

# 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  $H_2O$  nebo TE pufri..

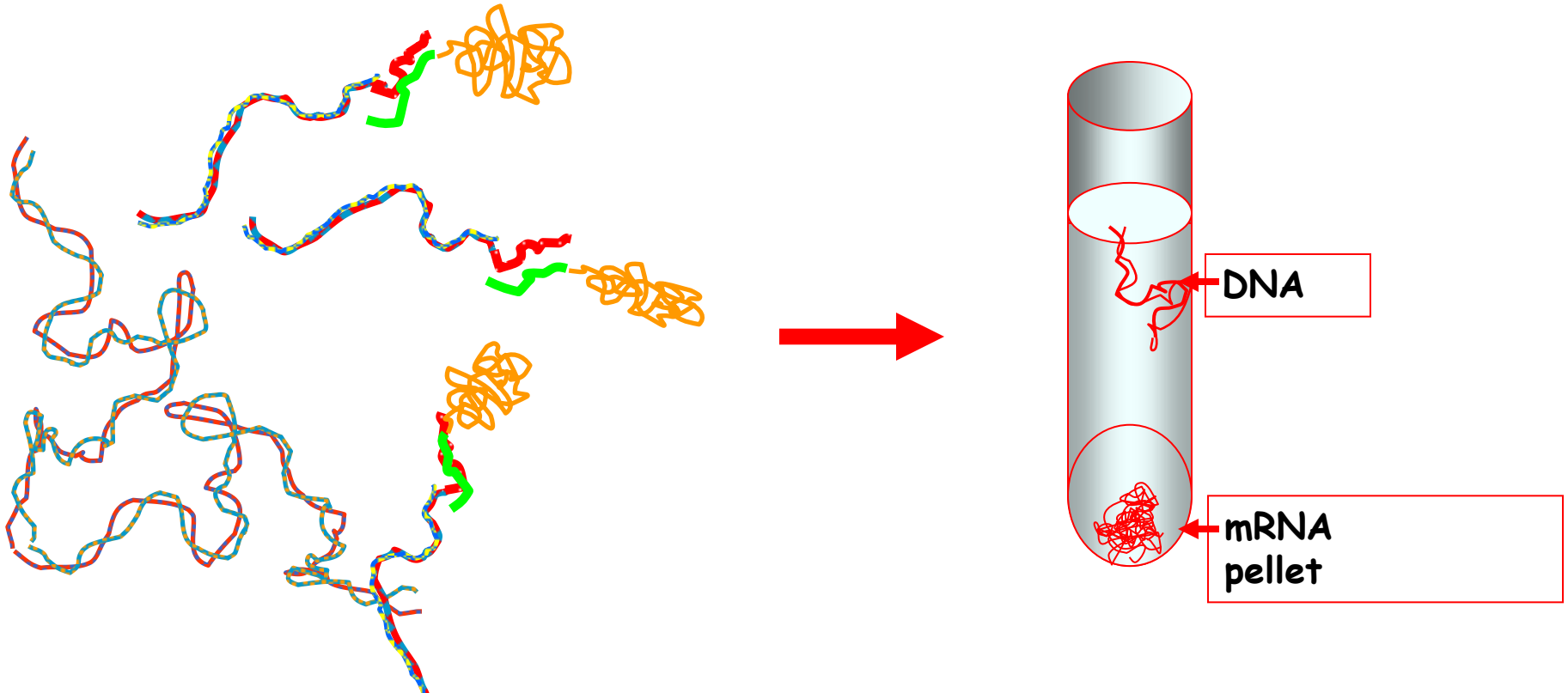


# Důležité si uvědomit:

- ✓ 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 $\mu$ l RA1 3.5 $\mu$ l $\beta$ -mercaptoethanol  Mix
3 Filtration of lysate	 	1 min 11,000 x g
4 Adjust RNA binding conditions		350 $\mu$ l 70 % ethanol
5 Bind RNA	 	30 sec 11,000 x g



