

Grupa.....

Wrocław,

.....

Imię i nazwisko studenta:

Imię i nazwisko prowadzącego:

.....

.....

Ćwiczenie nr 2.

Izolacja RNA metodą fenolową.

Przygotowanie biblioteki mRNA- reakcja odwrotnej transkrypcji z użyciem starterów oligo(dT).

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

Wszystkie próbówki i kolumny podpisywać w celu uniknięcia pomyłkowych wymian probówek z innymi grupami.

1. Izolacja RNA metodą fenolową.

UWAGA! Praca z materiałem biologicznym i fenolem (w RNA Extracolu) proszę przynieść na zajęcia własne rękawice i okulary ochronne. Wszystkie procedury wykonywać ostrożnie, unikając bezpośredniego kontaktu z odczynnikami i materiałem.

Fenol jest związkiem toksycznym. Działa niszcząco na błony śluzowe i drogi oddechowe. Powoduje zatrucia (wdychane opary) i oparzenia (kontakt ze skórą).

Odczynniki:

1. 1x Bufor Lyse RBC- bufor do lizy *
2. RNA Extracol
3. Chloroform
4. Izopropanol
5. 70% lub 75% etanol
6. Probówki typy Falcon 15 ml
7. Probówki typu Eppendorf 1,5 ml
8. Woda wolna od RNaz
9. Lód
10. 10x Bufer Reakcyjny I (dla DNAzy)
11. 1U/μl DNaza I
12. 120 mM EDTA, pH8,0

Sprzęt:

1. Vortex
2. Miniwirówka
3. Pipety automatyczne
4. Termoblok (37°C, 65°C)

Zadanie 1. Izolacja RNA przy użyciu RNA Extracol (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.

Punkty 1-2 wykonywać **pod dygestorium**.

1. Do osadu komórek dodać **1 ml buforu roztwór RNA Extracol** dokładnie wymieszać przez pipetowanie (w przypadku krwi po zawieszeniu, całość mieszaniny przenieść do czystej probówki eppendorfa 1,5 ml). Inkubować w temperaturze pokojowej przez 5 min.
2. Dodać **0,2 ml chloroformu**. Wytrząsać próbkę ręcznie lub przy użyciu wortexu przez 30-60 sek. Przed wytrząsaniem sprawdzić czy probówka jest szczelnie zamknięta!
3. Inkubować w temperaturze pokojowej przez 2-5 min., po czym wirować 15 min, przy 12 000 xg.
4. Po wirowaniu nastąpi rozdział faz. Ostrożnie zebrać górną fazę (wodną, zawierającą RNA) i przenieść do wcześniej przygotowanej czystej probówki o obj. 1,5 ml.
5. Dodać 0,5 ml izopropanolu. Delikatnie wymieszać przez kilkukrotne odwrócenie probówki, inkubować w temperaturze pokojowej przez 10 min.
6. Wirować 10 min. przy 12 000 xg.
7. Supernatant usunąć a osad przepłukać 1 ml 70-75% etanolu.
8. Wirować przez 5 min. przy 12 000 xg.
9. Usunąć supernatant (dokładnie), osad osuszyć, trzymając otwartą probówkę 5-10 min., a następnie rozpuścić w 40 µl wody wolnej od RNaz. Materiał trzymać na lodzie.
10. Zmierzyć z pomocą prowadzącego stężenie wyizolowanego RNA.

Zadanie 2. Trawienie DNazą I.

UWAGA! Otrzymany RNA jest zanieczyszczony gDNA. Z tego powodu próbkę należy potraktować enzymami degradującymi DNA.

1. Do 40 µl wyizolowanego roztworu RNA należy dodać 3 µl wody wolnej od RNaz, a następnie 5 µl 10x Buforu Reakcyjnego I. Dokładnie wymieszać składniki przez pipetowanie.
2. Dodać 2 µl (2U) Dnazy I, wymieszać i zwirować.
3. Inkubować w termobloku przez 15 min. w 37°C.
4. Reakcję przerwać przez dodanie 10 µl 120 mM EDTA i termiczną inaktywację w 65°C, przez 10 min.
5. Zmierzyć z pomocą prowadzącego stężenie wyizolowanego, oczyszczonego RNA.
6. Część wyizolowanego materiału (**5 µl**) wykorzystać do przygotowania biblioteki mRNA- reakcji odwrotnej transkrypcji z użyciem starterów oligo(dT). Pozostałą część podpisać i przekazać do

pokoju przygotowawczego. Przechowywanie w -20°C do dalszej analizy (rozdział elektroforetyczny, ćwiczenie nr 3).

