Materiały do ćwiczeń z przedmiotu:
„BIOLOGIA MOLEKULARNA”
Farmacja

Zakład Farmacji Stosowanej
Wydział Farmaceutyczny, WUM
ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa

Analiza jakościowa i ilościowa kwasów nukleinowych

1. Izolacja DNA

<u>Przeprowadzić izolację DNA metoda kolumienkową według schematu:</u>

1. Osad komórek dokładnie zawiesić (przepipetować) w 100 µl buforu Tris.
2. Dodać 200 µl buforu lizującego LT.
3. Dodać 20 µl roztworu proteinazy K.
4. Całość wymieszać przez odwracanie probówki i inkubować w temperaturze 37°C (15 min).
5. Przenieść probówkę do 70°C i inkubować 5 min.
6. Wirować 3 min przy 13 tyś. rpm.
7. Pobrać supernatant i nanieść na minikolumnę do oczyszczania genomowego DNA.
8. Wirować 1 min przy 13 tyś. rpm.
9. Wyjąć minikolumnę i wylać przesącz z odbieralnika do pojemnika na odpady płynne. Kolumnę umieścić ponownie w tym samym odbieralniku. Do kolumny dodać 500 µl roztworu płuczącego A1 (DNA znajduje się na minikolumnie).
10. Do probówki 1,5 ml odpipetować 100 ul buforu Tris i wstawić go do termobloku o temp 70 °C. Ogrzewać aż do momentu wykonania punktu nr 15 (ogrzany bufor będzie potrzebny do punktu nr 15).
11. Minikolumnę wraz z odbieralnikiem wirować 1 min przy 13 tyś. rpm.
12. Usunąć przesącz z odbieralnika i dodać do minikolumny 400 µl roztworu płuczącego A1 (DNA znajduje się na minikolumnie).
13. Wirować 2 min przy 13 tyś. rpm.
14. Minikolumnę umieścić w nowej probówce bez wieczka i do złoża znajdującego się na dnie kolumny dodać 100 µl buforu Tris uprzednio ogrzanego do 70°C.
15. Inkubować 2 min w temperaturze pokojowej.
16. Wirować 1 min przy 13 tyś. rpm.
17. Minikolumnę usunąć, a oczyszczone DNA znajdujące się w probówce przenieść pipetą do eppendorfa.

2. Reakcja PCR identyfikująca gen ACTB

Wykonanie mieszaniny reakcyjnej

1. Należy wykonać tzw. mix reakcyjny według schematu poniżej, dodając poszczególne ilości do probówki o objętości 100 µl.

Master Mix	12,5 µl
Starter F	1,25 µl
Starter R	1,25 µl
Wyizolowane DNA	10 µl

2. Przygotowany mix zworteksować lub kilkukrotnie przepipetować i zwirować.
3. Opisać próbki i włożyć do termocyklera.
4. Reakcję PCR prowadzić w następujących warunkach:

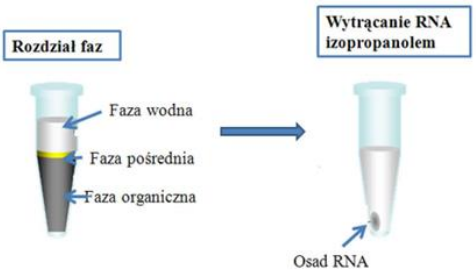
2 min	95° C	
30 sek	95° C	**30 cykli**
30 sek	49,7° C	
30 sek	72° C	
2 min	72° C	

5. Próbki po wyjęciu z termocyklera należy krótko zworteksować.

3. Izolacja RNA

<u>Przeprowadzić izolację RNA metodą Chomczyńskiego</u>

1. Osad komórek zawiesić w 0,5 ml Trizolu (dobrze „przepipetować”).
2. Inkubować 5 min w temp pokojowej.
3. Dodać 100 ul chloroformu i wytrząsać w ręku przez 15s – uwaga, „leje” się z pipety – niskie napięcie powierzchniowe.
4. Inkubować 2-3 min w temperaturze pokojowej.
5. Wirować 11 500 rpm / 10 min / 4ºC.
6. **<u>Górną wodną fazę przenieść do nowej probówki.</u>**
7. Dodać 0,25 ml izopropanolu i delikatnie wymieszać, obracając probówkę.
8. Inkubować 5 min w temperaturze pokojowej.
9. Wirować 11 500 rpm / 7 min / 4ºC.
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 / 4ºC.
13. Odrzucić supernatant obserwując osad RNA.
14. Osad RNA suszyć na powietrzu, pozostawiając probówkę otwarta i ustawiając ja do góry dnem na bibule przez 10 – 20 min.
15. RNA zawiesić w 30 µl wody (wolnej od RNaz, woda do wstrzykiwań).