# Izolace RNA pomocí kitů

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



## Stanovení koncentrace a čistoty RNA:

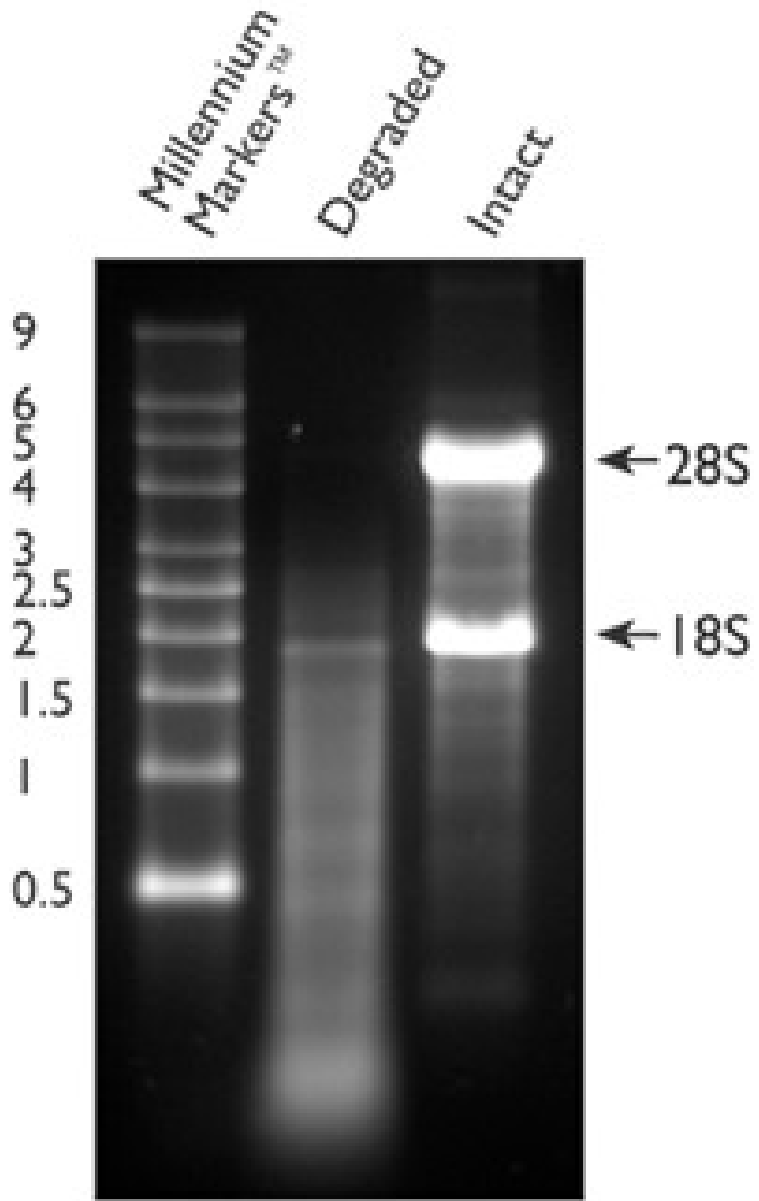
- spektrofotometricky

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

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

- gelová elektroforéza
- RNA analyzéry

# Degradace RNA na gelové elektroforéze

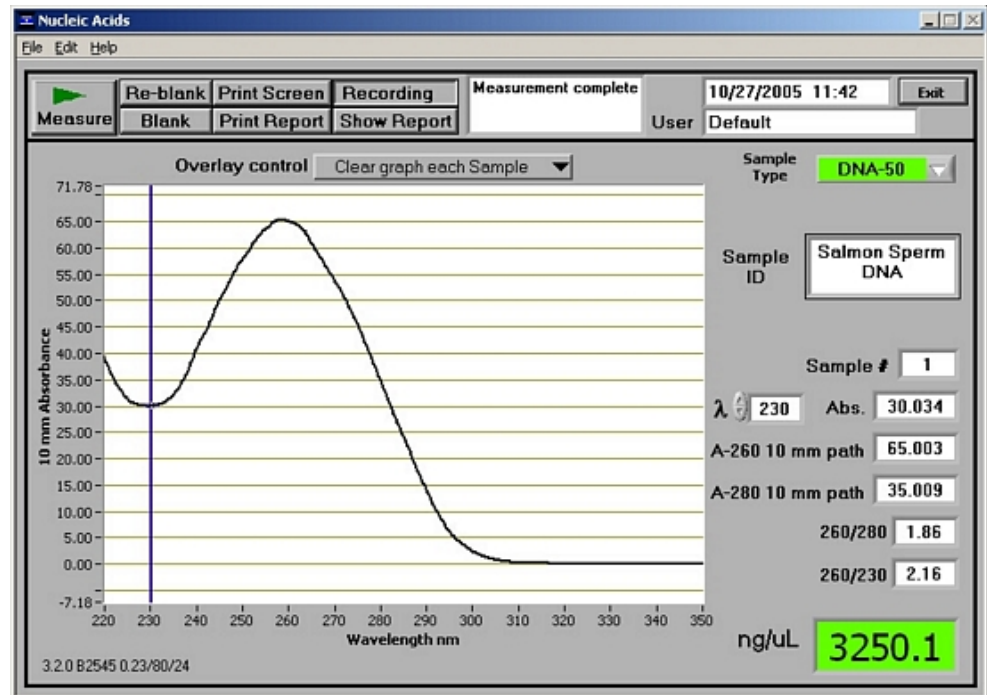


