

Úloha: Izolace bakteriální RNA

Stejně jako u izolace bakteriální DNA, také bakteriální RNA se purifikuje a izoluje několika možnými způsoby. Mohou se používat speciální komerčně dostupné kity s kolonkami, kde jejich matrix na sebe naváže RNA z roztoku a RNA je postupně purifikována na kolonce. Dále se používá metoda založená na izolaci pomocí fenol-chloroformem nebo řada komerčně dostupných produktů např. velmi rozšířená izolace TRIzolom nebo RNazolom.

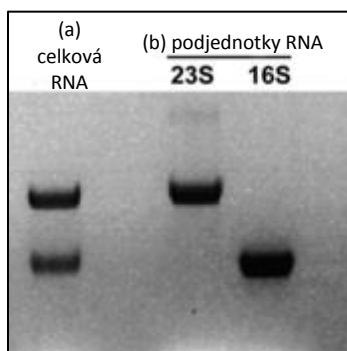
Při práci s RNA je nutné dodržovat několik zásad, protože RNA je velice náchylná na působení RNáz z prostředí. Striktně pracujeme v rukavicích, používáme sterilní špičky s filtrem, pipety určené pro práci s RNA, speciálně ošetřenou vodu (tzv. DEPC vody, které neobsahují RNázy) a ideálně pracujeme v části laboratoře, která je vymezena pouze pro práci s RNA.

Převážná část bakteriální RNA je tvořena dvěma typy ribozomální RNA (16S rRNA a 23S rRNA) a mRNA. Správně izolovaná totální bakteriální RNA tvoří na elektroforetickém gelu dva celistvé kroužky (horní 23S a dolní 16S rRNA) (viz obr.).

Izolace celkové RNA TRIzolom

Níže uvedený postup popisuje izolaci celkové bakteriální RNA pomocí komerčně dostupného TRIzolu. Kit je možné používat pro gram-pozitivní a gram-negativní bakterie.

Obr. (a) celková bakteriální 16S a 23S rRNA, (b) purifikované podjednotky bakteriální RNA



Bakteriální buňky jsou v prvním kroku ošetřeny Max Bacterial Enhancement Reagent a inkubovány při vysoké teplotě. V dalším kroku je přidán k roztoku TRIzol, který rozruší bakteriální komponenty a zároveň udržuje integritu RNA. Po přidání chloroformu a následné centrifugaci dojde k oddělení vodné fáze s obsahem RNA a organické fáze, která obsahuje buněčné zbytky. RNA je z vodné fáze precipitována izopropanolem. Následnou centrifugací získaný pelet RNA je rozpuštěn v DEPC vodě.

Seznam materiálů:

- Bakteriální kultura *E. coli*
- Komerční kit pro izolaci celkové bakteriální RNA:
TRIzol® Max™ Bacterial RNA Isolation Kit; Kat. č.: 16096-040 (Ambion®)¹²

¹ Originální protokol viz stránky distributora kitu:

http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/trizolmax_man.pdf

² Kit je optimalizovaný pro *E. coli*, kdy z 1,5 ml bakteriálních buněk získáme více než 20 µg RNA. Je nutné optimalizovat množství bakteriálních buněk podle použitého vstupního materiálu.

- Roztoky, chemikálie, média: 20 ml MPB, DEPC voda, chloroform
- Plasty: špičky s filtrem, pipety pro práci s RNA
- Ostatní vybavení: laminární box pro práci s RNA, stolní centrifuga, mikrozkušavky

Postup³:

1. den

1. Naočkovat bakteriální kulturu, inkubovat **18h/37 °C** ve vhodném kultivačním médiu.

2. den

Pracujeme v laminárním boxu, sterilně a v prostorách určených pro práci s RNA

2. Přenést **1,5 ml** bakteriální kultury (10^8 buněk) do sterilní mikrozkušavky.
3. Centrifugovat **6000 g/5 min/4 °C**.
4. Během centrifugace předeřtát na 95 °C 200 µl Max Bacterial Enhancement Reagent.
5. Získaný pelet resuspendovat v 200 µl Max Bacterial Enhancement Reagent.
6. **Inkubovat 95 °C/4 min.**
7. Přidat 1 ml TRIzol, dobře promíchat. Inkubovat **5 min/laboratorní teplota**.
8. Přidat 2 ml **vychlazeného chloroformu** a promíchat převrácením zkumavky.
9. Inkubovat 2 – 3 min/laboratorní teplota.
10. **Centrifugace 12 000 g/15 min/4 °C.**
Pozn. Dojde k oddělení vodné bezbarvé fáze obsahující RNA a organické načervenalé fáze obsahující fenol a buněčné zbytky.
11. Přenést **vodnou fázi** obsahující RNA (cca 400 µl) do čisté mikrozkušavky.
12. Přidat 500 µl na ledu **vychlazeného izopropanolu** a pomalu promíchat převrácením zkumavky.
13. Inkubace 10 min/laboratorní teplota.
14. Centrifugace **15 000 g/10 min/4 °C**. Opatrně odsát supernatant, RNA se jeví jako poloprůhledný gel na spodu zkumavky.
15. Resuspendovat pelet v 1 ml **75 % etanolu** a dobře zvortexovat.
16. Centrifugovat **7 500 g/5 min/4 °C**. Opatrně odstranit supernatant.
17. Pelet RNA sušit na vzduchu, nepoužívat sušení ve vakuové odparce.
18. Vysušenou RNA rozpustit v **50 µl DEPC vody** a zahřát na 60 °C/10 min, pokud je třeba zvýšit rozpustnost RNA.

³Před vlastním experimentem je nutné vychladit rotor centrifugy a vychladit chemikálie.