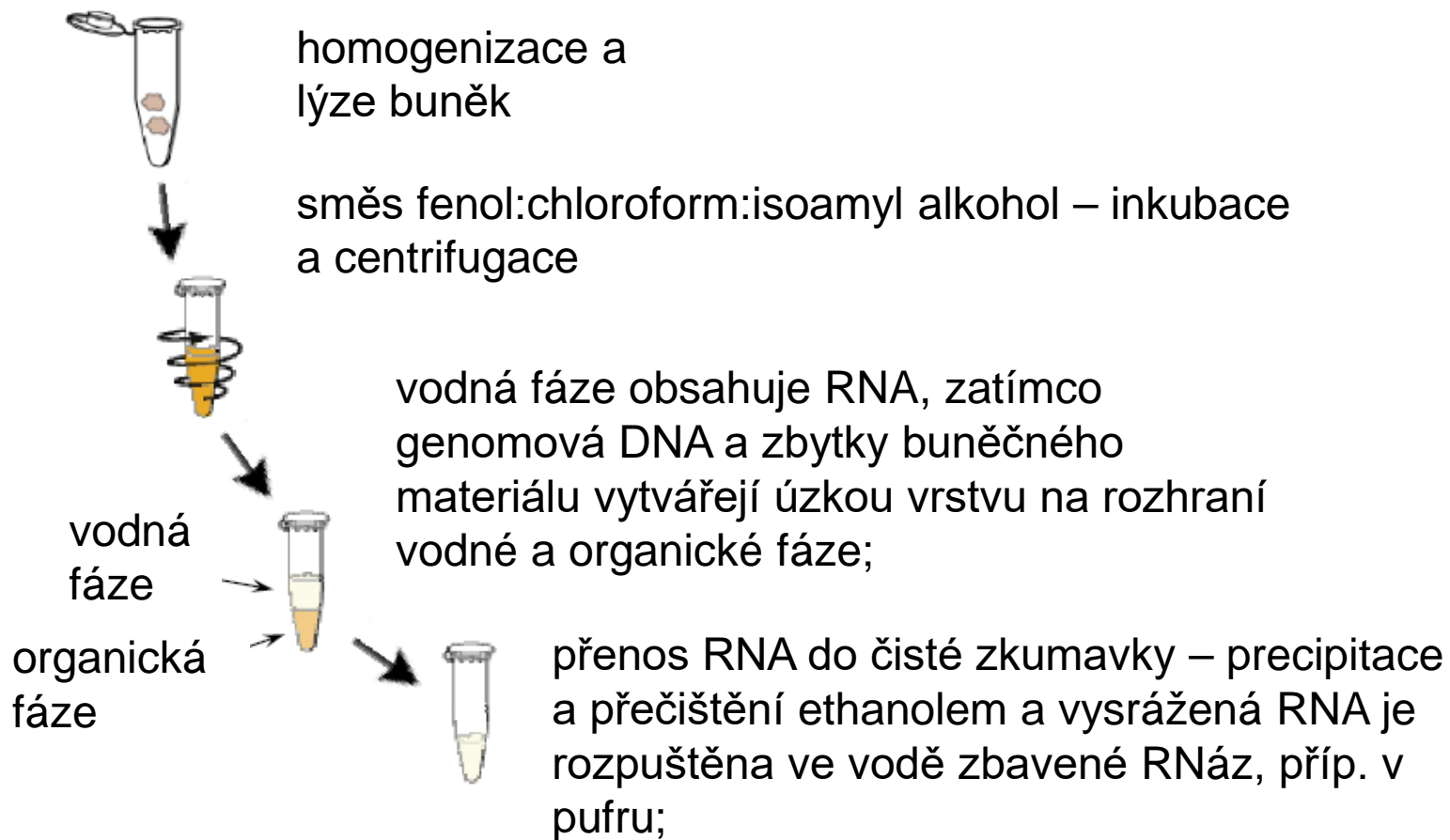
## Důležité faktory ovlivňující izolaci RNA:

- ▶ 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;

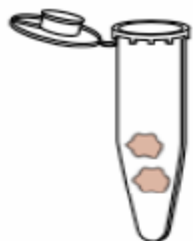
## Izolace RNA pomocí organické extrakce



## 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



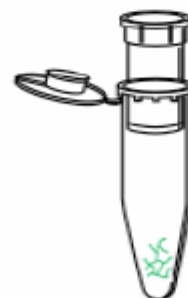
homogenizace a lýze buněk



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



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



rozpuštění RNA ve vodě – další zpracování;

