

Instrukcja ćwiczeń „Biologia molekularna” dla II roku Farmacji

Grupa.....

Wrocław,.....

Imię i nazwisko studenta:

Imię i nazwisko prowadzącego:

.....

.....

Ćwiczenie nr 2.

Izolacja RNA metodą kolumnkową.

Elektroforeza cząsteczek RNA.

UWAGA! Praca z materiałem biologicznym! Proszę przynieść na zajęcia własne rękawice i okulary ochronne.

Zadanie 1. Izolacja RNA przy użyciu zestawu GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit (EURx)

WAŻNE! RNA ze względu na budowę i obecność RNaz w otoczeniu jest bardzo labilne. Z tych powodów pracuj zawsze w bezpudrowych rękawiczkach oraz rygorystycznie przestrzegaj zasad sterylności.

1. Do osadu komórek z hodowli *in vitro* dodaj **400 µl buforu lizującego RL**, zawierającego β-merkaptotoetanol. Komórki dokładnie wymieszaj przy użyciu vortexu lub przez pipetowanie.
2. Lizat przenieś do **mini kolumny homogenizacyjnej (ŻÓŁTY KOREK)**, umieszczonej w czystej probówce odbierającej o poj. 2 ml.
3. Wiruj 3 minuty przy 9 000 x g.
4. Usuń kolumnę z próbki odbierającej a do homogenatu dodaj **350 µl 70 % etanolu** i dokładnie wymieszaj roztwory przez pipetowanie.
5. Całość materiału przenieś do **kolumny ze złożem wiążącym (BEZBARWNY KOREK)**. Pamiętaj aby kolumnka była umieszczona w czystej probówce o poj. 2 ml.

UWAGA: przenosząc materiał nie uszkodzić złoża końcówką od pipety!

6. Wiruj 1 min. przy 9 000 x g. Płyn z próbki usuń (wylej do pojemnika na zlewki) i umieść ponownie kolumnkę w pustej probówce. Dodaj **400 µl buforu płuczącego Wash DN1** do mini kolumny.
7. Wiruj 1 min. przy 9 000 x g. Usuń płyn z próbki i ponownie umieść w niej kolumnkę.
8. Dodaj **650 µl buforu płuczącego RBW do kolumny** i wiruj w warunkach jak wyżej.
9. Płyn z próbki usuń i umieść w niej ponownie kolumnkę. Dodaj **350 µl buforu płuczącego RBW do kolumny** i wiruj przez 2 min. przy 9 000 x g.
10. Płyn z próbki usuń. Kolumnkę umieść w **czystej probówce** o pojemności 1,5 ml. Bezpośrednio na złożu kolumny umieść 40 µl wody wolnej od RNaz. Wiruj 1 min przy 9 000 x g.
11. Kolumnkę usuń i zamknij probówkę. Roztwór z wyizolowanymi cząsteczkami RNA umieść w lodzie w celu wykonania zadania nr 2, następnie materiał oddaj do pokoju przygotowawczego w celu przechowania go do kolejnych ćwiczeń. **Probówkę podpisz nr grupy i inicjałami!**

RNA przechowywać do 1 roku w -20° C lub -80° C. Unikać zamrażania i rozmrażania roztworu.

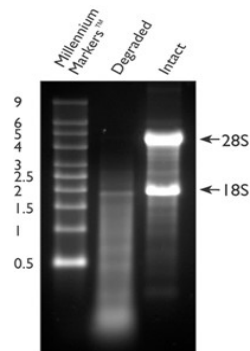
Instrukcja ćwiczeń „Biologia molekularna” dla II roku Farmacji

Zadanie 2. Elektroforeza RNA.

UWAGA! Ze względu na obecność RNaz w środowisku należy wszystkie czynności prowadzić na odczynnikach traktowanych inhibitorami dla tych enzymów.

W tym celu aparat do elektroforezy, grzebień i saneczki należy zalać 0,1M roztworem NaOH na 0,5 godziny lub 0,1% roztworem DEPC (dietylopirowęglan). Zarówno bufor do elektroforezy, jak i bufor do próbek powinien być traktowany inhibitorami RNaz np. DEPC lub RNazin (białko wiążące RNA).

1. Przygotować czystą probówkę o pojemności 1,5 ml. Dodać **5 µl wyizolowanego materiału RNA oraz 5 µl buforu obciążającego do próbek** (RNA Gel Loading Dye 2x) wolnego od RNaz. Dokładnie wymieszać i zwirować, tak aby całość roztworu znajdowała się na dnie probówki.
2. Całość (10 µl) roztworu przenieść do studzienki w żelu agarozowym (zawierającym znacznik wiążący kwasy nukleinowe Midori Green Advance).
3. Elektroforezę prowadzić przy 70-100 V przez ok. 1 h.
4. Po tym czasie rozdzielone cząsteczki RNA w żelu agarozowym obserwować w świetle lampy UV (transiluminator).



Oceń jakość wyizolowanego przez siebie RNA:

Po izolacji całkowitego RNA z komórek eukariotycznych i rozdiale w żelu agarozowym widoczne są cząsteczki..... oraz zaś w przypadku komórek prokariotycznych można obserwować

W celu wykrycia konkretnych cząsteczek mRNA należy użyć techniki lub