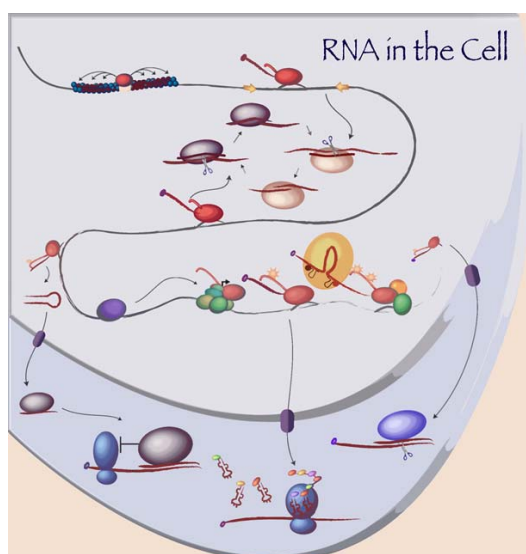


Izolacija RNA

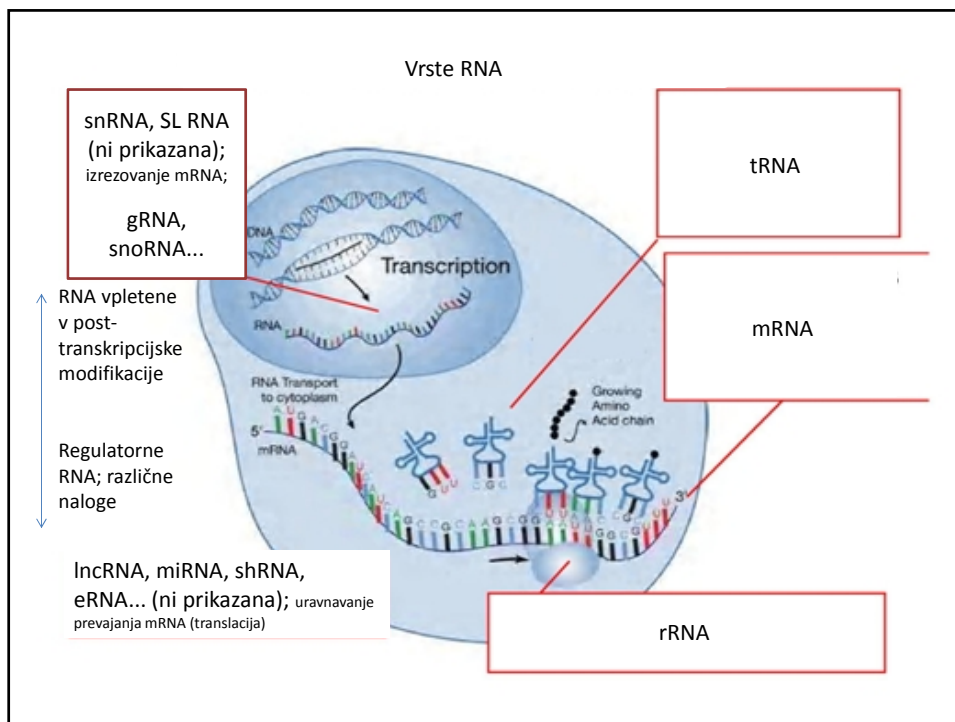
Petra Hudler
Inštitut za biokemijo, Medicinska fakulteta

Vloge RNA v celicah



Illustrated by Mary
Lindstrom; designed by
M.L. and Amy White

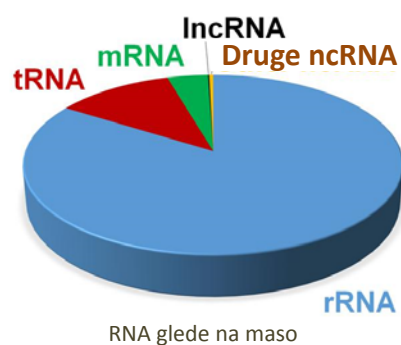
Phillip A. Sharp lab
Nobel prize 1993



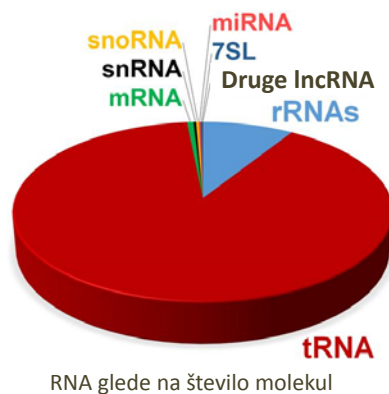
RNA v evkariontskih celicah

- 10^{-5} mikrogramov RNA
- Op. Ocenjena je količina/masa v povprečni celici sesalcev. Količine/mase posameznih vrst RNA so seveda različne v različnih celicah.