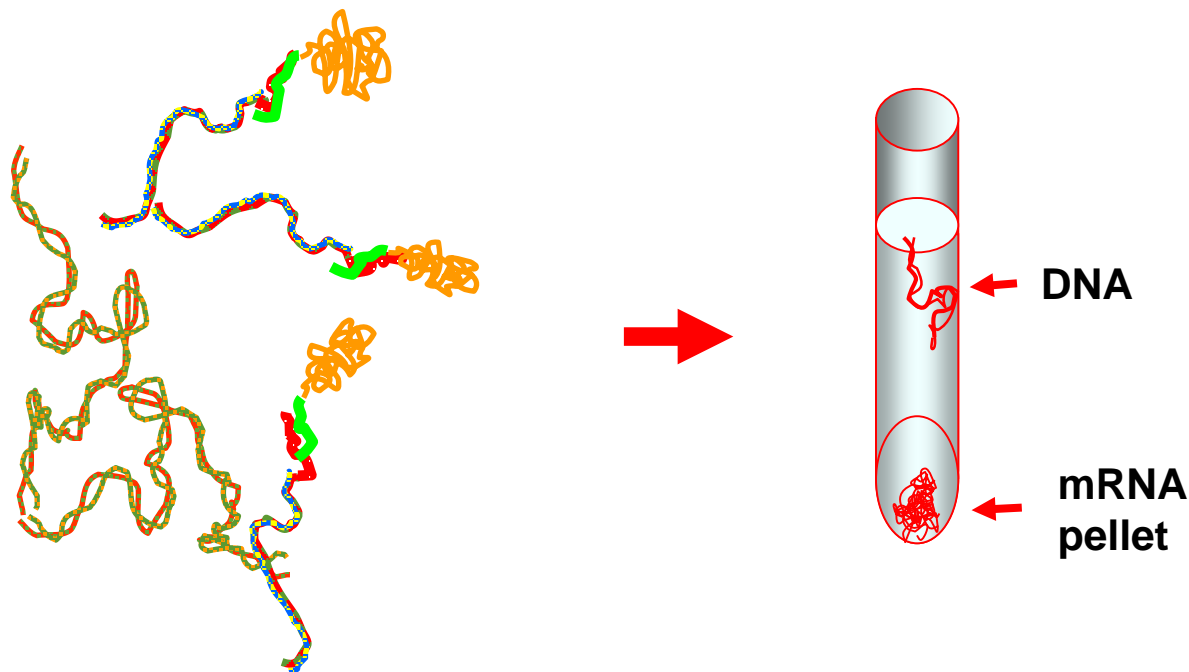


## Výhody a nevýhody metody







- ▶ 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


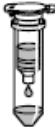




- ▶ mRNA obsahuje polyA konec na 3' konci molekuly;
- ▶ to umožňuje využít oligo(dT) próby v různé formě k izolaci mRNA;
- ▶ hybridizace oligo d(T) s mRNA - separace vázané mRNA (centrifugací, magneticky);