Pytanie sprawdzające:

1. Oblicz stężenie wyjściowego roztworu RNA, jeżeli absorbancja przy 260 nm roztworu 20 razy rozcieńczonego wynosiła 0,20.

.....

.....

.....

2. Porównaj stężenia wyizolowanego RNA przed i po traktowaniu enzymami degradującymi DNA.

.....

.....

3. Jakie wiązania występują w strukturze RNA?

.....

.....

.....

4. Wymień rodzaje cząsteczek RNA i opisz ich funkcje w komórce.

.....

.....

.....

.....

.....

.....

2. Przygotowanie biblioteki mRNA- reakcja odwrotnej transkrypcji z użyciem starterów oligo(dT).

Zadanie 1. Reakcja odwrotnej transkrypcji.

WAŻNE! Dla większej wydajności reakcji rekomendowane jest jej przeprowadzenie w obecności inhibitorów RNaz. Wszystkie odczynniki i plastik muszą być wolne od tych enzymów. Wszystkie czynności powinny być wykonywane w bezpudrowych rękawiczkach. Pamiętaj o każdorazowej wymianie końcówek przy odpipetowywaniu nowego odczynnika (zapobiega kontaminacji).

1. Do sterylnej, podpisanej probówki o pojemności **0,2 ml** dodaj odczynniki zgodnie z informacjami zamieszczonymi w tabeli nr 1 (kolejność również istotna) dla próbki RT. Jeden zespół na grupę, wskazany przez prowadzącego, przygotowuje reakcję kontrolną –kontrola negatywna (NC). Wszystkie czynności wykonuj, trzymając probówkę cały czas na lodzie.

Odczynnik	Stężenie końcowe	Próbka RT	Próbka NC
Woda (DEPC)	-	9 µl	14 µl
5xNG cDNA Buffer	1x	4 µl	4 µl
Startery (primers)	2,5 µM oligo(dT) ₂₀ lub 10 ng/ml RH (sprawdź co masz na stole!)	1 µl	1 µl
RNA	≈5 µg	5 µl	-
NG dART RT mix		1 µl	1 µl

Objętość końcowa reakcji 20 µl

5x NG cDNA Buffer zawiera optymalny dla enzymu bufor RT oraz mieszaninę DTP

NG dART RT mix zawiera odwrotną transkryptazę dART, mieszaninę dNTPs oraz inhibitor hamujący aktywność RNazy A, B i C.

- Po dodaniu wszystkich składników zawartość probówki delikatnie wymieszaj (pipetowanie) i zwróć, tak aby całość znalazła się na dnie probówki. Ponownie umieść probówkę w lodzie.
- Zaprogramuj termocykler na następujący profil termiczny: **60 minut- 50° C** dla starterów oligo(dT)₂₀ (w przypadku użycia RH: 25°C przez 10min, 50°C przez 50 min.), **5 minut- 85° C, 4° C- ∞**.
- Umieść probówkę w termocyklerze i rozpocznij reakcję.
- Po zakończeniu reakcji probówkę oddać do pokoju przygotowawczego w celu jej przechowania do następnych ćwiczeń. cDNA przechowywać w -20° C. Unikać rozmrażania/zamrażania materiału. cDNA otrzymane w reakcji RT będzie stanowiło matrycę w PCR zaplanowanej na kolejnych zajęciach. **Proszę o dokładne opisanie swoich prób celem szybkiej identyfikacji na kolejnych zajęciach!**

Przepisz sekwencję RNA

5'ccugauuuuaaaggcccccuaaggaacuuuugcccuuugcgcgauugacauagggaauccuauuuu3'

tak jakby to zrobiła odwrotna transkryptaza. Jako startera do reakcji użyto oligonukleotydu:

5'ggattcccatgtca.....

Uzupełnij zdania:

W reakcji RT stosowane są(ile) różne typy sekwencji starterowych. Startery służą do przepisywania specyficznych fragmentów RNA. Startery losowe (Random) wykorzystuje się do przepisywania zarówno cząsteczek jak i Do tworzenia bibliotek cDNA, powstających z przepisywania wszystkich cząsteczek mRNA znajdujących się w danym momencie w komórce, służą startery.....

Do usuwania nici RNA po reakcji odwrotnej transkrypcji stosuje się enzym