

2a) ISOLAMENTO RNA TOTALE DA CELLULE

La procedura RNeasy (Qiagen) rappresenta una tecnologia consolidata per la purificazione dell'RNA. Questa tecnologia combina le proprietà di legame selettivo di una membrana a base di silice con la velocità della tecnologia a microspin.

MATERIALE

- 1 pellet cellule numerato (**stesso numero della scorsa esercitazione**)
- Provetta con soluzione (A)
- 1 Colonnina (C)
- 2 tubi di raccolta 2 ml
- Provetta con etanolo 70% (B)
- Provetta con soluzione (W1)
- Provetta con soluzione (RPE)
- Provetta con soluzione (E)
- Provetta da 1,5 ml
- Box ghiaccio

STRUMENTAZIONE

- Microcentrifuga (Eeguire tutte le fasi della procedura a temperatura ambiente. Durante la procedura, lavorare rapidamente. Eeguire tutte le fasi di centrifugazione a 20-25°C in una microcentrifuga standard. Assicurarsi che la centrifuga non si raffreddi al di sotto dei 20°C.
- Pipette e puntali sterili (200 µl, 1000 µl)

PROCEDIMENTO

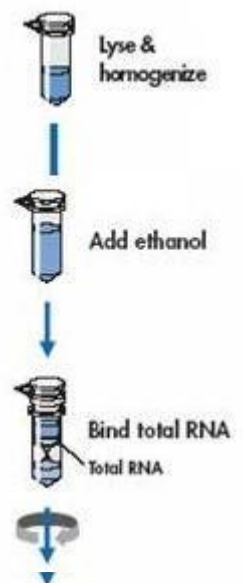
TEMPO STIMATO PER PROCESSARE UN CAMPIONE: 30'

1) **Disgregazione e omogeneizzazione del materiale di partenza** Procedura da pellet di cellule congelate: scongelare il pellet appoggiando la provetta sul ghiaccio. Aggiungere al pellet di cellule 350 µl di soluzione RLT (A). Miscelare con un vortex per 10'' ed eventualmente pipettando assicurandosi che non siano visibili grumi di cellule. Procedere allo step successivo.

2) Aggiungere 350 µl di etanolo 70% (soluzione B) al lisato omogeneizzato e mescolare bene con una pipetta.

IMPORTANTE: non centrifugare. NOTA: dopo l'aggiunta di etanolo possono essere visibili dei precipitati. Questo non influisce sulla procedura.

3) **Binding** Prelevare 700 µl di campione (compreso l'eventuale precipitato formatosi) e trasferirlo in una colonnina (C) posta in una provetta di raccolta da 2 ml. Chiudere delicatamente il tappino e centrifugare per **30 s a $\geq 16000 \times g$** . Recuperare la colonnina dalla centrifuga, eliminare l'eluato e reinserire la colonnina nella provetta di raccolta.



4) Se il volume del campione al punto 2 supera i 700 µl, prelevare il volume avanzato, trasferirlo nella stessa colonnina (C) posta nella stessa provetta di raccolta da 2 ml del punto precedente e centrifugare per **30 s a $\geq 16000 \times g$** . Scartare l'eluato. Riposizionare la colonnina (C) nella provetta di raccolta da 2 ml.

5) **Lavaggi** Aggiungere 700 µl di soluzione **W1** alla colonnina (C) facendo attenzione a non toccare il filtro con il puntale. Chiudere delicatamente il tappino e centrifugare per **30 s a $\geq 17000 \times g$** per lavare la membrana della colonna spin. Eliminare l'eluato e reinserire la colonnina (C) nella provetta di raccolta.

6) Aggiungere 500 µl di soluzione **RPE** alla colonna (C). Chiudere delicatamente il tappino e centrifugare per **30 s a $17000 \times g$** . Eliminare l'eluato e reinserire la colonnina (C) nella provetta di raccolta.

7) Aggiungere 500 µl di soluzione **RPE** alla colonna (C). Chiudere delicatamente il tappino e centrifugare per **2 minuti s a $\geq 16000 \times g$** . Eliminare l'eluato e reinserire la colonnina (C) nella provetta di raccolta.

8) Rimuovere con cautela la colonnina (C) dalla provetta di raccolta in modo facendo attenzione a non toccare l'eluato.

