

Grupa.....
.....

Wrocław,

Imię i nazwisko studenta:

Imię i nazwisko prowadzącego:

.....

.....

Ćwiczenie nr 6.

Izolacja RNA metodą kolumnienkową.

Odwrotna transkrypcja.

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

Odczynniki:

Bufor lizujący RL
70% lub 75% etanol
Bufor płuczący Wash DN1
Bufor płuczący RBW
5 x NG cDNA Buffer
50 μ M oligo(dT)₂₀
NG dART RT mix I
Woda wolna od RNaz
Lód

Sprzęt:

Vortex
Miniwirówka
Pipety automatyczne (końcówki z filtrami)
Termocykler
Probówki typu Eppendorf 1,5 ml
Probówki typu Eppendorf 0,2 ml

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. Koniecznie zanotować oznaczenia z probówki z komórkami, będzie to ważne przy analizie wyników na ćwiczeniu 7.
2. Do osadu komórek w probówce eppendorf o obj. 1,5 ml dodać **400 μ l buforu lizującego RL**, zawierającego β -merkaptetanol. Komórki dokładnie wymieszać przy użyciu vortexu lub przez pipetowanie.
3. Lizat przenieść do mini kolumny homogenizacyjnej (**żółte wieczko**), umieszczonej w czystej probówce odbierającej o poj. 2 ml.
4. Wirować 3 minuty przy 9 000 x g.

5. Do homogenatu w probówce odbierającej dodać **350 µl 70 % etanolu** i dokładnie wymieszać roztwory przez pipetowanie.
6. Całość materiału przenieść do kolumnienki ze złożem wiążącym (**bezbarwne wieczko**). Pamiętaj aby kolumnienkę umieścić w czystej probówce o poj. 2 ml.
UWAGA: przenosząc materiał nie uszkodzić złoża końcówką od pipety!
7. Wirować 1 min. przy 9 000 x g. Płyn z próbówki usunąć i umieścić ponownie kolumnienkę w pustej probówce. Dodać **400 µl buforu płuczącego Wash DN1** do mini kolumny.
8. Wirować przez 1 min. przy 9 000 x g. Usunąć płyn z próbówki i ponownie umieścić w niej kolumnienkę.
9. Dodać **650 µl buforu płuczącego RBW** i wirować w warunkach jak wyżej.
10. Płyn z próbówki usunąć i umieścić w niej ponownie kolumnienkę. Dodać **350 µl buforu płuczącego RBW** i wirować przez 2 min. przy 9 000 x g.
11. Płyn z próbówki usunąć. Kolumnienkę umieścić w czystej probówce o pojemności 1,5 ml. Bezpośrednio na złożu kolumny umieścić 40 µl wody wolnej od RNaz. Wirować 1 min przy 9 000x g.
12. Kolumnienkę usunąć i zamknąć probówkę. Roztwór z wyizolowanymi cząsteczkami RNA umieścić w lodzie w celu wykonania zadania nr 2. RNA przechowywać do 1 roku w -20°C lub -80 °C. Unikać zamrażania i rozmrażania roztworu.

Zadanie 2. Pomiar stężenia i czystości RNA

Wykonać z pomocą prowadzącego spektrofotometryczny pomiar stężenia i czystości wyizolowanego RNA. Otrzymane wyniki zapisać poniżej.

Stężenie DNA.....

Zanieczyszczenia białkiem....., A260/A280=.....

Zadanie 3. 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 (zapobieganie kontaminacji).

1. Do sterylnej, podpisanej (tak aby GRUPA mogła ją zidentyfikować na następnych ćwiczeniach) probówki o pojemności 0,2 ml dodać odczynniki zgodnie z informacjami zamieszczonymi w tabeli poniżej (kolejność dodawania składników reakcji istotna). Wszystkie czynności wykonywać, trzymając probówkę cały czas na lodzie. W razie wysokiego stężenia RNA (>1000ng/μl) przed przystąpieniem do ćwiczenia należy wykonać 10-krotne rozcieńczenie preparatu RNA wodą w nowej, sterylnej probówce.

Odczynnik	Stężenie końcowe	Próbka RT	Próbka kontrolna NC (tylko grupa wskazana przez prowadzącego)
Woda (DEPC)	-	oblicz	14 μl
5xNG cDNA Buffer	1x	4 μl	4 μl
Startery (primers)	2,5 μM oligo(dT) ₂₀	1 μl	1 μl
RNA	1 μg	oblicz	-
NG dART RT mix	1x	1 μl	1 μl

Objętość końcowa reakcji 20 μl, 5x NG cDNA Buffer zawiera optymalny dla enzymu bufor RT oraz mieszaninę dTTPs, **NG dART RT mix** zawiera odwrotną transkryptazę dART oraz inhibitor hamujący aktywność RNazy A, B i C

2. Składniki reakcji delikatnie wymieszać przez pipetowanie i zwirować, tak aby całość znalazła się na dnie probówki. Ponownie umieścić probówkę w lodzie.
3. Zaprogramować termocykler na następujący profil termiczny:
60 minut- 50° C dla starterów oligo(dT)₂₀
5 minut- 85° C
4° C- ∞
4. Umieścić probówkę w termocyklerze i uruchomić program.
5. cDNA przechowywać w -20°C. Unikać rozmrażania/zamrażania materiału.
cDNA otrzymane w reakcji RT będzie stanowiło matrycę w PCR zaplanowanych w kolejnych ćwiczeniach.