

RNA Blue

REAGENS PRO RYCHLOU PŘÍPRAVU ČISTÉ A NEDEGRADOVANÉ RNA
(katalogové číslo R011, R012, R013)

rev. 04/2025

Upozornění: RNA Blue obsahuje fenol a další toxické komponenty. Při kontaktu s kůží je nutné omytí velkým množstvím vody.



Popis

RNA Blue je reagens progresivní metody izolace RNA. Základy metody byly popsány v práci Chomczynski, P. a N. Sacchi, Anal. Biochem., 162: 156-159, 1987. Buňky jsou lyzovány nebo homogenizovány v RNA Blue při zachování integrity RNA, DNA i proteinů. Přidání chloroformu a následná krátká centrifugace vedou k separaci vzorku do tří fází: 1. vodní fáze, obsahující RNA, 2. interfáze, obsahující DNA a 3. organické modře zabarvené fáze, obsahující proteiny. RNA je izolována z vodní fáze precipitací isopropylalkoholem. RNA Blue reagens je možné použít na současnou izolaci RNA, DNA a proteinů ze vzorků různého původu, včetně člověka, zvířat, rostlin, kvasinek, bakterií a virů. Jeden ml RNA Blue umožňuje izolovat RNA, DNA a proteiny z 50 - 100 mg tkáně, 5×10^6 buněk nebo z misky (10 cm²) s kulturou adherentních buněk.

RNA izolovaná pomocí reagens RNA Blue je čistá ($A_{260/280} = 1,65 - 1,8$) a v nedegradované formě (RNA o velikosti 0,1 - 15 kb).

Technické údaje

Komponenty balení

- Lahvička RNA Blue o obsahu 25, 50, 100 ml.
- Podrobný návod na izolaci RNA, DNA a proteinů.

Skladování

- Skladovat při teplotě 4°C ± 3°C.

Kontrola kvality

- Při použití doporučeného protokolu je izolovaná RNA nedegradovaná, jak je dokumentováno po elektroforetické separaci RNA ve formaldehydovém gelu a barvením ethidium bromidem.

Kat. č.	Název výrobku a specifikace	Množství
R011	RNA Blue	25 ml
R012	RNA Blue	50 ml
R013	RNA Blue	100 ml



RNA Blue

REAGENS PRO RYCHLOU PŘÍPRAVU ČISTÉ A NEDEGRADOVANÉ RNA

(katalogové číslo R011, R012, R013)

Protokol

1. Návod na izolaci RNA

Problémem při izolaci RNA je existence RNáz, které je obtížné inhibovat. Z tohoto důvodu práce s RNA vyžaduje určitá opatření:

- Při práci je nutno používat jednoúčelové rukavice aby nedošlo ke kontaminaci vzorku RNázami, které jsou přítomny na rukou.
- Je nutné používat sterilní zkumavky a automatické pipety, určené výhradně pro práci s RNA.
- RNA Blue reagens obsahuje silné inhibitory RNáz, které zajistí, že RNA je intaktní. Postupy následné po kroku 1.2. (viz níže) však musí být prováděny za podmínek zamezujících kontakt vzorku s RNázami. Sklo musí být vystaveno působení vysoké teploty (180°C, 4 hod) a plastické předměty musí být vystaveny působení 0,5 M NaOH po 10 min, extenzivně propláchnuty vodou a autoklávovány. Je rovněž nutné zamezit kontaminaci vzorku bakteriemi a plísněmi.

Požadovaná reagens:

- chloroform (bez doplňků),
- isopropylalkohol,
- voda, zbavená RNáz (PCR Ultra H₂O, kat.č. P040),
- 75% ethanol ve vodě, bez RNáz (PCR Et-OH, kat. č. P044).

1.1. Homogenizace buněk

Homogenizace buněk se provádí při pokojové teplotě (15 - 30°C).

1.1.1. Buňky v suspenzi. Buňky jsou peletovány centrifugací. K 5 - 10 x 10⁶ buněk (např. leukemických) je přidán 1 ml RNA Blue a buňky jsou rozvolněny pipetováním.

1.1.2. Buňky rostoucí jako monolayer. Z buněk je odstraněno kultivační medium (odsátím) a k buňkám je přidán RNA Blue; 1 ml na misku o ploše 10 cm² (průměr 3,5 cm). Buňky jsou rozvolněny pipetováním a vzorek je přenesen do centrifugační zkumavky (např 1,5 ml, Eppendorf).

1.1.3. Tkáň 50 - 100 mg tkáň je homogenizováno v 1 ml RNA Blue pomocí Polytronu nebo jiného homogenizátoru. Objem vzorku by neměl překročit 10% objemu RNA Blue.

