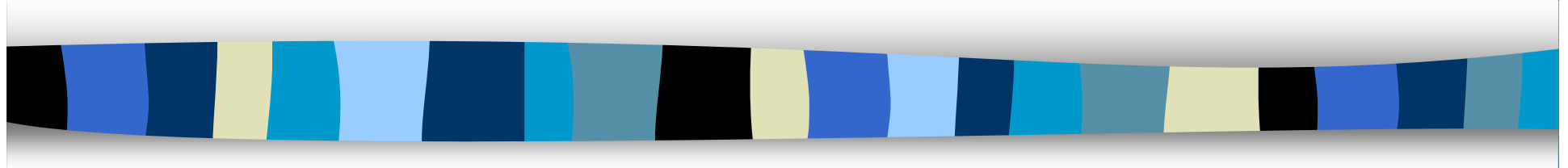


Moderní metody buněčné biologie



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 H₂O nebo TE pufro..

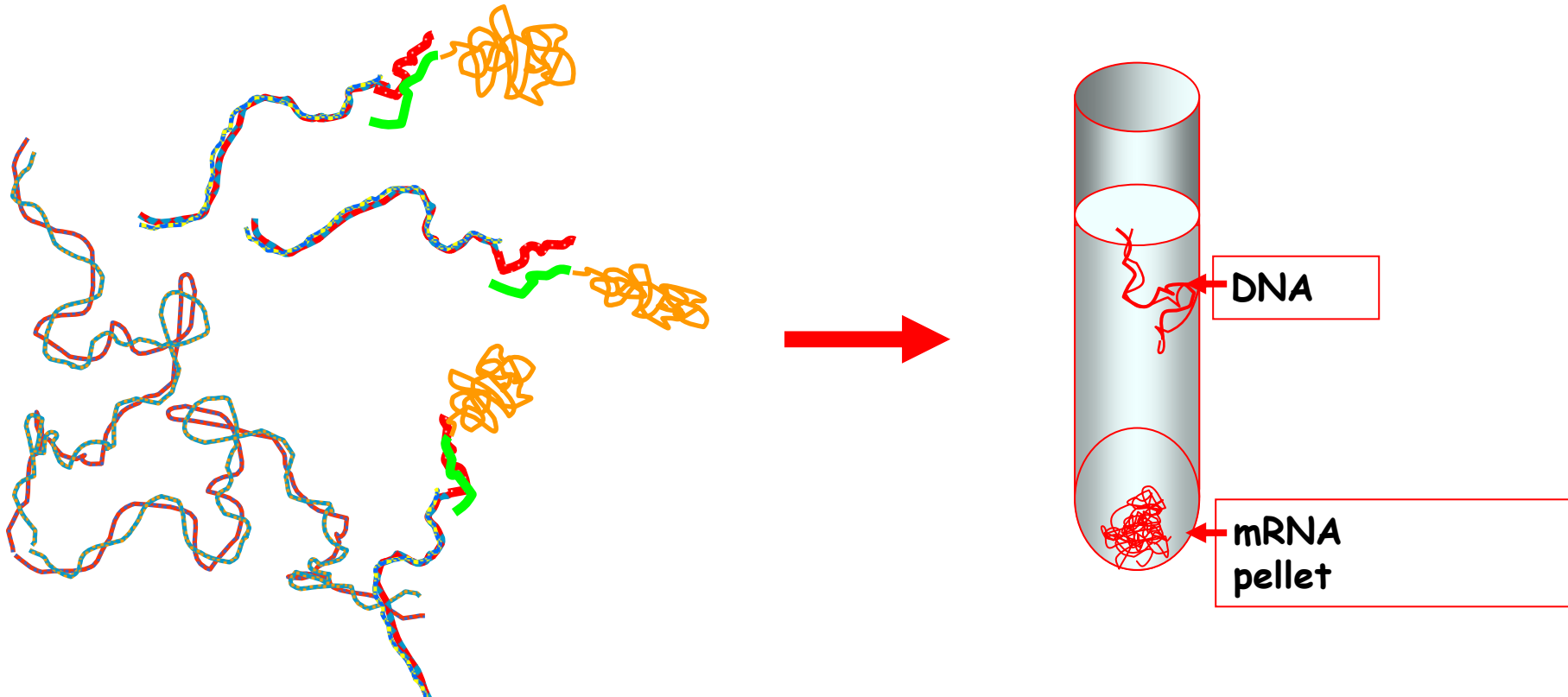


Důležité si uvědomit:

- ✓ 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 dvoustupňově, promyta pufrů, které odstraní soli, metabolity a zbylé buněčné makromolekuly.

