# **Izolace RNA – kyselým fenolem**

### Izolace

1. Ke 100 mg zamraženého vzorku přidat 600 µl 1x EB a dvě ocelové kuličky, důkladně zvortexovat a pak přidat 600 µl fenolu (pH 4.3) a znovu zvortexovat.
2. Nechat homogenizovat 2 min 30/s v homogenizátoru.
3. Centrifugovat vzorky 5 min při 13 000 rpm (stačí při pokojové teplotě, optimum při 4 °C).
4. Do nových 1,5ml mikrozkumavek dát 600 µl směsi fenol:chloroform:isoamylalkohol (25:24:1) pH 4.3.
5. Po centrifugaci přenést horní fázi (550 µl) do nových mikrozkumavek s připraveným fenol:chloroformem -> nepřenést s mezifází!.
6. Zvortexovat a centrifugovat 5 min při 13 000 rpm (RT).
7. Připravit nové 1,5ml mikrozkumavky s vychlazenými 550 µl chloroform:isoamylalkohol (24:1).
8. Po centrifugaci přenést horní fázi (500 µl) do nových připravených mikrozkumavek s chloroform:isoamylalkoholem.
9. Zvortexovat a centrifugovat 5 min při 13 000 rpm (RT).
10. Přenést horní fázi do nových (finálních) mikrozkumavek (400 µl) a přidat 20 µl (1/20 objemu) 3M Na-Acetátu (pH 5.2) a precipitovat nukleové kyseliny s 1 ml (2,5 objemu) vymraženého 96% EtOH. NEVORTEXOVAT!, jen několikrát opatrně převrátit mikrozkumavku.
11. Inkubovat mikrozkumavky 10 min (na ledu).
12. Centrifugovat mikrozkumavky 20 min na 14 000 rpm při 4 °C.
13. Slít obsah a promýt 1 ml vymraženého 70% EtOH -> centrifugovat 3 min při 14 000 rpm při 4 °C.
14. Zopakovat krok 13.
15. Odstranit pipetou zbylý EtOH.
16. Vysušte peletu (speedvack cca 3 min, 30 °C, V-AL) -> zkontrolovat vyschlost -> umístit mikrozkumavky na led a rozpustit peletu v 50 µl mili-Q sterilní vody.
17. Změřit koncentraci na nanodropu
18. Naředit na 1 µg/µl
19. Zkontrolujte kvalitu RNA na elektroforetickém gelu.

### ElFO

1. Umýt jarem všechny komponenty elektroforézy (misky na gel, hřeben, vanu…).
2. Připravit 1% agarózový gel rozpuštěný v TBE pufru (0,5x TBE); na 17 jamkový gel 35 ml.
3. Smíchat 4 µl barvičky FDE s 4 µl vzorku (naředěného 1:3) - nanášet 1 µg vzorku.
4. Inkubovat vzorek k nanášení 10 min při 65 °C a přemístit na led na cca 2 min
5. Nanést vzorky na gel a přidat 1 µl 1 kbp markeru, nechat rozjet jen do ⅔.

**1x Extrakční pufr (EB)**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Celkový objem [ml] | 5 | 10 | 15 |
| Mili-Q sterilní voda | 3,5 | 7,0 | 10,5 |
| 10x Extrakční pufr | 0,5 | 1,0 | 1,5 |
| 10% SDS | 1,0 | 2,0 | 3,5 |

**10x Extrakční pufr, pH 9.5:**

 1M glycin 7,5 g

 100mM EDTA 20 ml (cca 0,5M EDTA)

 1M NaCl 20 ml (cca 5M NaCl)

 Celkový objem 100 ml, chraňte před přímým světlem!, skladujte při pokojové teplotě.

**FDE (10 ml)**

 10 ml deionisovaný formamid

 200 µl 0,5M EDTA (pH 8.0)

 10 mg xylene cyanol FF

 10 mg bromphenol blue

**TBE (1l, 5x koncentrovaný)**

 54 g TRIS base

 27, 5 g kyseliny borité

 20 ml 0,5M EDTA (pH 8.0)

**Reverzní transkripce**

Všechny kroky na ledu, sterilně a rychle pokud není uvedeno jinak!

Po DNázování rozdělit na dvě části - jednu standardně (viz protokol) a druhou obdobně, ale bez přidání reverzní transkriptázy (slouží jako negativní kontrola) + v rámci šetření netřeba přidávat do kontroly ani RiboLock

**Ostranění DNA**

reakce v **10 µl** (jednotlivé složky přidávat jako premix):

1,0 µg **RNA**

0,5 µl (20 u) **RNase inhibitor (RiboLock)**

1,0 µl **DNase I pufr**

1,0 µl (1 u) **DNase I**

doplnit **sterilní vodou** do 10 µl (s DNázou nevortexovat, jen jemně promýchat)

Nechat běžet při **37 °C** po dobu **30 min**.

