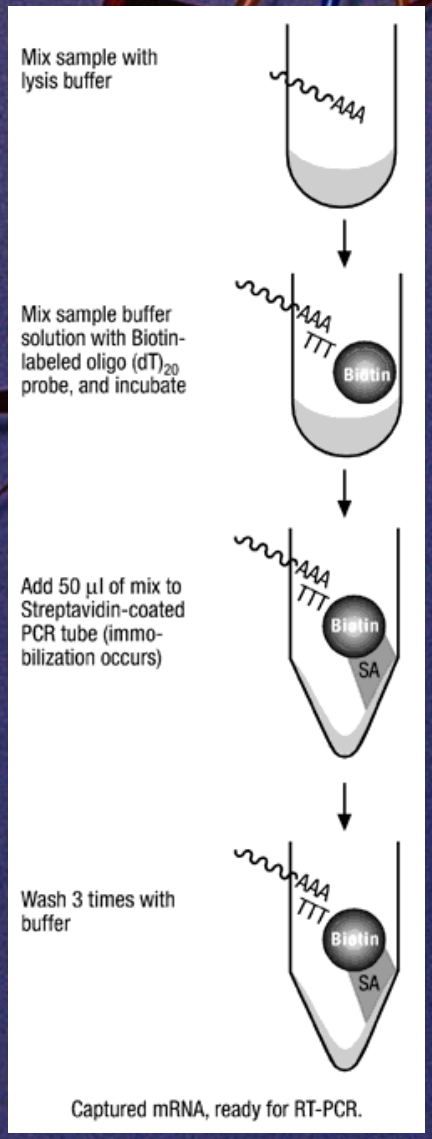
Izolace RNA

- RNA je náchylná na degradaci ribonukleázami
  - Inhibitory RNáz, sterilní boxy, DEPC-H_2O, rukavice!
- Izolace RNA fenolovou extrakcí je podobná izolaci DNA s následujícími rozdíly:
  - Extrakce v guanidinových solích
  - Fenolové extrakce při pH 5-6 (trizol)
  - Odstranění DNA DNázami bez RNáz
  - Selektivní srážení RNA pomocí LiCl
  - Afinitní chromatografie na olido-dT kolonách pro **izolaci mRNA**

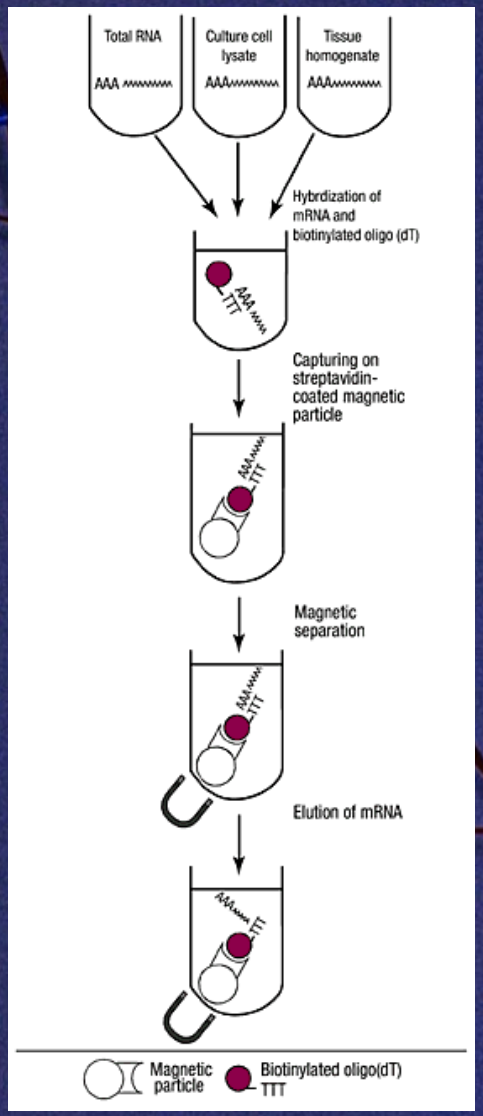
Izolace mRNA

- mRNA tvoří pouze malý podíl z celkové RNA, proto je její izolace obtížná
- Pro izolaci se využívají
  - Tradiční metody, kdy se nejprve izoluje celková RNA, která je následně separovaná na mRNA, rRNA a tRNA
  - Metody využívající afinitu poly(A) konce u mRNA a biotinem značené oligo(dT) sondy
    - Sonda se v lyzátu selektivně váže na mRNA, aniž by interagovala s DNA nebo jinými RNA
    - Hybridní molekuly biotinylované dT-A mRNA jsou imobilizovány na pevném podkladu pokrytém streptavidinem

