

Biologia Molekularna

ĆWICZENIE I

PREPARATYKA RNA



ĆWICZENIE I (RNA)

W komórkach występują trzy główne rodzaje RNA: mRNA, tRNA, rRNA. Największą pulę RNA stanowi rRNA kodujące podjednostki rybosomów (u Eukariota o stałych sedymentacji 25-28S, 18S, 5S i 5,8S). Cząsteczki tRNA biorą czynny udział w procesie translacji dostarczając odpowiednie aminokwasy w trakcie syntezy łańcucha polipeptydowego. Z kolei mRNA stanowi matrycę dla syntezy białek funkcjonalnych i strukturalnych (1-5% całkowitego RNA komórki).

Otrzymanie wysokiej jakości RNA (niezdegradowanego o wysokim stopniu czystości) jest często momentem krytycznym w dalszej analizie opierającej się o wykorzystanie takich metod jak Northern blot, RT-PCR, mapowanie RNA, translacja *in vitro*, czy tworzenie bibliotek cDNA. W procesie obróbki RNA ważny jest dobór odpowiedniej metody homogenizacji materiału wyjściowego, dobór samej metody izolacji RNA jak i przechowywania wyizolowanego materiału.

RNA jest znacznie bardziej narażony na degradację niż kwas dezoksyrybonukleinowy. W materiale biologicznym i środowisku zewnętrznym obecne są rybonukleazy- bardzo aktywne i stabilne, niewymagające dla swej aktywności kofaktorów, enzymy degradujące RNA. Ze względu na specyficzne właściwości RNaz należy poddawać je działaniu bardzo silnych związków degradujących białka (chlorowodorek/izotiocyanian guanidyny), a sprzęt i niektóre bufony wykorzystywane do pracy z RNA traktować roztworem dietylopirowęgla (0,1% roztwór DEPC).

TRIzol- Total RNA Isolation, jest mieszaniną fenolu, izotiocyanianu guanidyny i innych związków, które prowadzą do lizy komórek i inaktywacji endogennych RNaz. W kolejnym etapie dodawany jest chloroform, odpowiedzialny za ekstrakcję zanieczyszczeń białkowych, ale także rozdział DNA i RNA. Wirowanie w obecności chloroformu prowadzi do utworzenia się 3 warstw i tym samym rozdzielania składników lizatu (RNA, DNA, białek). We frakcji wodnej (górnej) zatrzymuje się RNA, traktowanie następnie izopropanolem w celu wytrącenia i koncentracji. Końcowe etapy izolacji sprowadzają się do osuszenia i rozpuszczenia w wodzie osadu RNA. Białka i DNA możliwe są do odzyskania w trakcie procesu izolacji RNA z fazy organicznej. Twórcą Trizolu był Piotr Chomczyński.

Nadmiar DNA w mieszaninie traktowany jest kwaśnym fenolem, alternatywnie roztwór RNA trawi się DNazą.

Jeżeli interesuje nas określona frakcja RNA (mRNA) w trakcie procedury izolacji należy uwzględnić dodatkowe etapy wymywające z preparatu pozostałe kwasy tRNA oraz rRNA. Wykorzystuje się w tym celu fakt, że cząsteczki mRNA na końcach 3' zawierają sekwencje poli(A), które mogą wiązać się z cząsteczkami poli(T) przyłączonymi do stałego podłoża (kulki magnetyczne, kolumna chromatograficzna). Cząsteczki RNA nie związane z podłożem są wymywane, natomiast oczyszczone związane z podłożem mRNA poddawane są elucji.

Elektroforeza wykorzystuje zjawisko przemieszczania się w polu elektrycznym cząsteczek obdarzonych ładunkiem. Na szybkość migracji w polu elektrycznym mają wpływ takie czynniki jak: różnica potencjałów w polu, wielkość, kształt, ładunek i charakter chemiczny przemieszczającej się cząsteczki. Kwasy nukleinowe mają ładunek ujemny (nadany przez grupy fosforanowe) i zgodnie z nim migrują w polu elektrycznym do anody (+).

Po rozdziale elektroforetycznym całkowitego RNA najlepiej widoczne na żelu są dwie frakcje rRNA (u myszy 28S oraz 18S). Intensywność prążków daje nam informacje na temat jakości preparatu RNA: ich zanikanie świadczy o postępującej degradacji RNA. Niewielkie ilości wyizolowanego mRNA ze względu na swoją wielkość po rozdziale całkowitego RNA nie są widoczne.

