



Zakład Biologii Molekularnej

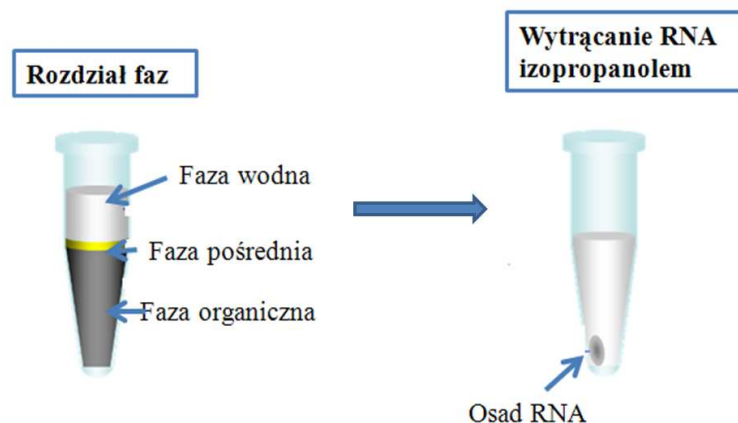
Materiały do ćwiczeń z przedmiotu:

„BIOLOGIA MOLEKULARNA”

Zakład Biologii Molekularnej
Wydział Farmaceutyczny, WUM
ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa

Izolacja oraz ocena jakościowa i ilościowa RNA

1. Izolacja całkowitego RNA Trizolem z komórek



UWAGA!!! Wykonanie procedury izolacji należy bezwzględnie przeprowadzić w rękawiczkach!

Potrzebne materiały i odczynniki:

- Osad komórek zawieszonych w RNAlater.
- TRIZOL
- Chloroform
- Izopropanol
- 75% etanol
- Woda (wolna od RNaz)
- Eppendorfy
- vortex
- wirówka

Izolacja RNA

1. Osad komórek zawiesić w 0,5 ml Trizolu (dobrze „przepipetować”)
2. Inkubować 5 min w temp pokojowej (RT)
3. Dodać 100 μ l chloroformu i wytrząsać w ręku przez 15s
4. Inkubować 2-3 min w RT
5. Wirować 11 500 rpm / 15 min / 4°C
6. Górną wodną fazę przenieść do nowej probówki
7. Dodać 0,25 ml izopropanolu i delikatnie wymieszać
8. Inkubować 10 min w RT
9. Wirować 11 500 rpm / 10 min / 4°C

10. Po wirowaniu obserwować osad na dnie probówki i uważnie odlać supernatant, nie naruszając osadu
11. Przemyć osad RNA dodając 0,5 ml 75% etanolu – jeżeli po dodaniu etanolu, osad wciąż będzie obecny na dnie probówki, próby należy delikatnie zworteksować – do momentu oderwania się osadu z dna probówki
12. Wirować 9 000 rpm / 5 min / 4°C
13. Odrzucić supernatant obserwując osad RNA
14. Osad RNA suszyć na powietrzu, pozostawiając probówkę otwartą i ustawiając ją do góry dnem na 10 – 20 min
15. RNA zawiesić w wodzie, dopasowując jej ilość do wielkości osadu (ok. 20-30µl)

2. Ocena jakościowa RNA – elektroforeza w żelu agarozowym

Potrzebne materiały i odczynniki:

- Bufor do elektroforezy TAE 1x (10x TAE: 40mM Tris, 0,12 % kwas octowy, 1mM EDTA pH 8,0,)
- Agaroz
- Bromek etydyny
- Obciążnik (10x obciążnik: 0,25% bromophenol blue, 0,25% xylene cyanol, 20% ficoll typ 400)
- Saneczki, grzebienie i komora elektroforetyczna
- Wzmacniacz prądu
- Kuchenka mikrofalowa

UWAGA!!! Bromek etydyny jest silnym kancerogenem! Należy bezwzględnie pracować w rękawiczkach!

Przygotowanie żelu agarozowego

1. Saneczki włożyć w formę i wyważyć jej równowagę
2. W saneczki włożyć grzebień
3. Przygotować żel agarozowy 1% w objętości 70 ml

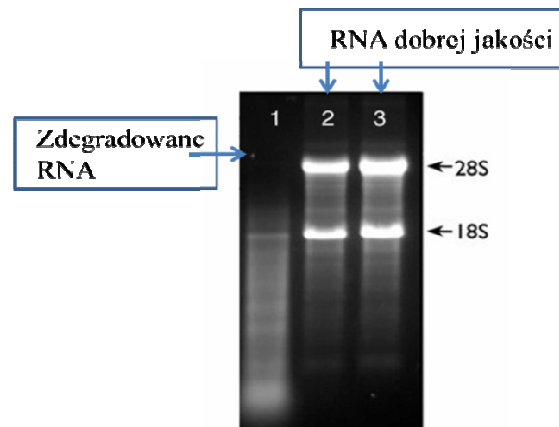
Miejsce na obliczenia

1. Odpowiednią naważkę agarozu rozpuścić na gorąco w buforze TAE 1x
2. Klarowny roztwór agarozu ochłodzić do temp ok 50°C
3. Pod wyciągiem, do roztworu agarozu dodać 4 µl bromku etydyny, zamieszać

4. Wylać żel na saneczki, uważając by nie pojawiły się bąble powietrza
5. Żel zastyga ok 20 min

Elektroforeza RNA w żelu agarozowym

1. Z żelu wyciągnąć grzebień i przenieść saneczki do komory elektroforetycznej
2. Napęlić komorę buforem TAE 1x, w ilości która zapewni pokrycie żelu
3. Próby RNA należy inkubować w temp 70°C przez 1 min, a następnie umieścić na lodzie
4. nałożyć na żel: **3 µl markera wielkości**
5. Przygotować próby do nałożenia na żel: **10 µl próby + 3 µl obciążnika**, wymieszać i nałożyć na żel
6. Elektroforezę prowadzić przez 30-40 min / 100 V
7. Po zakończonej elektroforezie przeanalizować wynik w świetle UV



Ryc 2. Przykładowy rozdział elektroforetyczny RNA w żelu agarozowym.