1.2. Fázová separace

Buňky a homogenizované tkáň v RNA Blue jsou inkubovány 5 min při pokojové teplotě aby došlo ke kompletnímu rozvolnění nukleoproteinového komplexu. K 1 ml RNA Blue se přidá 0,2 ml chloroformu. Zkumavka se uzavře víčkem, silně protřepe (15 sec) a inkubuje při pokojové teplotě 5 min. Poté je vzorek centrifugován při 12 000 x g, 10 min, 4°C. Po centrifugaci je vzorek rozdělen na **horní bezbarvou vodní fázi, interfázi a modrou organickou fázi**. RNA se nachází výhradně ve vodní fázi, která představuje asi 60% objemu RNA Blue reagens použitého pro homogenizaci.

1.3. Precipitace RNA

Vodní fáze je přenesena do nové zkumavky a RNA je precipitována přidáním isopropylalkoholu (0,5 ml na 1 ml RNA Blue použitého pro homogenizaci). Vzorek je inkubován 10 min při 4°C a poté centrifugován při 12 000 x g, 10 min, 4°C. RNA se nachází na dně a po stranách zkumavky.

1.4. Promytí RNA

Po odstranění supernatantu se k sedimentu RNA přidá 1 ml 75% etanolu, důkladně se protřepe a RNA sedimentuje centrifugací 5 min při 4°C.

1.5. Rozpuštění RNA

Po odstranění supernatantu se vzorek vysuší na vzduchu 5 - 10 min. Důležité je aby nedošlo k přesušení vzorku, které by snížilo rozpustnost RNA. RNA se rozpustí v PCR Ultra H₂O. Pipetování pomocí pipetovací špičky a zahřátí na 55 - 60°C napomáhá rozpouštění RNA.

1.6. Poznámky k izolaci RNA

1.6.1. Izolace RNA z různých typů buněk

K izolaci RNA je možno použít všechny typy buněk, včetně rostlinných, bakterií a kvasinek. Pokud buňky obsahují hodně tuku, polysacharidů nebo extracelulárního materiálu, používá se dodatečný separační krok. Po homogenizaci (krok 1.1.) se vzorek stočí při 12 000 x g, 10 min, 4°C (odstranění nerozpustných materiálů) a supernatant se přenesse do další zkumavky.

1.6.2. Výtěžek RNA

Při izolaci RNA pomocí RNA Blue by měly být získány následující výtěžky z 1 mg tkáně nebo 10⁶ buněk: játra a slezina (6 - 10 mg), ledvina (3 - 4 µg), svalovina a mozek (1 - 2 µg), placenta (1 - 4 µg), epitelální buňky (8 - 15 µg), fibroblasty (5 - 7 µg).

1.6.3. Izolace poly A⁺RNA

Po precipitaci RNA isopropylalkoholem (krok 1.3.) je peleta RNA rozpuštěna v pufru pro izolaci RNA na koloně oligo-dT-celulózy a provádí se izolace běžným způsobem.

1.6.4. Použití izolované RNA pro RNA PCR

Pro minimalizaci kontaminace izolované RNA buněčnou DNA při fázové separaci je vhodné zařadit další centrifugaci po kroku 1.1. Alternativně, po přenosu vodní fáze do nové zkumavky (krok 1.3) se přidá ke vzorku 1/10 objemu isopropanolu. Po 5 min inkubaci při pokojové teplotě je vzorek centrifugován při 12 000 x g, 10 min, 4°C. Supernatant je přenesen do nové zkumavky a RNA precipitována po přidání zbývajícího množství isopropylalkoholu (podle kroku 1.3.).

1.7. Potenciální problémy při izolaci RNA

1.7.1. Nízké výtěžky

Nízký výtěžek RNA odráží nekompletní homogenizaci nebo lyzu vzorku (nedostatek RNA Blue reagens) nebo nedokonalé rozpuštění RNA pelety.

1.7.2. Nízká čistota

Poměr mezi A₂₆₀/A₂₈₀ je menší než 1,65. Vzorek byl homogenizován v menším než doporučeném objemu RNA Blue reagens. Vzorek po homogenizaci nebyl 5 min při pokojové teplotě (viz krok 1.2.). Vodní fáze byla kontaminovaná organickou (modrou) fází. Nedokonale rozpuštěná peleta RNA. Při rozpouštění nebyla použita PCR Ultra H₂O, ale voda o pH nižším než 6,0 (Wilfinger et al., BioTechniques, 22: 474-481, 1997).

1.7.3. Degradace RNAn

Tkáň byla zpracována nebo zamrazena při -70°C bezprostředně po vynětí z organismu. Vzorky použité pro izolaci byly skladovány při -20°C namísto -70°C. Buňky byly před lyzou opracovány trypsinem. Vodní roztok nebo nádobky a plastik byly kontaminované RNázami. Formaldehyd použitý pro přípravu gelu pro elektroforézu měl pH nižší než 3.

