

RNS izolálás és reverse transcription

RNS izolálás

Promega SV Total RNA Isolation System Promega Z3100

Megjegyzések a protokolhoz

- adherenes sejteket T25 flaskában célszerű kezelni, (2×10^6 sejt/flaska de ez A549 „méretű” sejtekre igaz)
 - kezelés után a médium eltávolítása és a sejtek mosása hideg, steril PBS-el
 - tegyük a flaskákat jégre
 - FONTOS: a lizáló puffert frissen kell készíteni, a b-merkaptó-etanolt csak annyi lízis pufferbe mérjük bele, amennyit használni fogunk. A kit leírása szerint a b-merkaptó-etanolt az összes lízis pufferbe bele kell mérni az első használatkor, de az fél óra alatt lebomlik vizes oldatban!!!
 - ha T25 flaskában vannak a sejtek, azokhoz 200-220 μ l lízis puffer kell.
 - ebben kaparjuk fel a sejteket, de mielőtt felkaparnánk, várjunk egy pár percet.
 - a felkaparás után a sejtlyázatot tegyük eppendorf csőbe, majd egy 22G-tű és egy 5 ml-fecskendő segítségével többször szuszpendáljuk.
- A továbbiakban a protokoll leírását kell követni.
- a végén 100 μ l steril vízben kell eluálni az RNS-t, de ebben a térfogatban nagyon meghígul az RNS, ezért Speed Vac-ben el kell párologtatni 50-60 μ l vizet (ez kb. 20-25 perc)

Ezután meg kell határozni a koncentrációt és meg kell nézni a tisztaságot is.

- szűkített küvettába mérjük 495 μ l deszt. vizet majd ebbe mérjük bele 5 μ l RNS mintát
- parafilmezzük le és párszor forgassuk meg a küvettát, majd mérjük le a fényelnyelést 260 és 280 nm-es hullámhosszokon.

Koncentráció = **$40 \times \text{hígítás}(100) \times A_{260} = \text{RNA } \mu\text{g/ml}$**

tisztaság ellenőrzése: $A_{260}/A_{280} = 1,8-2,1$

RNS tárolható -70°C -on, de ha egy mód van rá írjuk át cDNS-be és csak utána tároljuk -20°C -on

Random Primers:	<u><i>C1181 Promega</i></u>
Oligo(dT)	<u><i>C1101 Promega</i></u>
Set of dNTPs	<u><i>U1330 Promega</i></u>
Recombinant RNasin	<u><i>N2511 Promega</i></u>
M-MLV reverse transcriptase	<u><i>M1701 Promega</i></u>

Annealing

- 2 µg RNS
 - 1 µl Random primer
 - ...µl steril dH₂O
-

Vössz = 15 µl

- 70°C 5'
- ha lejárt az 5 perc azonnal jégre tenni, cf short

A reverz transzkripcióhoz a közeget előtte vagy közben mérjük össze. Egy közegehez való reakció: (lehet mix-et csinálni, jól felszuszpendálni, majd az RNS-hez adni)

Reverse transcription

- 5 µl M-MLV 5x Reaction buffer
 - 5 µl dNTP mix (12 µl dH₂O + 2-2-2-2 µl dNTPs (100mM))
 - 0,625 µl RNasin (25 Units)
 - 1 µl M-MLV RT (200 Units)
 - 13,375 µl steril dH₂O
-

Vössz = 25 µl

- hozzáadni az RNS-hez 37°C, 60'
- -20°C-on tároljuk