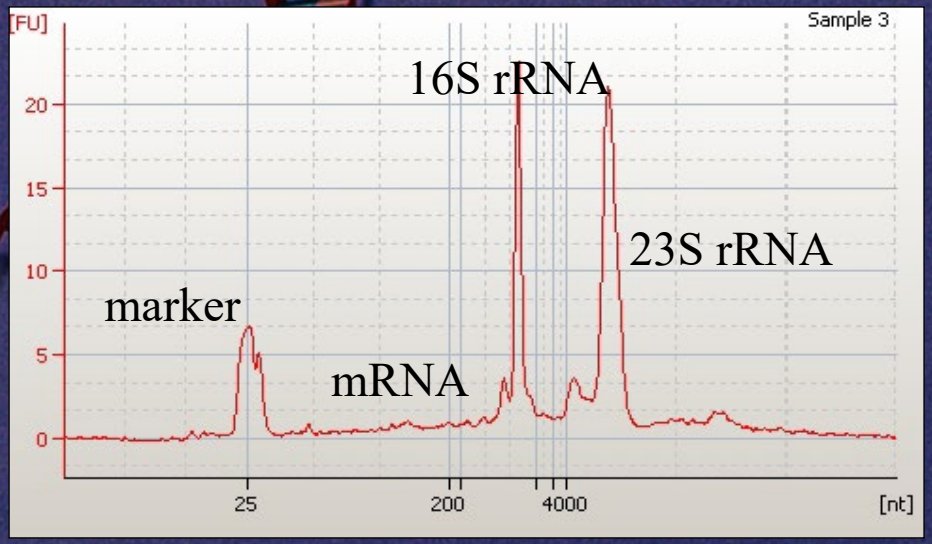
- Streptavidinem pokryté mikrozkumavky



- Streptavidinem pokryté magnetické částice



RNA separovaná na bioanalyzátoru Agilent



Vzorek RNA izolovaný TRIzolem po ošetření DNázou,
RNA integrity number algoritmus pro posouzení integrity **RIN = 8,8**