## Izolace RNA pomocí kitu

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

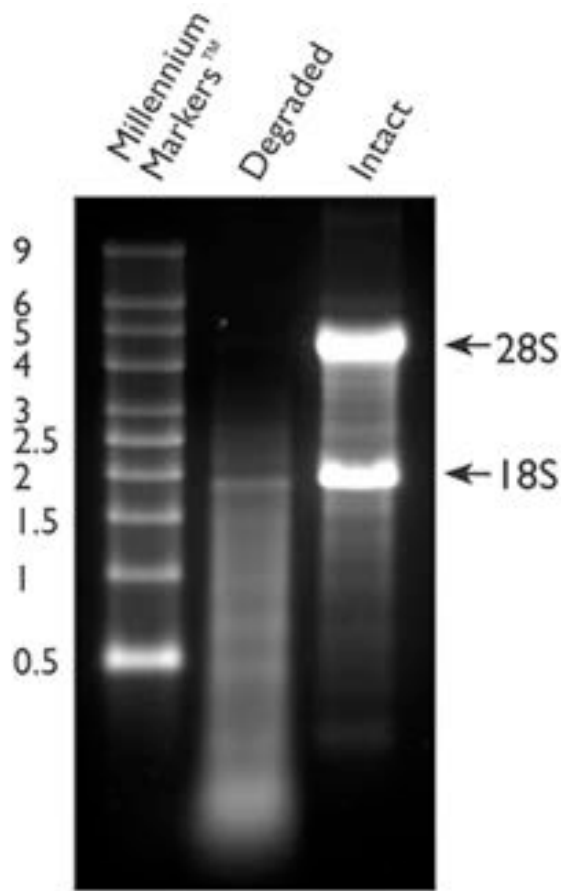
## Izolace RNA pomocí kitu

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

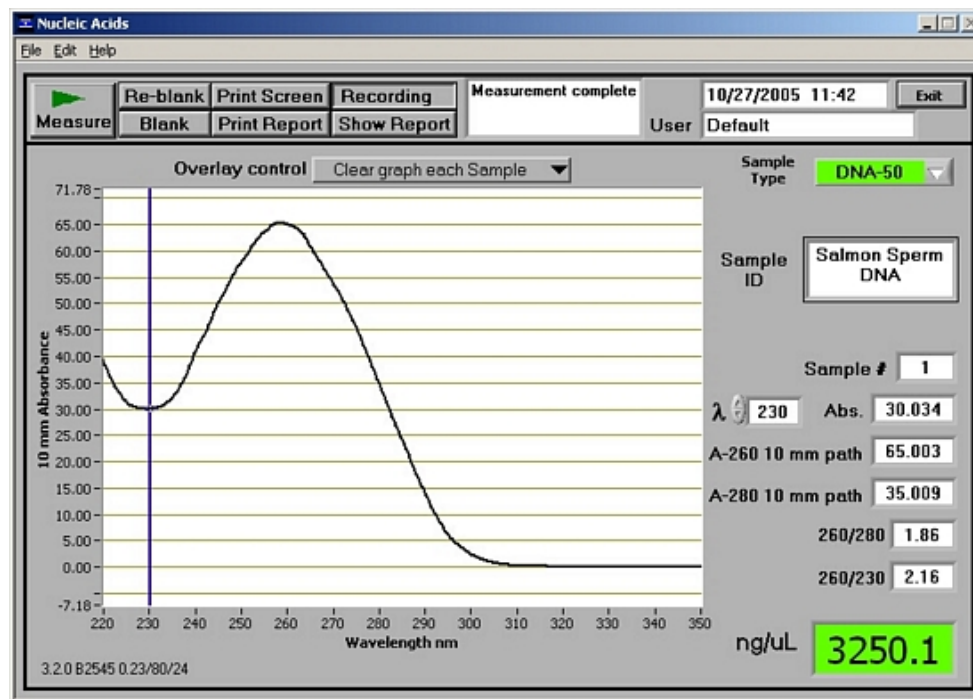


► ribozomální RNA;

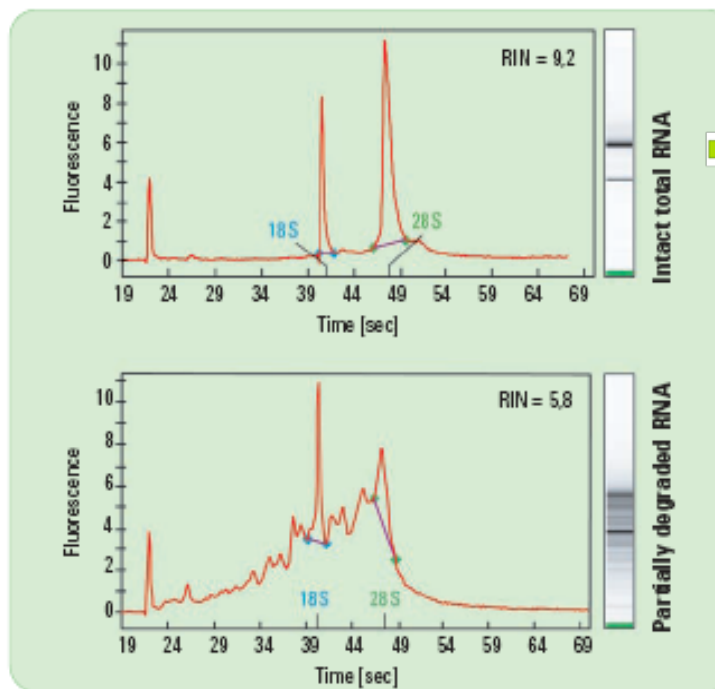
## Nové technologie pro analýzu čistoty a koncentrace NK



- ▶ 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