1.7.4. Kontaminující DNA

Vzorek byl homogenizován v malém objemu RNA Blue reagens. Vzorek použitý pro izolaci RNA obsahoval organická rozpouštědla (např. etanol, DMSO), silné pufrы nebo zásadité roztoky.

2. Návod na izolaci DNA

Požadovaná reagens:

- 8 mM NaOH,
- 0,1 M citronan sodný,
- absolutní etanol, 10% etanol.

2.1. Precipitace DNA

Počáteční postup je stejný jako při izolaci RNA. Po pečlivém odebrání vodní fáze, obsahující RNA, je DNA precipitována z interfáze a organické fáze (modře zabarvené) přidáním 0,3 ml 100% etanolu na 1 ml RNA Blue reagens, použitého v kroku 1.2. Vzorek je promíchán inverzí zkumavky a ponechán v klidu 2-3 min při pokojové teplotě. Precipitát je sedimentován centrifugací při 2 000 x g, 5 min, 4°C.

2.2. Promytí DNA

Supernatant obsahující proteiny je odstraněn, případně uchován při 4°C pro následnou izolaci proteinů. K DNA peletě se přidá 0,1 M citronan sodný v 10% etanolu (1 ml na 1 ml RNA Blue použitého v kroku 1.1.) a peleta se rozvolní třepáním. Po minimálně 30 min stání za občasného třepání se vzorek centrifuguje při 2 000 x g, 5 min, 4°C a peleta se promývá podruhé stejným způsobem. Po dvojím promytí je peleta DNA resuspendována v 75% etanolu (1,5 ml etanolu na 1 ml

RNA Blue použitého v kroku 1.1.) ponechána při pokojové teplotě 10 - 20 min (za občasného třepání) a centrifugována při 2000 x g, 5 min, 4°C. DNA v 75% etanolu může být skladována při 4°C po několik měsíců.

2.3. Rozpuštění DNA

Vzorek je centrifugován (2000 x g, 5 min, 4°C), peleta DNA je vysušena ve vakuu a rozpuštěna v 8 mM NaOH pomalým protahováním špičkou mikropipety. Obvykle se DNA z 50-70 mg tkáně nebo 10⁷ buněk rozpouští v 0,3 - 0,6 ml 8 mM NaOH (finální koncentrace DNA bývá 0,2 - 0,3 mg/ml. Nerozpustné materiály (zvláště při izolaci DNA z tkání) jsou odstraněny centrifugací (12 000 x g, 10 min, 4°C). Vzorky rozpuštěné v 8 mM NaOH mohou být skladované při 4°C přes noc. Pro delší skladování je nutné upravit pH na 7 - 8 přidáním níže uvedených koncentrací 0,1 M nebo 1 M HEPESu (volná kyselina) na 1 ml 8 mM NaOH:

<u>Final pH</u>	<u>HEPES μl (M)</u>	<u>Final pH</u>	<u>Hepes μl (M)</u>
8,4	66 (0,1)	7,5	180 (0,1)
8,2	90 (0,1)	7,2	30 (1)
8,0	115 (0,1)	7,0	42 (1)
7,8	135 (0,1)		

2.4. Poznámky k izolaci DNA

2.4.1. Kvantifikace izolované DNA

Koncentrace DNA je určena po odebrání části roztoku DNA v 8 mM NaOH a po naředění vodou měřením absorbance při 260 nM. $A_{260} = 1$ odpovídá koncentraci 50 mg dvouvláknové DNA/ml. Pro výpočet počtu buněk v analyzovaném vzorku lze vycházet z údajů že 10⁶ buněk v genomu člověka odpovídá 7,1 μ g DNA; u potkana je tato hodnota 6,5 μ g a u myši 5,8 μ g. Z 1 mg tkáně lze získat 2 - 4 μ g DNA (játra, ledvina), případně 2 - 3 μ g DNA (svalovina, mozek, placenta).

2.4.2. Použití izolované DNA pro PCR

Po rozpuštění pelety DNA v 8 mM NaOH se pH upraví na 8,4 přidáním 0,1 M HEPESu (volná kyselina) (viz 2.3.). Pro PCR se používá 0,1 - 1 μ g vzorku DNA.

2.4.3. Použití izolované DNA pro štěpení restrikčními enzymy

Roztok DNA v 8 mM NaOH se upraví na požadovanou hodnotu pH (viz 2.3.) nebo se DNA dialyzuje proti 1 mM EDTA. Pro restrikční štěpení lze doporučit 3 - 5 jednotek enzymu na 1 μ g DNA a štěpení provádět 3 - 24 hodin.

2.5. Potenciální problémy při izolaci DNA

2.5.1. Nízké výtěžky

Nekompletní homogenizace vzorku v kroku 1.1. nebo neúplné rozpuštění pelety v kroku 2.3.