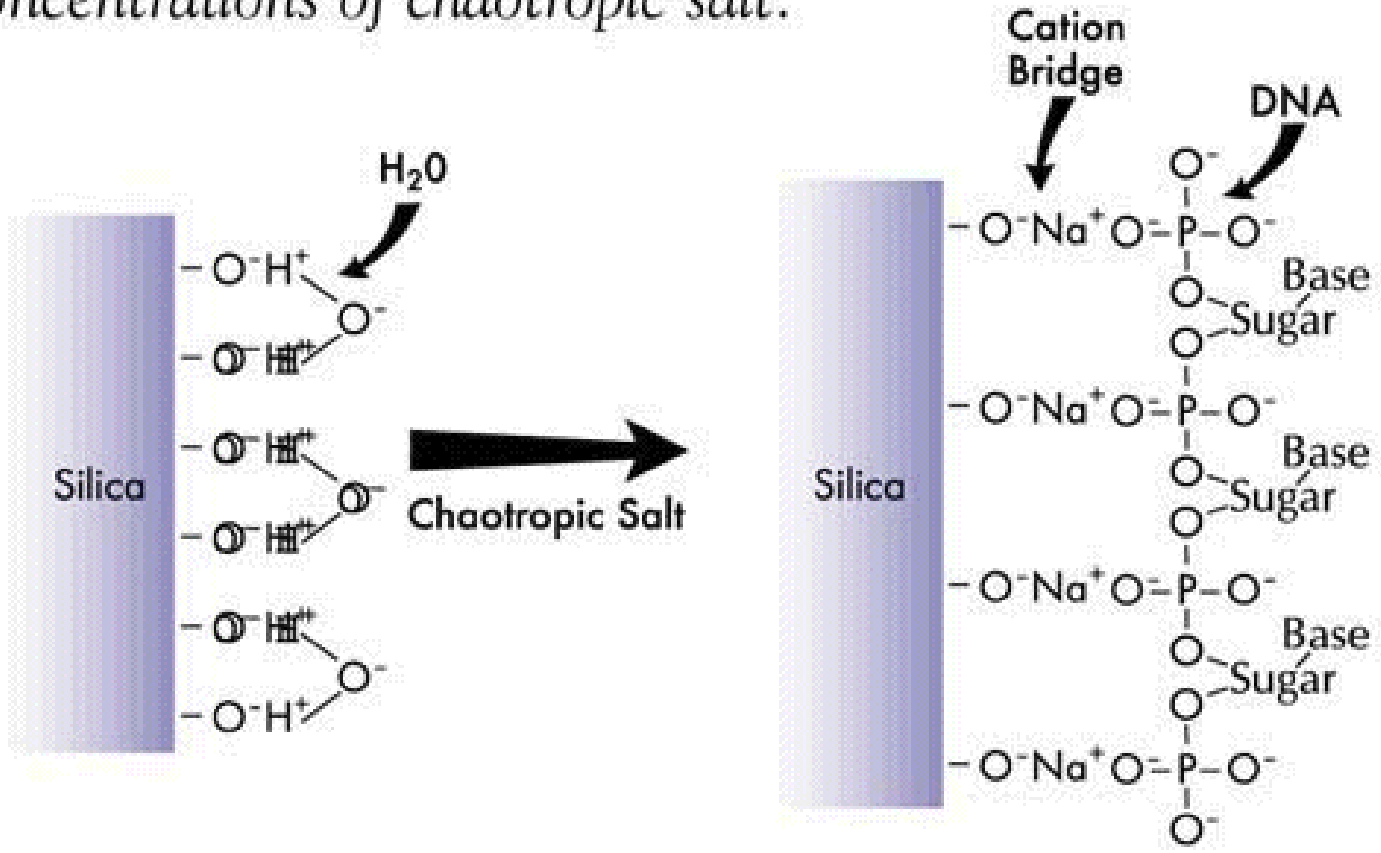
Adsorpční metody

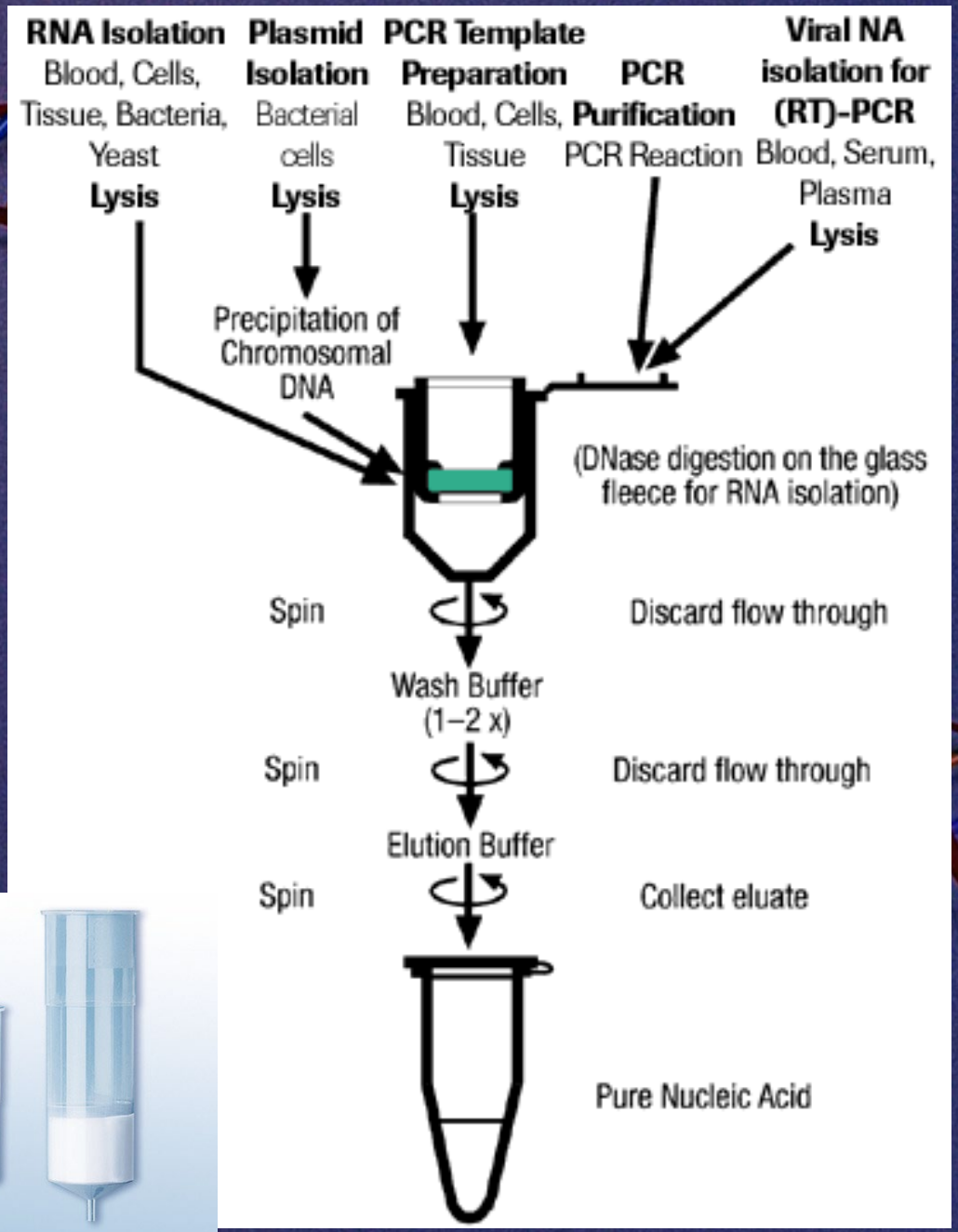
- Využívají schopnost nukleových kyselin adsorbovat se na povrchy z **oxidu křemičitého** (kolonky do centrifugačních mikrozkumavek) v přítomnosti chaotropní soli (Vogelstein and Gillespie, 1979)
  - guanidin thiokyanát
  - guanidin hydrochlorid
- Síla vazby závisí na
  - Typu nukleové kyseliny (DNA nebo RNA)
  - Iontové síle
  - pH roztoku
- Promývání pro odstranění proteinů a dalších kontaminant
- Eluce DNA pufrem s nízkou koncentrací solí nebo H_2O
- Rychlá metoda, vysoký výtěžek (malé fragmenty), vysoká čistota

