



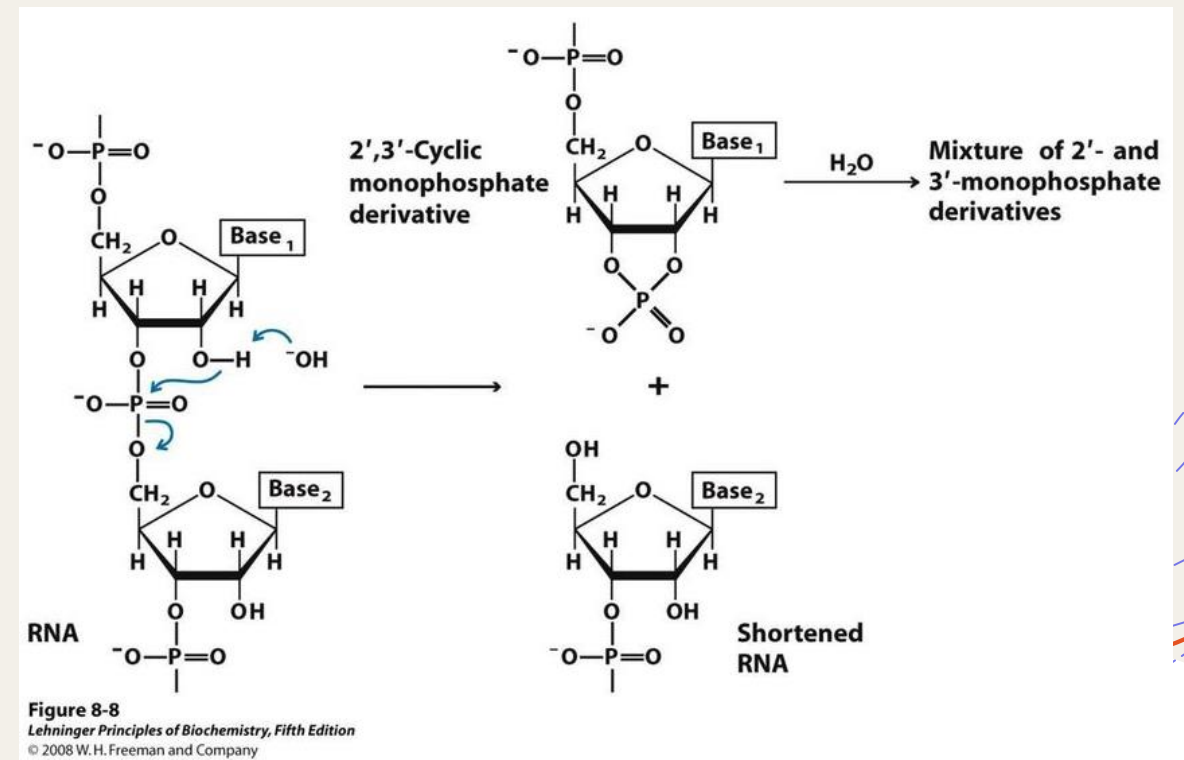
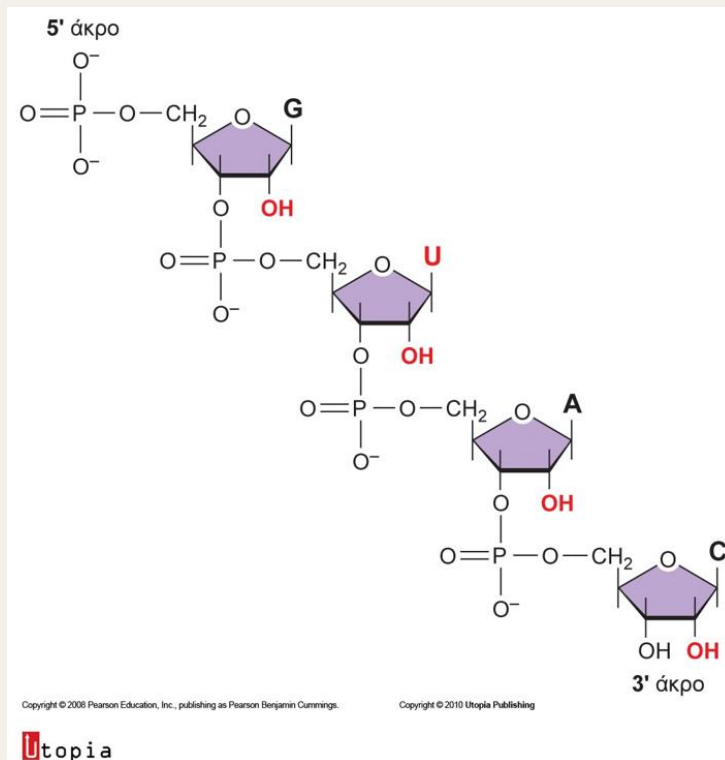
Εργαστηριακές ασκήσεις MB