2.5.2. Nízká čistota vzorku hodnocená poměrem A_{260}/A_{280}

Nekompletní odstranění fenolu při přípravě DNA. Nutno promýt peletu DNA navíc 0,1 M citranem sodným v 10% etanolu (viz 2.2.).

2.5.3. Degradovaná DNA

Tkáň nebyla zpracována nebo zamražena v -70°C bezprostředně po vynětí z organismu. Vzorky použité pro izolaci byly skladovány při -20°C namísto -70°C. Vzorky byly homogenizovány pomocí Polytronu nebo jiného homogenizátoru při vysokých otáčkách.

2.5.4. Kontaminující RNA

Vodní fáze nebyla kompletně odstraněna (viz 2.1.). DNA peleta nedostatečně promyta 0,1 M citranem sodným v 10% etanolu (viz 2.2.).

2.5.5. Při použití v PCR nízké výtěžky

U preparátu DNA nebylo upraveno pH (viz 2.3. a 2.4.2.).

2.5.6. Špatné štěpení restrikčními enzymy

Nutno ověřit pH vzorku a zda byl dodán dostatek restrikčního enzymu (viz 2.4.3.).

3. Návod na izolaci proteinů

Požadovaná reagens:

- Isopropylalkohol,
- 0,3 M guanidin hydrochlorid v 95% etanolu,
- 95% etanol,
- 1% SDS,
- absolutní etanol.

3.1. Precipitace proteinů

Proteiny jsou precipitovány z fenol-etanol supernatantu (viz 2.2.) přidáním 1,5 ml isopropylalkoholu na 1 ml RNA Blue reagens použitého v kroku 1.1. Vzorek je inkubován 10 min při pokojové teplotě a centrifugován při 12 000 x g, 10 min při 4°C.

3.2. Promytí proteinu

Supernatant je odstraněn a peleta je 3 x promyta 0,3 M roztokem guanidin hydrochloridu v 95% etanolu (2 ml na 1 ml RNA Blue použitého v kroku 1.1.). Při každém promývacím kroku je vzorek inkubován v promývacím roztoku 20 min při pokojové teplotě a poté centrifugován při 7 500 x g, 5 min, 4°C. Proteiny suspendované v 0,3 M guanidin hydrochloridu v 95% etanolu mohou být skladovány 1 měsíc při 4°C nebo 1 rok při - 20°C. Po třech promytích je přidán 100% etanol (2 ml) a vzorek vortexován. Vzorek je centrifugován při 7 500 x g, 5 min, 4°C.

3.3. Rozpuštění proteinu

Proteinová peleta je vysušena ve vakuu po dobu 5 - 10 min a rozpuštěna pipetováním v 1 % SDS. Kompletní rozpuštění může vyžadovat zahřátí vzorku na 50°C. Nerozpustný materiál je odstraněn centrifugací při 10 000 x g, 10 min, 4°C a supernatant přenesen do nové zkumavky. Roztok proteinu může být použit bezprostředně pro elektroforetickou separaci nebo zamražen při - 20°C.

3.4. Poznámky k izolaci proteinu

3.4.1. Koncentrace proteinu

Koncentrace proteinu může být stanovena metodou podle Bradforda po 10-ti násobném naředění při kterém dojde ke snížení koncentrace SDS na 0,1%. Proteiny mohou být stanoveny rovněž pomocí BCA protein assay reagent (Pierce) a dalšími vhodnými způsoby, které nejsou založeny na proměření A_{260} a A_{280} (stopy fenolu by mohly zvyšovat A_{260} a A_{280}).

3.4.2. Alternativní protokol izolace proteinů pomocí RNA Blue

Fenol-etanol supernatant (viz 2.2.) je dialyzován proti 0,1% SDS při 4°C. Po trojí výměně dialyzačního roztoku je vzorek centrifugován a použit pro určení koncentrace proteinů a elektroforetickou separaci.

3.5. Potenciální problémy při izolaci proteinů

3.5.1. Nízké výtěžky

Tkáně nekompletně homogenizovány v kroku 1.1. Peleta proteinů (v kroku 3.3) nekompletně rozpuštěna.

3.5.2. Degradace proteinů

Tkáň nebyla zpracována nebo zamražena při -70°C bezprostředně po vynětí z organismu. Vzorky použité pro izolaci byly skladovány při - 20°C namísto - 70°C.

3.5.3. Nerovnoměrná frakcionace proteinů při separaci v SDS PAGE

Nedostatečné promytí proteinové pelety (viz 3.2.).

Další údaje o metodice práce s RNA, DNA a proteiny lze nalézt v knize Ausubel, F.M., et al, eds. Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 3, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience, New York, 1995.