A



B



Front. Genet., 26 January 2015 | <http://dx.doi.org/10.3389/fgene.2015.00002>

Pogoste težave pri izolaciji mRNA

- Kemično nestabilna enoverižna molekula
- RNaze
 - Kje se nahajajo RNaze?
 - Kako preprečimo delovanje RNaz v postopku izolacije RNA?

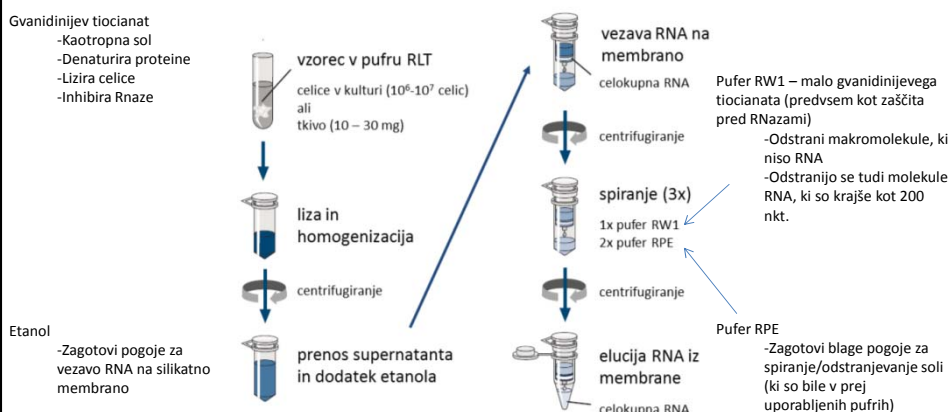
Inhibitorji RNaz

- DEPC: dietilpirokarbonat
 - Alkilirajoča spojina, modificira proteine, NK,...
- Alternativno: 1M NaOH, 3-odstotni H₂O₂
- Vanadil ribonukleozidni kompleksi
- Proteinski inhibitorji RNaz

Osnovni koraki izolacije RNA

- Odvzem vzorca
- Homogenizacija // odstranjevanje rdečih krvničk, če imamo kri
- Liza celic (denaturanti, inhibitorji RNaz)
- Denaturacija/razgradnja proteinov
- Ločevanje RNA od razgrajenih/denaturiranih proteinov, DNA, lipidov, ostalih celičnih komponent...
- Obarjanje RNA
- Raztapljanje RNA v ustreznem pufru

Izolacija RNA z afinitetno kolono



Natančna sestava pufov ni znana. Qiagen™

Izvedba vaje

- Razdelitev v skupine po 2 (3).
- Sledite navodilom, stran 9.
- Očistite delovne površine in pribor.
- Dodajte pufer RLT, prenesite v 2 ml centrifugirke, navodila, str. 10.
- Homogenizirajte v digestoriju. Po vsaki homogenizaciji sperite homogenizator z DEPC H_2O – 2x. Po potrebi s papirjem odstranite tkivo iz kovinskega nastavka.
- Sledite navodilom na strani 10.

Analiza RNA

- A (RNA, max) pri 260 nm
- A (proteini, max) pri 280 nm
- A (kontaminanti) pri 230 nm

- $A_{260}/A_{280} > 1,8$
- $A_{260}/A_{230} > 1,8$

Analiza RNA

- $[RNA] = \frac{A_{260}}{\text{dolžina poti}} \times \text{standardni koeficient} \times \text{faktor redčitve}$
- $\text{Donos RNA} = [RNA] \times V_{vzo_{rca}}$
- RIN

Poročilo

- Rezultate analize dobite po e-pošti.
- Napišite poročilo, pošljite ga na naslov:
petra.hudler@mf.uni-lj.si
- Elementi poročila (1 – 2 strani, imena in priimki študentov v skupini, številka vzorca):
 - Namen vaje
 - Rezultati
 - Komentar rezultatov
 - Odgovorite na vprašanja iz razprave, str. 12.
 - Poslati do 22. 11. 2017