Άσκηση 2

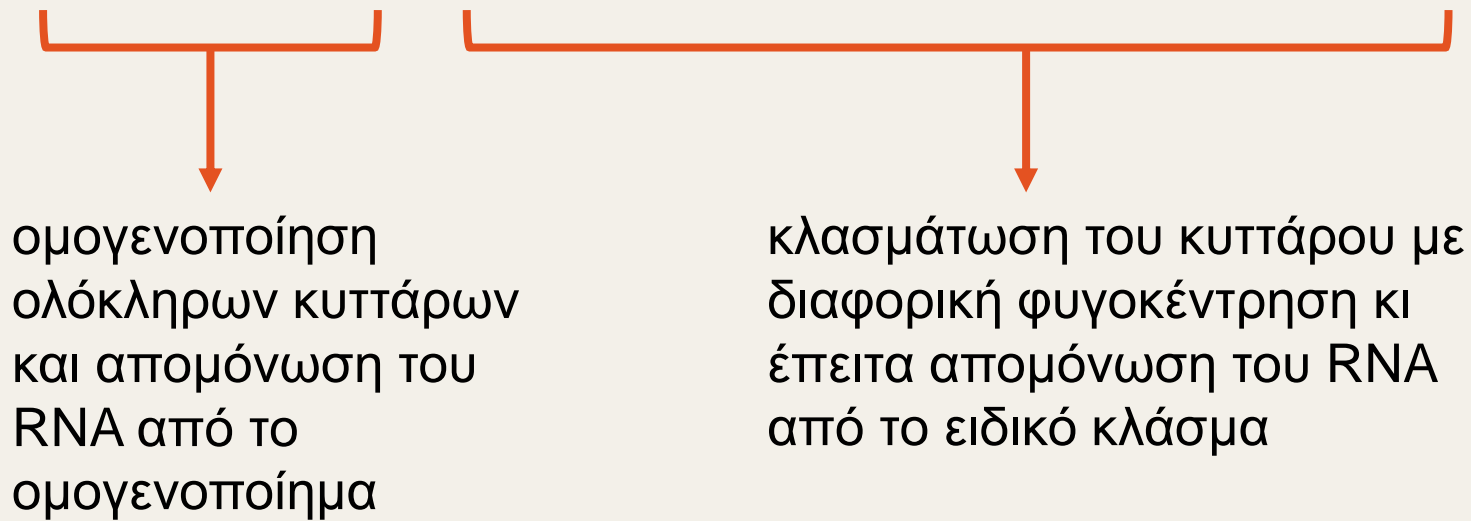
α. Απομόνωση ολικού RNA από ζωικό ιστό

Θεωρία

- ❖ Το RNA αποτελεί πρώτη ύλη σε μια σειρά βασικών πειραμάτων όπως ανάλυση Northern, κατασκευή cDNA βιβλιοθήκης, *in vitro* μετάφραση, RT-PCR κλπ.
- ❖ Ευαίσθητο μόριο, απαιτεί μεγάλη προσοχή κατά την απομόνωσή του.
- ❖ Κίνδυνος αποικοδόμησης από: αλκαλικές συνθήκες, ριβονουκλεάσες



- ❖ Ανάλογα με το είδος RNA που χρειαζόμαστε επιλέγουμε τον τρόπο απομόνωσης
Ολικό RNA, πυρηνικό, ριβοσωμικό, mRNA κλπ.



Γενικό πλάνο απομόνωσης χρ. DNA –ολ. RNA από ιστό

Ομογενοποίηση σε ρυθμιστικό διάλυμα χαμηλής ιονικής ισχύος
(0.14 M NaCl - 0.01 M NaCitrate, pH 7.3)
(Σπάσιμο κυττάρων και υποκυτταρικών οργανιδίων, ελευθέρωση
DNPs, RNPs, κυτταροπλασματικών συστατικών)

Ομογενοποίηση σε αντιδραστήριο όξινης θειοκυανικής
γουανιδίνης-φαινόλης
(Λύση κυττάρων, και υποκυτταρικών οργανιδίων,
αποδιάταξη πρωτεϊνών, ελευθέρωση νουκλεϊκών οξέων)

Φυγοκέντρηση ομογενοποιηήματος
(διαχωρισμός διαλυτών-αδιάλυτων συστατικών)

Φυγοκέντρηση ομογενοποιηήματος
(απομάκρυνση αδιάλυτων
μεμβρανών στο ίζημα)

DNA

ολικό RNA

ολικό RNA

Ίζημα
(αδιάλυτα: DNPs, μεμβράνες)

Υπερκείμενο
(διαλυτά: RNPs, κυτταροπλασματικά συστατικά)

Υπερκείμενο
(DNA, RNA, πρωτεΐνες, λιπίδια)

Αναδιάλυση του ιζήματος σε
διάλυμα υψηλής αλατότητας
(2,6 M NaCl)
(καθαρισμός/διαλυτοποίηση
DNA, κατακρήμιση πρωτεϊνών)

Προσθήκη **SDS** και διαδοχικές
εκχυλίσεις με **φαινόλη/χλωροφόρμιο**
(καθαρισμός του RNA από πρωτεΐνες)

Προσθήκη χλωροφορμίου
vortex

Φυγοκέντρηση

Φυγοκέντρηση

Φυγοκέντρηση
Διαχωρισμός:
➤ RNA πάνω υδατική φάση
➤ DNA: μεσόφαση
➤ Πρωτεΐνες: κάτω οργανική φάση

Κρατάμε υπερκείμενο

Κρατάμε τελική υδατική φάση

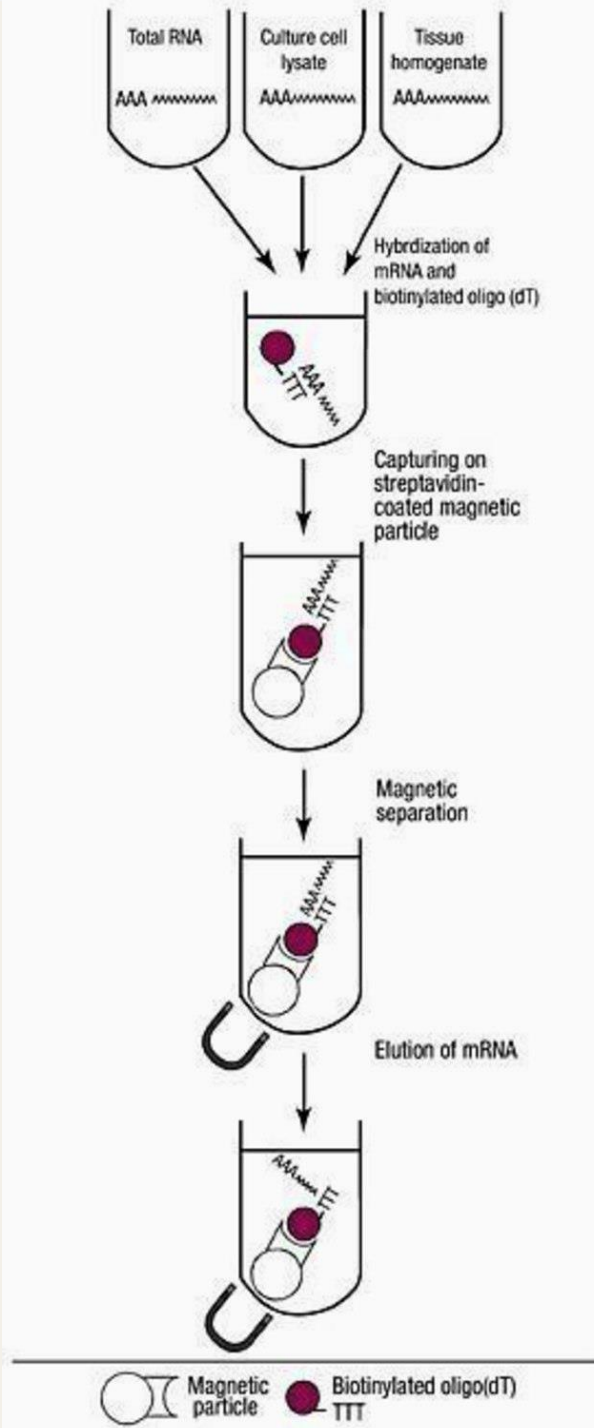
Κρατάμε πάνω υδατική φάση

Κατακρήμιση DNA με προσθήκη 2
όγκων αιθανόλης 95%

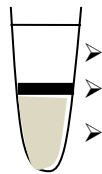

Κατακρήμιση RNA με προσθήκη 2
όγκων αιθανόλης 95%

Κατακρήμιση RNA με προσθήκη
ίσου όγκου ισοπροπανόλης

Απομόνωση polyA RNA, mRNA



- ❖ SDS: απορρυπαντικό. Αποδιατάσσει πρωτεΐνες (και νουκλεάσες)
- ❖ Φαινόλη: Οργανικός διαλύτης (μη πολικός). Αλληλεπιδρά με τις υδρόφοβες ομάδες των πρωτεϊνών και τις διαλυτοποιεί. (πυκνότητα ΦΟΗ 1.08 > πυκνότητα H₂O)
 - Σε ουδέτερο pH (7-8) τα DNA και RNA είναι αρνητικά φορτισμένα άρα αδιάλυτα στη φαινόλη.
 - Σε όξινες συνθήκες (pH 4-4.5) τα (-) φορτία των φωσφορικών ομάδων εξουδετερώνονται από τα H⁺, ενώ το RNA παραμένει αρνητικά φορτισμένο καθώς οι ομάδες του έχουν μεγαλύτερο pK_a από το DNA. Έτσι, το DNA διαλύεται στην όξινη φαινόλη.
- ❖ Χλωροφόρμιο: οργανικός διαλύτης, ενισχύει την αποδιάταξη των πρωτεϊνών από την φαινόλη, διαλύει λιπίδια, διευκολύνει το διαχωρισμό της φαινόλης από το H₂O (μεγαλύτερη πυκνότητα 1.48)
- ❖ Θειοκυανική γουανιδίνη (guanidinium thiocyanate): χροτροπικός παράγοντας, αποδιατάσσει πρωτεΐνες.

Εκχύλιση με φαινόλη (pH>7,8)-χλωροφόρμιο	Εκχύλιση με μείγμα όξινης θειοκυανικής γουανιδίνης-φαινόλης – χλωροφορμίου
 <ul style="list-style-type: none"> ➤ υδατική φάση (DNA ή/και RNA) ➤ μεσόφαση (πρωτεΐνες) ➤ οργανική φάση (πρωτεΐνες, λιπίδια) 	 <ul style="list-style-type: none"> ➤ υδατική φάση (RNA) ➤ μεσόφαση (DNA) ➤ οργανική φάση (πρωτεΐνες, λιπίδια)

Η απομόνωση καθαρού RNA μη αποδιαταγμένου ήταν επίπονη διαδικασία μέχρι το 1987 όπου οι P.Chomczynski P & N. Sacchi πρότειναν μια μέθοδο για απομόνωση πολύ καλής ποιότητας RNA σε 1 βήμα.

Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate–Phenol–Chloroform Extraction

PIOTR CHOMCZYNSKI*¹ AND NICOLETTA SACCHI†

*Laboratory of Biochemistry and Metabolism, NIDDK, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892, and †Laboratory of Molecular Oncology, NCI, National Institutes of Health, Frederick, Maryland 21701

Received May 27, 1986

A new method of total RNA isolation by a single extraction with an acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform mixture is described. The method provides a pure preparation of undegraded RNA in high yield and can be completed within 4 h. It is particularly useful for processing large numbers of samples and for isolation of RNA from minute quantities of cells or tissue samples. © 1987 Academic Press, Inc.

KEY WORDS: nucleic acids; RNA; messenger RNA; purification; gene expression; human cells.

Το μείγμα όξινης θειοκυανικής γουανιδίνης – φαινόλης κυκλοφορεί στο εμπόριο ως TRIzol (Ambion) ή TRI-reagent (MRC).

Το όνομα υποδηλώνει ότι από το ίδιο δείγμα μπορεί θεωρητικά να απομονώσει κανείς και τα τρία συστατικά (DNA, RNA και πρωτεΐνες)

πείραμα

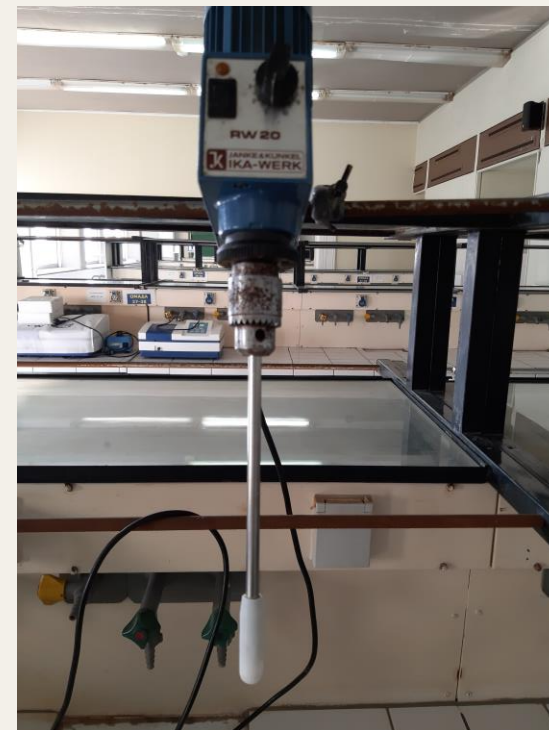
Υλικά:

- Ιστός
- Αντιδραστήριο TRIZOL
- Χλωροφόρμιο
- Ισοπροπανόλη
- 75% αιθανόλη
- Ρυθμιστικό διάλυμα TE

στον πάγκο



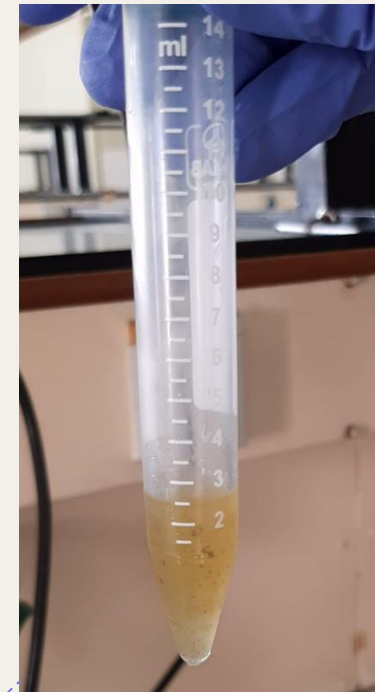
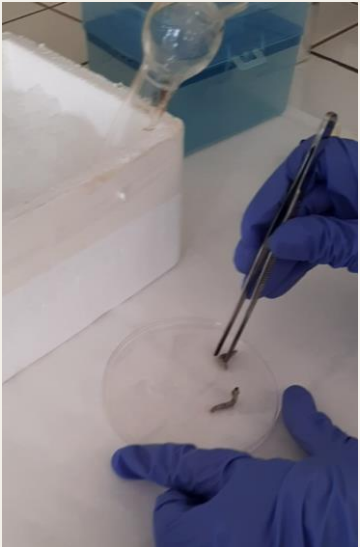
Ιστός (λάρβες μεταξοσκώληκα)



ομογενοποιητής

Πειραματική Διαδικασία

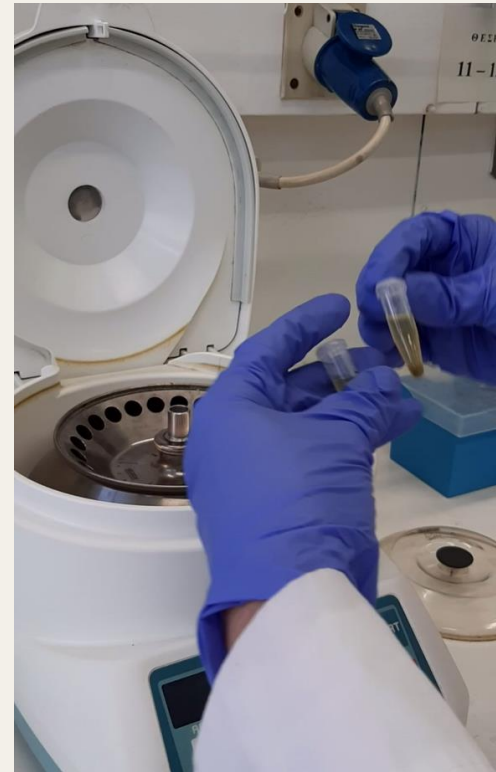
1. 200 mg ιστού ομογενοποιούνται σε 2,5 ml αντιδραστήριου TRIZOL με ομογενοποιητή dounce.



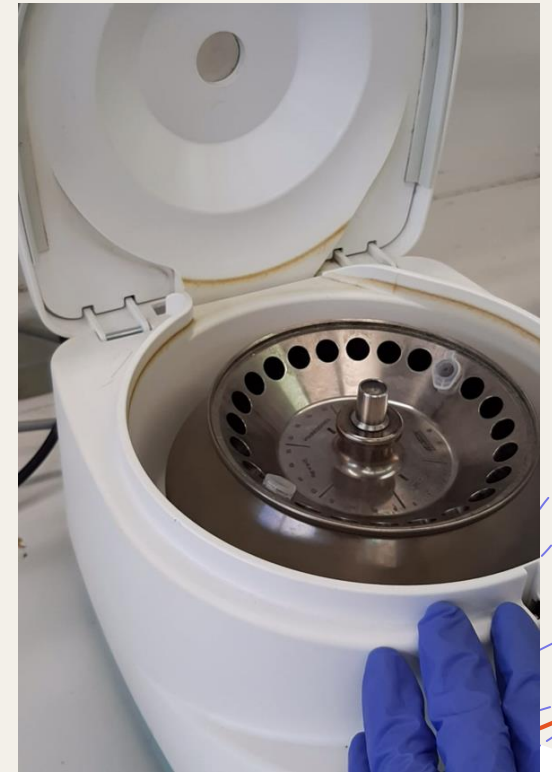
2. 1 ml από το ομογενοποίημα μεταφέρεται σε σωληνάκι τύπου errendorf και το δείγμα παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
3. Φυγοκέντρηση του δείγματος στις 10000 στροφές για 5 λεπτά (απομάκρυνση αδιάλυτων μεμβρανών και επιδερμίδας).



Μεταφορά 1 ml ομογενοποιηματος σε σωλάκι erp



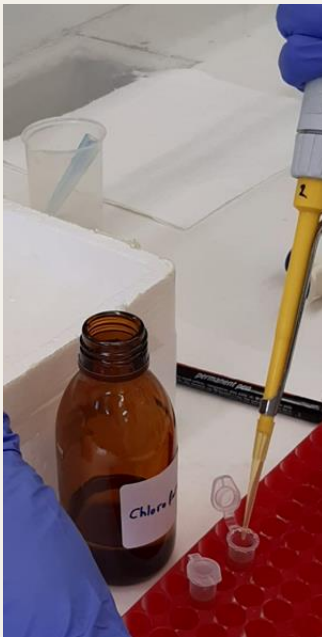
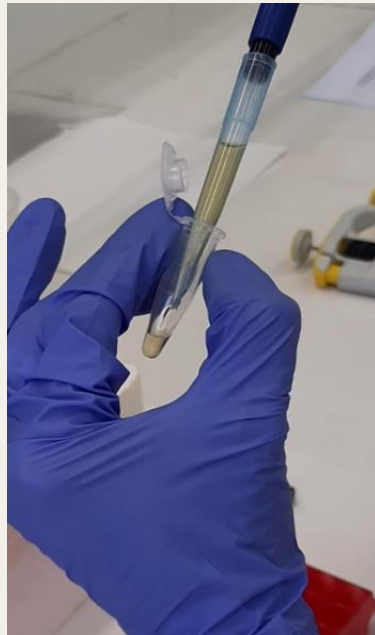
Φυγοκέντρηση



4. Μεταφορά του υπερκειμένου σε καθαρό σωληνάκι τύπου erpendorf και προσθήκη 200 μ λ χλωροφορμίου.
5. Έντονη ανάδευση (vortex) για 15 δευτερόλεπτα και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3 λεπτά.
6. Φυγοκέντρηση του δείγματος στις 12000 στροφές για 15 λεπτά [διαχωρισμός υδατικής φάσης (πάνω)-οργανικής φάσης (κάτω), καθαρισμός του RNA από πρωτεΐνες και DNA].



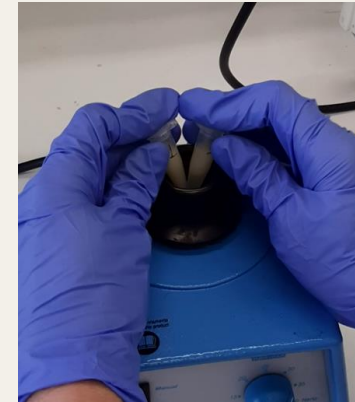
Μεταφορά υπερκειμένου σε καθαρό σωληνάκι



Προσθήκη χλωροφορμίου

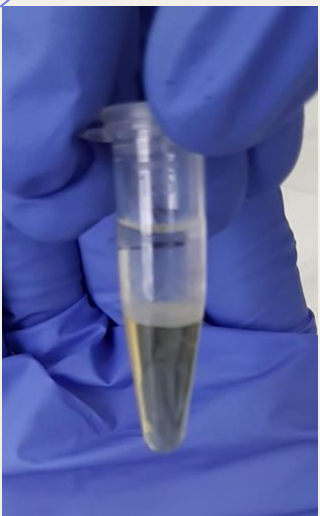


vortex



φυγοκέντρηση

7. Μεταφορά της πάνω υδατικής φάσης (400 μ l) σε καθαρό σωληνάκι τύπου errendorf και προσθήκη 400 μ l ισοπροπανόλης.
8. Ανάδευση (αναποδογουρίζοντας το σωληνάκι 5-6 φορές) και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά (κατακρήμνιση του RNA).
9. Φυγοκέντρηση του δείγματος στις 12000 στροφές για 10 λεπτά (συγκέντρωση του ιζήματος RNA στον πάτο του errendorf).



Διαχωρισμός
φάσεων



Μεταφορά υδατικής φάσης σε καθαρό
σωληνάκι



Προσθήκη ισοπροπανόλης



Ανάδευση



Φυγοκέντρηση

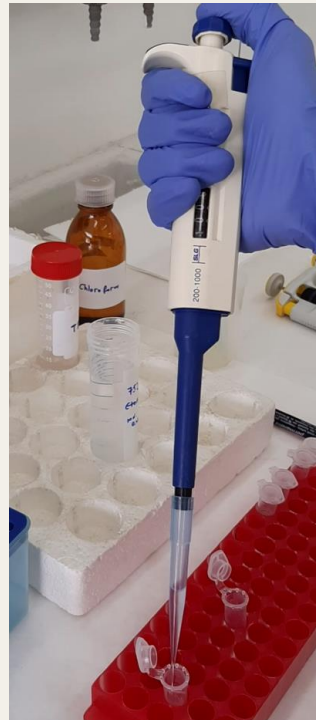
10. Απομάκρυνση του υπερκειμένου και προσθήκη 1 ml 75% αιθανόλης. Ανάδευση αναποδογυρίζοντας το σωληνάκι 1-2 φορές (ξέπλυμα του ιζήματος από άλατα).
11. Φυγοκέντρηση του δείγματος στις 12000 στροφές για 5 λεπτά.
12. Επανάληψη των βημάτων 10 και 11.



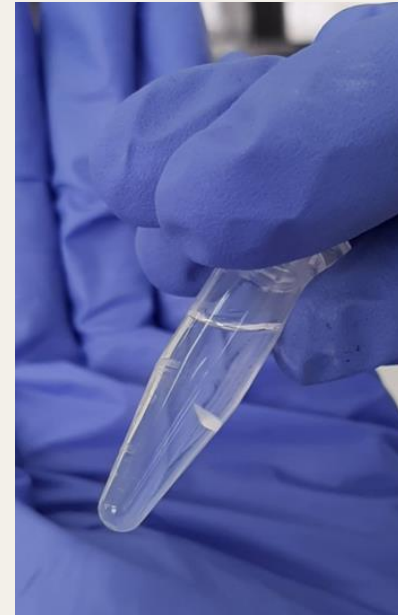
Ίζημα RNA



Απομάκρυνση
υπερκειμένου



Προσθήκη 75%
αιθανόλης



Ανάδευση



Φυγοκέντρηση

13. Απομάκρυνση του υπερκειμένου και στέγνωμα του ιζήματος στον αέρα για 4-5 λεπτά.
14. Αναδιάλυση του ιζήματος σε 50 μl ρυθμιστικό διάλυμα TE.



Απομάκρυνση
υπερκειμένου



Στέγνωμα ιζήματος



Αναδιάλυση ιζήματος σε TE





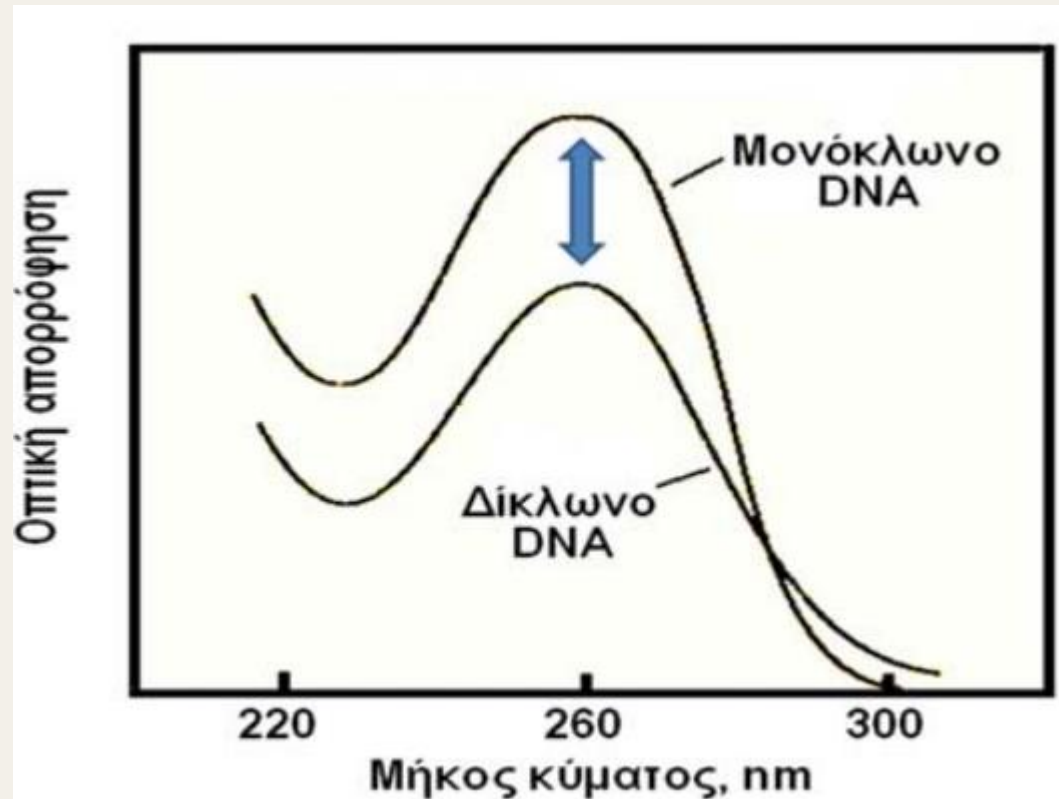
Άσκηση 2

β. Ποσοτικός προσδιορισμός του RNA

Αρχή της μεθόδου

Τα νουκλεϊκά οξέα απορροφούν υπεριώδες φως με μέγιστο απορρόφησης σε μήκος κύματος 260 nm.

Η μέτρηση της απορρόφησης (A_{260}) δεν μπορεί να διακρίνει DNA από RNA.



Οι μονάδες απορρόφησης (A_{260}) μπορούν να μετατραπούν σε συγκέντρωση με βάση κάποιες μέσες σταθερές απορροφητικότητας που έχουν υπολογιστεί.

Παρόλο που διαφορετικά τμήματα DNA ή RNA (με διαφορετική σύσταση ή στερεοδιάταξη) μπορεί να έχουν ελαφρώς διαφορετικές σταθερές απορροφητικότητας, έχουν διεθνώς καθοριστεί οι ακόλουθοι συντελεστές μετατροπής της A_{260} σε συγκέντρωση νουκλεϊκών οξέων:

Νουκλεϊκό οξύ	A_{260}	Συγκέντρωση
Για καθαρό δίκλωνο DNA:	1	50 $\mu\text{g} / \text{ml}$
Για καθαρό RNA:	1	40 $\mu\text{g} / \text{ml}$

Η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί επίσης για τον έλεγχο της καθαρότητας του δείγματος από άλλες ουσίες, όπως πρωτεΐνες. Για το σκοπό αυτό υπολογίζουμε το λόγο των απορροφήσεων στα 260 nm και στα 280 nm (A_{260}/A_{280}).

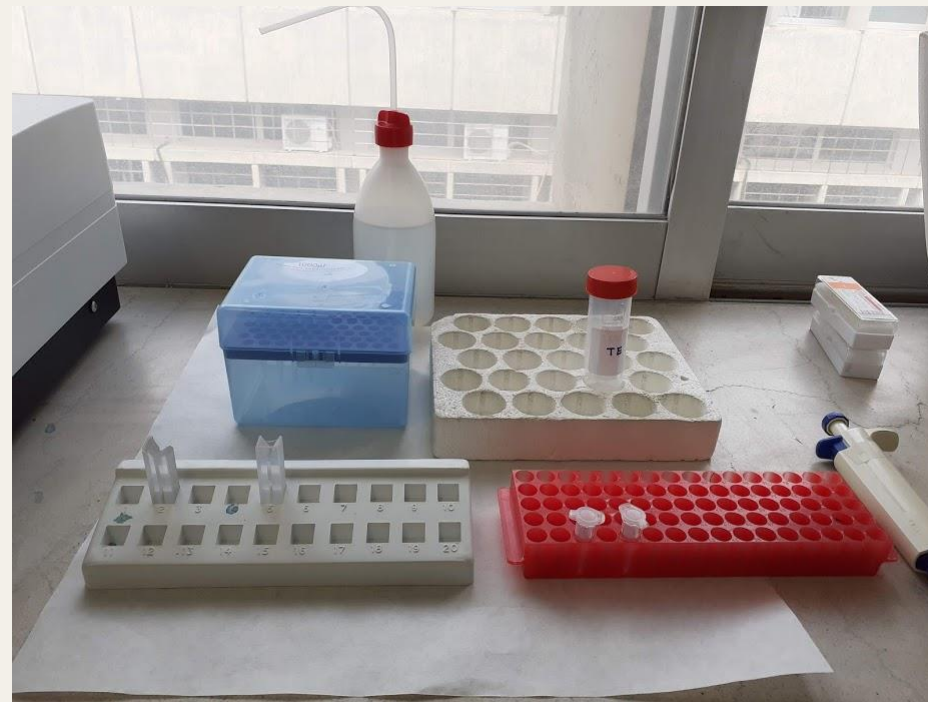
Ένα καθαρό διάλυμα DNA έχει λόγο $A_{260}/A_{280} \sim 1,8$

Ένα καθαρό διάλυμα RNA έχει λόγο $A_{260}/A_{280} \sim 2$.

Τιμές μικρότερες από 1,8 υποδεικνύουν προσμίξεις από πρωτεΐνες (ή φαινολικές ενώσεις).

Μέτρηση στο φωτόμετρο UV

- 10 μl από το δείγμα RNA αραιώνονται σε 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος TE.
- Μετράμε την απορρόφηση στα 260 nm και στα 280 nm, μεταφέροντας το αραιωμένο δείγμα σε κυψελίδα χαλαζία.
- Ως τυφλό θα χρησιμοποιηθεί διάλυμα TE.
- Υπολογίστε τη συγκέντρωση του αρχικού δείγματος και το λόγο A_{260}/A_{280} .



	A260	A280	C $\mu\text{g/ml}$	A260/A280
$\Delta 1$	0.634	0.320		
$\Delta 2$	0.684	0.361		

	A260	A280	C $\mu\text{g/ml}$	A260/A280	C αρχ. δειγματος
$\Delta 1$	0.634	0.320	25.36	1.98	2536 $\mu\text{g/ml}$
$\Delta 2$	0.684	0.361	27.36	1.89	2736 $\mu\text{g/ml}$