9) **Eliminazione contaminanti** Posizionare la colonna (C) in una nuova provetta di raccolta da 2 ml e scartare la vecchia provetta di raccolta con l'eluato. Chiudere delicatamente il coperchio e centrifugare alla massima velocità per 1 minuto.

10) **Eluizione** Posizionare la colonnina (C) in un tubino eppendorf da 1,5 ml (siglare con numero). Aggiungere 50 µl di soluzione di eluizione (E) sulla membrana della colonna spin. Chiudere delicatamente il coperchio e **incubare 5 min a RT**. Centrifugare per **1 minuto a $\geq 16000 \times g$** per eluire l'RNA. Togliere la colonnina (conservare !!) e conservare la provetta contenente l'RNA eluito.

11) **Mettere il campione immediatamente in ghiaccio e conservare per l'analisi successiva**



2b) DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE di RNA ESTRATTO MEDIANTE SPETTROFOTOMETRO

La concentrazione di RNA isolato può essere determinata misurando l'assorbanza a 260 nm (A_{260}) in uno spettrofotometro. Le letture dell'assorbanza dovrebbero essere superiori a 0,15 per garantire la significatività.

Ricorda: un'assorbanza di 1 unità a 260 nm corrisponde a circa 40 µg di RNA per ml ($A_{260}=1 \rightarrow 40 \mu\text{g/ml}$). Questa relazione è valida per le misurazioni in acqua.

Il rapporto tra le letture a 260 nm e 280 nm (A_{260}/A_{280}) fornisce una stima della purezza dell'RNA rispetto ai contaminanti che assorbono nello spettro UV, come le proteine. L'RNA puro ha un rapporto A_{260}/A_{280} pari a 1,9-2,1.

MATERIALE

- Campione di RNA estratto in precedenza
- Cuvette da 1 ml
- Tubini da 1,5 ml
- Acqua

STRUMENTAZIONE

- Spettrofotometro
- Microcentrifuga
- Pipette e puntali (20, 200, 1000 µl)

PROCEDIMENTO

TEMPO STIMATO PER PROCESSARE UN CAMPIONE: 15'

- 1) **Diluizione del campione di RNA** Inserire in un tubino da 1,5 ml 995 µl di acqua. Prelevare 5 µl del campione di RNA e inserirli nella provetta contenente l'acqua. Mescolare spipettando delicatamente e agitando la provetta con le dita. Spin 5 s. Conservare il campione diluito in ghiaccio fino al momento dell'analisi.

Conservare il restante campione di RNA per la prossima esercitazione! (CONSEGNARE ai TUTORS)

- 2) Trasferire il campione preparato al punto 1 (1ml) in una cuvette.
- 3) **Lettura** Azzerare lo spettrofotometro con due cuvettes contenenti 1 ml di acqua.
- 4) Sostituire una delle due cuvette con quella contenente il campione di RNA diluito da leggere.
- 5) Eseguire la lettura a 230 nm, 260nm e 280nm

ATTENZIONE: se i valori di lettura sono negativi è necessario procedere con un secondo round di eluizione dell'RNA!

Utilizzare 40 µL del campione ottenuto al punto 12 (precedente) e utilizzarlo al posto della soluzione di eluizione (E) per ripetere le fasi 10-11-12. A questo punto procedere con la determinazione della concentrazione dell'RNA estratto mediante spettrofotometro ripatendo dal punto 1)

- 6) Prendere nota dei valori ottenuti per calcolare la concentrazione del campione
 - Volume del campione di RNA = 50 µl (valore da modificare se sono stati eseguiti più round di eluizione)
 - Diluizione = 5 µl di RNA + 995 µl di acqua (1/200)
 - Misurazione dell'assorbanza del campione diluito in cuvette da 1ml A_{260}
 - Concentrazione del campione di RNA (x) = circa 40 µg/ml x A_{260} x fattore di diluizione
 - = 40 µg/ml x A_{260} x 200
 - =
 - Quantità totale campione di RNA (n) = concentrazione x volume campione di RNA in ml
 - = x µg/ml x 0.05 ml
 - = n (µg totali di RNA)
 - La concentrazione del campione di RNA di partenza in µg/µl è uguale ai µg totali di RNA/volume del campione di RNA (n/volume in µl)
 - Convertire la concentrazione in ng/µl per la prossima esercitazione
- 7) Calcolare la purezza del campione di RNA riportando sulla relazione il rapporto A_{260}/A_{280}