# Nové technologie pro analýzu čistoty a koncentrace NK

## 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

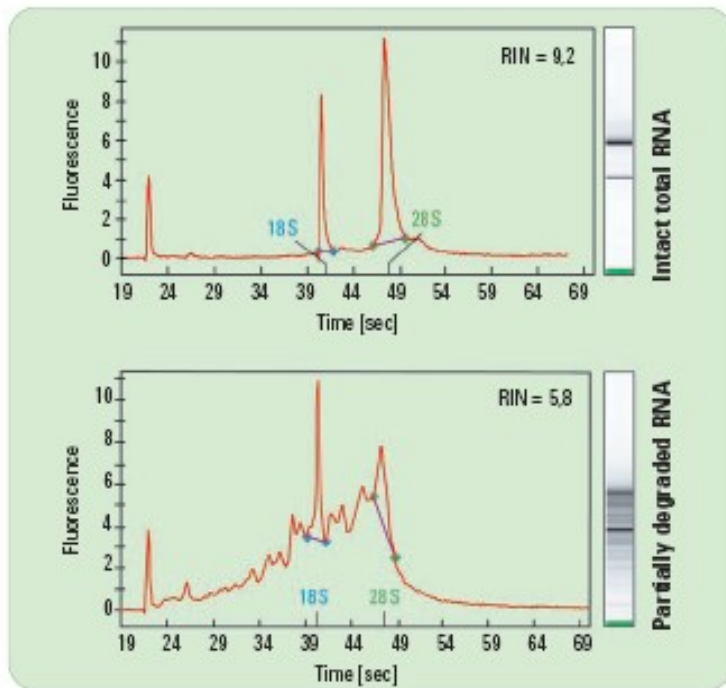


# Nové technologie pro analýzu čistoty a koncentrace NK



## Agilent 2100 Bioanalyzer

<http://www.chem.agilent.com/scripts/generic.asp?IPage=1565&indcol=N&prodcol=Y>





## Podrobný popis:

- protokol pro izolaci celkové RNA z kultivovaných buněk pomocí kytu 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](http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/RNA%20and%20mRNA/UM_TotalRNA.pdf)