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

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

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



Stanovení koncentrace a čistoty RNA:

- spektrofotometricky

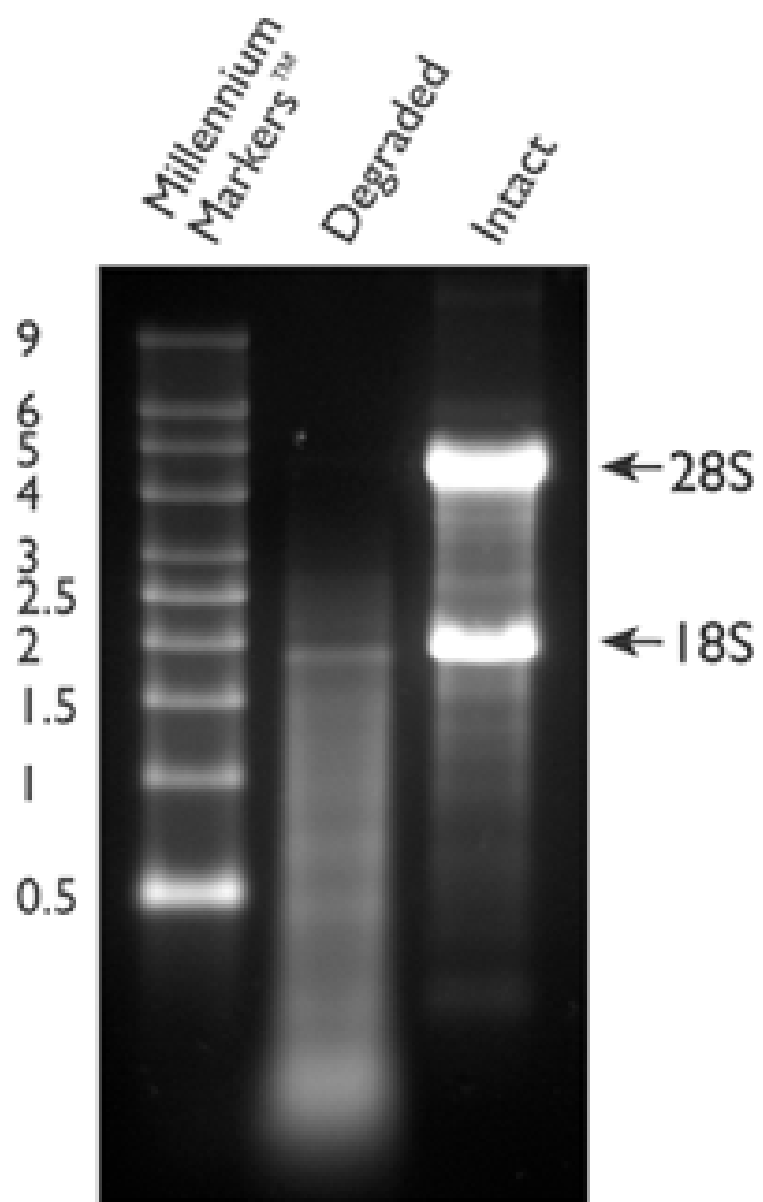
$A_{260} - 1.0 \sim 40 \mu\text{g/ml}$

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

- gelová elektroforéza

- RNA analyzéry

Degradace RNA na gelové elektroforéze



Nové technologie pro analýzu čistoty a koncentrace NK

NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer



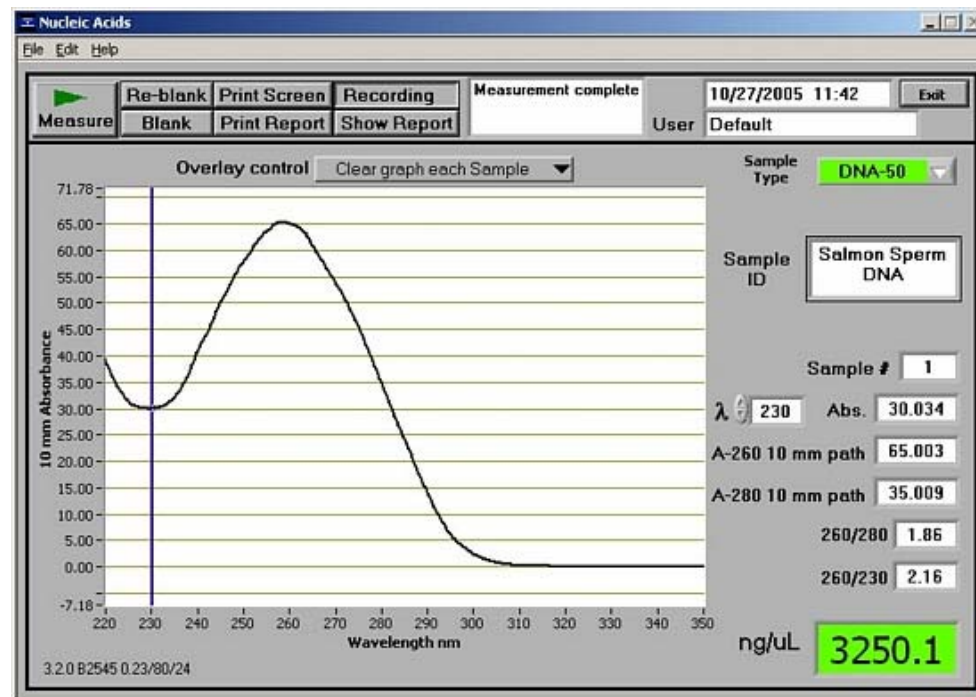
Small samples: designed for 1 ul samples

Dynamic range: measures 2-3700 ng/ul (dsDNA) on a single sample.

Full Spectrum (220-750nm)

10 second measurement time

No cuvettes or capillaries

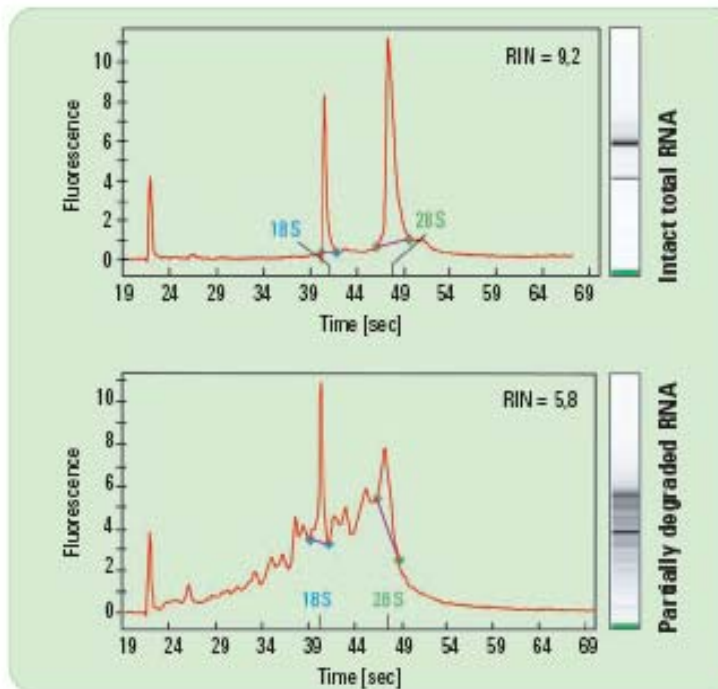


Nové technologie pro analýzu čistoty a koncentrace NK



Agilent 2100 Bioanalyzer

<http://www.chem.agilent.com/scripts/generic.asp?lPage=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