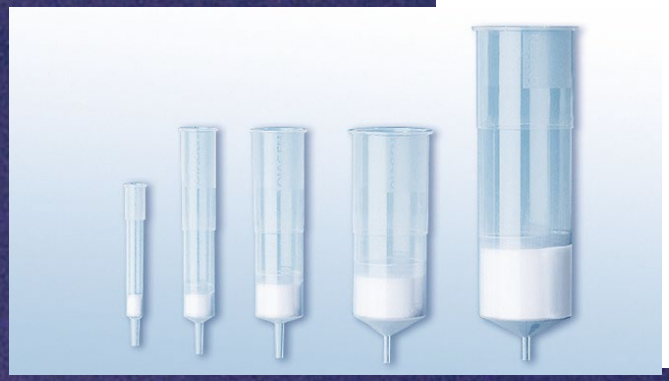
Mechanismus interakce DNA s oxidem křemičitým

Fig. 1

A possible mechanism for silica binding of DNA in high concentrations of chaotropic salt.




RNA Isolation
Blood, Cells, Tissue, Bacteria, Yeast
Lysis
Plasmid Isolation
Bacterial cells
Lysis
PCR Template Preparation
Blood, Cells, Tissue
Lysis
PCR Purification
PCR Reaction
Viral NA isolation for (RT)-PCR
Blood, Serum, Plasma
Lysis
Precipitation of Chromosomal DNA
(DNase digestion on the glass fleece for RNA isolation)
Spin
Discard flow through
Wash Buffer (1–2 x)
Spin
Discard flow through
Elution Buffer
Spin
Collect eluate
Pure Nucleic Acid

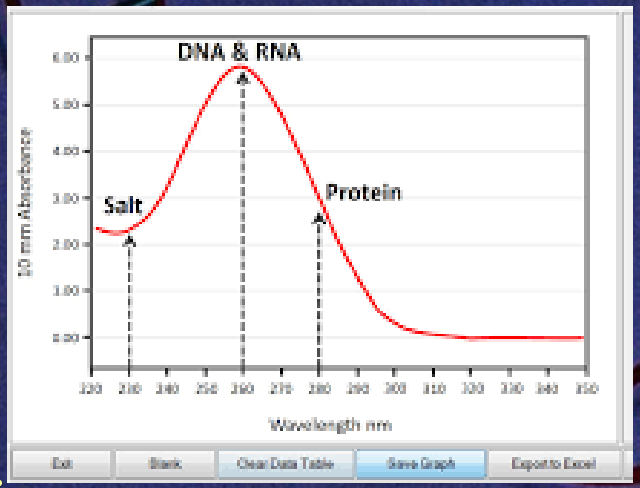


Analýza a kvantifikace

SPEKTROFOTOMETRICKÁ METODA

- Nukleové kyseliny absorbují UV záření s maximem absorbance v oblasti vlnové délky okolo 260 nm
- Koncentraci stanovujeme na základě empirie:

DNA	A_{260}	1.0 ≈ 50 µg/ml
	A_{260}/A_{280}	1.6 - 1.8
RNA	A_{260}	1.0 ≈ 40 µg/ml
	A_{260}/A_{280}	~2.0



- Vhodná metoda pro měření vzorků, které jsou
  - V dostatečné koncentraci
  - Dostatečně čisté bez významného množství kontaminant