Spektrofotometryczne oznaczanie zawartości substancji rozpuszczonej w roztworze polega na przepuszczeniu przez badany roztwór wiązki światła o znanej długości fali. Ilość energii transmitowanej przez próbkę jest rejestrowana przez fotokomórkę umieszczoną „na wyjściu” ścieżki. Zgodnie z prawem Lamberta-Beera istnieje liniowa zależność pomiędzy absorbancją A (określaną jako gęstość optyczna OD), a stężeniem makrocząsteczek, która wyraża się wzorem:

$$A=OD=\text{molowy współczynnik absorpcji} \cdot \text{stężenie} \cdot \text{grubość warstwy absorbującej (kuwety)}$$

Białka i kwasy nukleinowe pochłaniają światło w zakresie UV(210-300nm), przy czym maksimum absorpcji dla DNA i RNA znajduje się przy wartości 260nm, natomiast dla białek wynosi 280nm. Ze względu na fakt, że częściowe pochłanianie światła dla DNA, RNA ma miejsce w zakresie 280nm, a dla białek przy długości fali 260, daje nam to możliwość oszacowania czystości preparatu dokonując prostej kalkulacji dla stosunku

absorbancji 260nm/280nm. Dla czystego, nie zanieczyszczonego białkami, ani pochodnymi fenolu RNA, wartość referencyjna wynosi ok.2,00. Dla warstwy absorbującej 1cm, przy długości fali 260nm, absorbancja $A=1$ odpowiada ok.40 μ g/ml RNA.

BIOLOGIA MOLEKULARNA	
Ćwiczenie nr 1 - izolacja RNA	
Imię i nazwisko	
Nr grupy	
Liczba punktów	
Podpis asystenta	

ĆWICZENIE

I. IZOLACJA TRIZOLEM CAŁKOWITEGO RNA Z KOMÓREK ZWIERZĘCYCH

Materiały, odczynniki, roztwory:

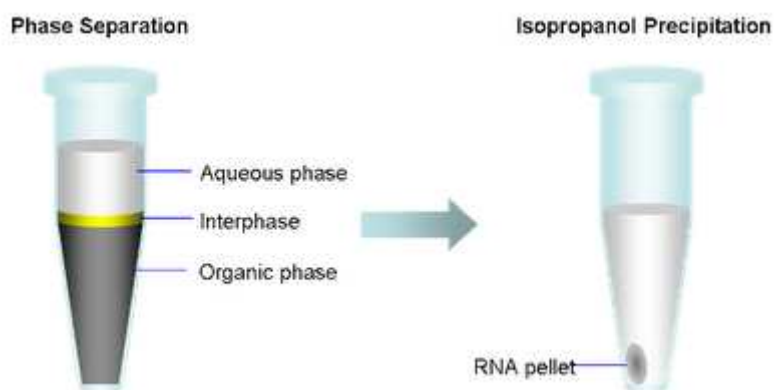
- Osad komórek z hodowli *in vitro*
- TRIZOL
- Chloroform
- Izopropanol
- 75% Etanol (EtOH)
- H₂O (wolna od RNaz)
- Probówki typu Eppendorf (wolna od RNaz)
- Tipsy (wolne od RNaz)
- Rękawiczki (wolne od RNaz)

Aparatura:

- Vortex
- Wirówka

UWAGA!!

Procedurę należy przeprowadzić w RĘKAWICZKACH!!



Wykonanie:

1. Zawiesić komórki w 0,5ml Trizolu (1ml/5-10 mln komórek),
2. Inkubacja 5min w temperaturze pokojowej (RT),
3. Dodać 0,1ml chloroformu (0,2ml/ml Trizolu),
4. Wytrząsać w ręku obracając probówkę przez 15sek.,
5. Inkubacja w RT przez 2-3min.,
6. Zwirować: 11 500rpm, 15min, 4°C,

7. Przenieść górną (wodną fazę) do nowej probówki,
8. Dodać 0,25ml izopropanolu (0,5ml/1ml Trizolu),
9. Inkubacja w TR przez 10min.,
10. Zwirować: 11 500rpm, 10min, 4°C,
11. Delikatnie odlać supernatant,
12. Przemyć osad RNA 0,5ml 75% EtOH (1ml/1m Trizolu),
13. Zworteksować,
14. Zwirować: 9 000rpm, 5min, 4°C,
15. Odrzucić EtOH i osuszyć osad pozostawiając otwarte probówki ustawione do góry dnem na 10-20min.,
16. Zawiesić RNA w wodzie (50µl); w razie niekompletnego rozpuszczenia osadu RNA w wodzie należy inkubować próbę w temperaturze 55-60 °C przez 10-15min.,

II. ELEKTROFOREZA RNA W ŻELU AGAROWYM

Materiały, odczynniki, roztwory:

- 0,1N NaOH
- Bufor do elektroforezy: TAE/TBE przygotowany w wodzie wolnej od RNaz
- Agaroz
- Bromek etydyny
- Obciążnik
- Saneczki oraz grzebienie elektroforetyczne
- Pipety i tipsy (wolne od RNaz)
- Szklana zlewka

Aparatura:

- Kuchenka mikrofalowa
- Aparat do elektroforezy (wolny od RNaz- zanurzenie na 0,5h w 0,1N NaOH)

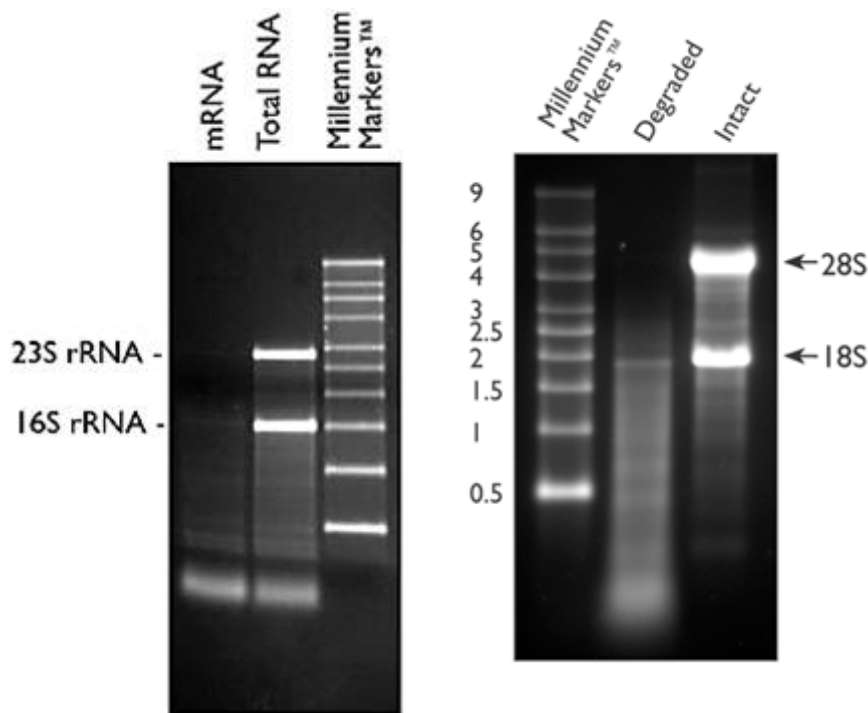
UWAGA!!

EtBr jest silnym mutagenem i teratogenem; należy unikać bezpośredniego kontaktu z tym związkiem, w tym celu pracować w RĘKAWICZKACH!!

Wykonanie:

1. przygotować 70ml 1% roztworu agarowy
2. rozpuścić w buforze 1X TAE, a po ostygnięciu agarozy do temp.45°C dodać EtBr w ilości 3µl,
3. wylać żel na saneczki i zanurzyć w nim grzebień,

4. po zastygnięciu żelu (ok.15min) wkładamy saneczki do aparatu do elektroforezy napełnionego buforem 1X TAE/TBE wcześniej wyciągając z żelu grzebień.
5. próby z RNA należy inkubować w temperaturze 70 °C przez 1 min, a następnie umieścić na lodzie,
6. wypełnić studzienki przygotowanymi wcześniej roztworami RNA z obciążnikiem (3µl/próbę) w ilości 20µl/studzienkę,
7. włączyć zasilanie (100V) na ok.30-40min.,
8. po wskazanym czasie podświetlić żel lampą UV i przeanalizować powstałe prążki,



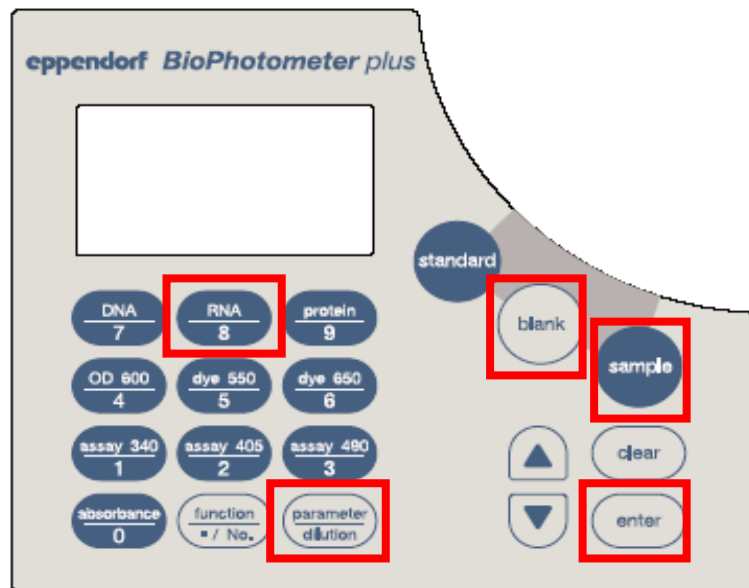
III. SPEKTROFOTOMETRYCZNY POMIAR STĘŻENIA RNA

Materiały, odczynniki, roztwory:

- Uzyskane w procesie izolacji próbki RNA
- Kuwety jednorazowe
- Tipy, pipety
- Woda

Aparatura:

- vortex
- Spektrofotometr



Wykonanie:

1. przygotować 20-krotne rozcieńczenia prób RNA (objętość końcowa próby do pomiaru: 60 μ l),
2. dobrać odpowiednie ustawienia aparatu (objętość próby, rozcieńczenie materiału, rodzaj kwasu nukleinowego, długość fali) i skalibrować go używając do tego celu kuwety wypełnionej wodą ($A_{260}=0$),
3. wypełnić kuwetę 60 μ l rozcieńczonej próby RNA i włożyć ją do spektrofotometru tak, by wiązka promieni przechodziła przez gładkie ścianki kuwety,
4. odczytać stężenie próby i przeanalizować wartości absorbancji przy długości fali 260, 280 oraz 230nm,