**Inaktivace DNázy a Denaturace**

reakce v **12,5 µl** (jednotlivé složky přidávat jako premix):

4,5 µl **RNA z předchozí reakce** (zbytky pufru nevadí)

0,5 µl 50 mM **EDTA**

1,0 µl primer (oligo dT, či specifický)

6,5 µl **sterilní voda**

Denaturace **5 min** při **65 °C**, pak rychle přenést na **led**.

**Reverzní transkripce**

reakce ve **20 µl** (jednotlivé složky přidávat jako premix, připravit dva – s a bez RT!):

0,5 µl (20 u) RNase **inhibitor** (RiboLock)

4,0 µl 5x **pufr** (RevertAid)

2,0 µl 10 mM **dNTP** (epinka s černou tečkou)

1,0 µl (200 u) **reverzní transkriptáza** RevertAid/**sterilní voda** (u negativní kontroly)

Reverzní transkripce **30 min** při **42 °C**.

Tepelná inaktivace enzymu **10 min** při **70 °C**.

Hotovou cDNA 3x zředit, tj. přidat 40 µl do cílového oběmu 60 µl.

**Kvantitativní PCR**

Materiál: cDNA + příslušné kontroly, primery pro geny zájmu a vnitřní standard(y), LightCycler® 480 Multiwell Plate 384, LightCycler 480 Sealing foil, iQ™ SYBR® Green Supermix

**Design experimentu**

• PCR reakce pro můj gen (např. GFP)

• PCR reakce pro vnitřní standard (elongační faktor EF1α)

• kontrola kontaminací – DNázovaná RNA k příslušným vzorkům (postačuje s jednou sadou primerů např. s primery pro můj gen)

• všechny reakce ve 3 technických opakováních

**Příprava reakce**

složení jedné reakce:

|  |  |
| --- | --- |
| Celkem | 10 µl |
| cDNA | 1 µl |
| iQ™ SYBR® Green Supermix | 5 µl |
| primery forward + reverse | 0,2 + 0,2 µl |
| dH2O | 3,6 µl |

1. Připravit premixy pro všechny sady primerů. Při počítaní výsledného objemu premixu brát v úvahu, že pro všechny reakce se dělají tři opakování, ke každé sadě primerů je třeba negativní kontrola a počítat s rezervou cca 3 rekce.
2. Rozpipetovat premixy do 384 jamkové destičky po 9 µl (dobře zvážit rozmístění vzorků na destičce).
3. Ke každé reakci přidat 1 µl příslušné cDNA (resp. dH2O u negativních kontrol) a překrýt destičku fólií.
4. Odnést na Viničnou 7, místnost S003.
5. Stočit 2500 RPM 2 min a vložit destičku do přístroje (LC480).
6. Otevřít program LightCycler480 > new experiment > apply template > users > „user name“ > „program name“; po zkontrolování všech nastavení program uložit a spustit

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Program | Teplota[°C] | Čas | Ramp rate[°C/s] |
| preinkubace | 94 | 3 min | 4,8 |
| amplifikace | 94 | 15 s | 4,8 |
|  | 60 | 30 s | 2,5 |
| melting | 95 | 20 s | 4,8 |
|  | 40 | 1 min | 2,5 |
|  | 58 | 1 s | 2 |
|  | 95 |  | 0,1 |
| cooling | 40 | 10 s | 2,5 |

**Vyhodnocení výsledků**

LightCycler 480 – software: pojmenování vzorků, určení Tm produktů

User name: admin; Password: LightCycler480

1. V „subset editor“ pojmenovat amplikony (to, co bylo aplifikováno stejnými primery).
2. V „sample editor“ pojmenovat vzorky (stylem „název amplikonu\_jméno vzorku“) a označit, co jsou triplikáty.
3. V „Analysis“ pomocí „Tm Calling“ určit teploty tání produktů z jednotlivých vzorků v rámci jednotlivých aplikonů (nastavit „formát“ experimentu a zaškrtnout políčko „area“). Tabulky poté vyexportovat (kliknutí pravou myší na tabulku).
4. V „Navigator“ vyexportovat celý soubor s daty jako .txt

LC480 Conversion – software: zkonvertuje data uložená v předchozím kroku, intuitivní, pro uložení dat musí běžet excel.

LinRegPCR – software: spočte účinnost PCR, Cq/Cp hodnoty a vlastní hladiny transkriptu/templátu

1. Data > Read from Excel – nastavit LightCycler 480 a oblast dat z excelu (A-AZ, 1-xy)
2. Determine baseline
3. Amplicon groups > Sample Grouping – určit, který vzorek byl amplifikován jakou sadou primerů, pokud jsou vzorky šikovně pojmenovány, zvládne vyčíst ze jména („base groups on…“) > Set W-o-L per Group
4. Manuálně zkontrolovat výsledky pro jednotlivé vzorky
5. Save to excel

Zpracovat v excelu – normalizovat výsledky pro můj gen na vnitřní standard.