Ryc. 1. Rozdział faz podczas izolacji RNA

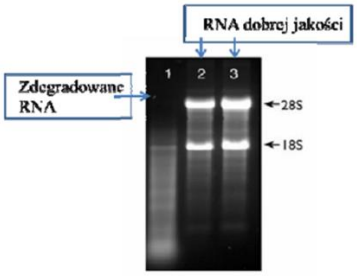
3. Ocena jakościowa kwasów nukleinowych – elektroforeza w żelu agarozowym

Przygotowanie żelu agarozowego

1. Saneczki włożyć w formę i wyważyć jej równowagę.
2. W saneczki włożyć grzebień.
3. Przygotować 2 żele agarozowe:
    a. 1,2 % w objętości 70 ml (małe saneczki) lub 140 ml (duże saneczki);
    b. 1,8 % w objętości 70 ml (małe saneczki) lub 140 ml (duże saneczki).
4. Do naważki agarozy dodać buforu TAE 1x.
5. Odpowiednia naważkę agarozy rozpuścić na gorąco w buforze TAE 1x (użyć kuchenki mikrofalowej).
6. Klarowny roztwór agarozy ochłodzić do temp ok 50ºC.
7. Dodać 4 ul syber safe i zamieszać.
8. Wylać żel na saneczki, uważając by nie pojawiły się bąble powietrza.
9. Żel zastyga ok 20 min.

Elektroforeza RNA w żelu agarozowym

1. Z żelu wyciągnąć grzebień i przenieść saneczki do komory elektroforetycznej.
2. Napełnić komorę buforem TAE 1x, w ilości która zapewni pokrycie żelu.
3. Przygotować próby do nałożenia na żel:
    a. Odpipetować **10 µl próby DNA + 5 µl obciążnika**;
    b. Odpipetować **10 µl próby RNA + 5 µl obciążnika;**
    c. Odpipetować **10 µl próby produktu PCR + 5 µl obciążnika.**
4. wymieszać przez przepipetowanie w probówce i nałożyć na żel – jeżeli pozostał płyn na ściance próbówki, należy próbę zwirować.
5. Elektroforezę prowadzić przez 30 min / 80V.
6. Po zakończonej elektroforezie przeanalizować wynik w świetle UV.



Ryc. 2. Przykładowy rozdział elektroforetyczny RNA w żelu agarozowym.

4. Ocena ilościowa kwasów nukleinowych

Pomiar spektrofotometryczny

1. Dokonać pomiaru spektrofotometrycznego z użyciem spektrofotometru.
2. Wykonać rozcieńczenie analizowanych prób
    a. Do eppendorfa dodać 380 µl wody do iniekcji i 20 µl wyizolowanego DNA
    b. Do eppendorfa dodać 380 µl wody do iniekcji i 20 µl wyizolowanego RNA
3. Próbki zworteksować i zwirować.
4. Mieszaninę przenieść do kuwety pomiarowej.
5. Dokonać odczytu przy długości fali 230 nm, 260 nm i 280 nm.
6. Wyliczyć stężenie DNA i RNA korzystając ze wzorów:
    a. Dla DNA

    CDNA = 50 * A(260nm)* R

    gdzie:

    R - rozcieńczenie

    Absorbancja [A (260nm)] równa 1, odpowiada 50 µg DNA

    b. Dla RNA

    CDNA = 40 * A(260nm)* R

    gdzie:

    R - rozcieńczenie

    Absorbancja [A (260nm)] równa 1, odpowiada 40 µg RNA
7. Obliczyć stosunek 260 nm/ 280 nm oraz 260 nm/ 230 nm.