

7. Wyodrębnianie RNA z drożdży. Elektroforeza agarozowa kwasów nukleinowych

RNA obecne w drożdżach można wyekstrahować ze zhomogenizowanych komórek za pomocą 2% roztworu soli sodowej siarczanu dodecyłu (SDS). Tak otrzymany ekstrakt zawiera niewielkie ilości DNA (<0,5%) i białka (<2,0%).

Odczynniki i sprzęt laboratoryjny.

1. Świeże drożdże
2. 2% roztwór SDS (soli sodowej siarczanu dodecyłu)
3. 95% etanol
4. Roztwór octanu potasu (200 g/L, pH 5,0)
5. Bufor TBE (Tris/kwas borowy/EDTA) – roztwór podstawowy 10-krotnie stężony o składzie: 108 g Tris, 55 g kwasu borowego oraz 3,7 g EDTA w 1000 mL wodnego roztworu.
6. Bufor ładujący: 50% roztwór gliceryny w buforze TBE z dodatkiem błękitu bromofenyłowego
7. Wirówka
8. Łaźnia wodna
9. Kolby płaskodenne i okrągłodenne
10. Cylindry miarowe
11. Zlewki
12. Agarozą
13. Bromek etydyny
14. Aparat do elektroforezy agarozowej.
15. Transluminator lub zwykła lampa UV

Wykonanie doświadczenia:

1. Izolacja RNA

W kolbie płaskodennej doprowadzić do wrzenia 10 mL 2% roztworu SDS. Do wrzącego roztworu dodać 2 g rozdrobnionych świeżych drożdży i zawartość ogrzewać przez 3 minuty. Następnie kolbę schłodzić strumieniem zimnej wody z kranu, przenieść zawartość kolby do próbki wirówkowej i odwirować przez 10 min przy 6000 RPM. Supernatant przenieść do kolbki płaskodennej, dodać 1 mL roztworu octanu potasu, a następnie 22 mL etanolu. Mieszaninę z wytrąconym RNA pozostawić na łaźni lodowej (zamrażarce) przez 0,5 godziny, a następnie odwirować przez 6 min przy 6000 RPM. Roztwór nad osadu zdekantować, zaś otrzymany osad RNA rozpuścić w 1 mL wody. Roztwory otrzymane w wyniku izolacji RNA z drożdży należy przechowywać w temperaturze 0°C, aż do momentu ich analizy.

2. Przygotowanie żelu

Przygotować 2 L rozcieńczonego buforu TBE biorąc 1 część stężonego roztworu i 9 części wody. Następnie naważyć 1,6 g agarozy i dodać ją do 200 mL uprzednio przygotowanego buforu w kolbie płaskodennej. Całość doprowadzić do wrzenia i odczekać, aż cały roztwór będzie klarowny. Odczekać 2-3 minuty a następnie dodać 1 µL bromku etydyny*.

*** Ostrożnie, substancja kancerogenna, należy pracować tylko w rękawiczkach!**

Po rozpuszczeniu bromku etydyny całość starannie wymieszać. Zmontować pod wyciągiem zestaw do wylewania żelu agarozowego i do poprawnie zamontowanego zestawu (**uwaga: sprawdzić szczelność!**) wylać roztwór agarozowy. Należy pamiętać, aby w zestawie znajdował się grzebień do tworzenia studzienek w żelu. Po 20 minutach przenieść żel do aparatu do elektroforezy agarozowej, zalać żel uprzednio przygotowanym rozcieńczonym buforem TBE i ostrożnie wyjąć grzebień z żelu.

3. Nanoszenie próbki na żel

W próbkach Eppendorfa umieścić kolejno 100 μL otrzymanego w wyniku izolacji roztworu RNA i dodać taką samą objętość buforu ładującego. Następnie zachowując ostrożność delikatnie nanieść dwie próbki do studzienki za pomocą pipety automatycznej odpowiednio 20 i 30 μL . Należy pamiętać o tym, że podczas pracy z RNA lub DNA, trzeba pracować w rękawiczkach jednorazowych, a szkło powinno być czyste (najlepiej przemyte bezpośrednio przed użyciem etanolem i wysuszone).

4. Elektroforeza

Uwaga:

Obsługa aparatu do elektroforezy agarozowej należy do prowadzącego! Ze względu na ryzyko porażenia prądem elektrycznym należy zachować szczególną ostrożność podczas pracy w pobliżu tego urządzenia.

Po naniesieniu próbek podłączyć elektrody do zasilacza i nastawić zasilacz na napięcie 80-100 V. Rozdział prowadzić godzinę. Po tym czasie od aparatu odłączyć elektrody i ostrożnie wyjąć żel. Używając transluminatora lub zwykłej lampy UV zaobserwować migrację RNA w żelu.

Zakres materiału:

Zasada rozdziału kwasów nukleinowych w elektroforezie żelowej, budowa kwasów nukleinowych: pojęcia nukleotydu, nukleozydu, zasada azotowa, SDS, odczynnik interkalujący