

PROTOKOL IZOLACIJE RNA

UZORCI:

- 1.
- 2.
- 3.
- 4.
- 5.
- 6.
- 7.
- 8.
- 9.
- 10.

Datum:
Br. protokola:

Izolacija RNA (postupak sa TRIzol Reagent-om ili korespondentnim reagensom – TRI reagentom)

1. Za svaki uzorak spremi PCR čistu ependorficu (1,5mL) obeleženu brojem uzorka;
2. Dodaj po 250 µL svakog uzorka po unapred određenom redosledu, koristeći zasebne nastavke sa filterom. Pri svakom postavljanju postavi barem jednu negativnu kontrolu (ultra čista voda) i pozitivnu kontrolu (suspenciju virusa koji se utvrđuje RT-PCR-om, odnosno matriks materijala za ispitivanje spajkovan ispitujućim virusom) u istoj količini;
3. U svaku ependorficu dodaj zasebnim nastavcima sa filterom po 750 µL reagensa TRIzol (TRI reagent ili slično) i dobro promešaj pažljivim pipetiranjem bez pravljenja aerosola;
4. Inkubiraj na sobnoj temperaturi 5-10 minuta;
5. Dodaj u svaku ependorficu po 200 µL hloroforma (za molekularnu biologiju) koristeći zasebne nastavke sa filterom;
6. Promešaj vortexom punom brzinom 15 sekundi i inkubiraj na sobnoj temperaturi 5 minuta;
7. Centrifugiraj na 14000 rpm (ili maksimalnom brzinom - 13200rpm) 15 minuta na 4°C.
8. Gornju vodenu fazu (koja sadrži RNA) pažljivo odpipetiraj zasebnim nastavcima sa filterom u nove prethodno obeležene ependorfice od 1,5 mL. Ostatak odbaci zajedno sa ependorficama.
9. Dodaj zasebnim nastavcima sa filterom 500 µL izopropanola (za molekularnu biologiju), inkubiraj na sobnoj temperaturi 10 minuta i centrifugiraj na 14000 rpm (ili maksimalnom brzinom) 10 minuta na 4°C.
10. Pažljivo odbaci odlivanjem supernatant u potpunosti i RNA sa dna ependorfice speri (resuspenduj) sa SOOjil 75% etanola (-20°C).
11. Promešaj vortexom punom brzinom 15 sekundi i centrifugiraj na 10000 rpm 5 minuta na 4°C.
12. Pažljivo odbaci odlivanjem supernatant u potpunosti i prosuši ependorfice okretanjem na papirnu vatu u trajanju od 15 do 30 minuta.
13. Rastopi (resuspenduj) osušenu RNA vodom (RNAza slobodnom vodom). Volumen vode prilagodi količini estrahovane RNA (najčešće sa 50 µL).
14. Resuspendovane RNA uzorke koristi odmah u RT-PCR ili čuvaj na -70°C (alternativa -20°C).

Estrakciju RNA izvršio: