

Estrazione di RNA da pellet cellulare (293 [HEK-293] ATCC® CRL-1573™)

Operazioni preliminari (eseguita dal docente RADRL)

Aggiunta di 0,5 mL di reagente TRIzol (Life Technologies) al pellet cellulare. L'aggiunta del reagente è eseguita in cappa chimica aspirante e con l'utilizzo dei guanti e del camice di laboratorio. Il pellet viene risospeso pipettando più volte, dopodiché viene incubato per 5 minuti a temperatura ambiente per consentire la completa dissociazione del complesso nucleoproteico.

TRIzol: è una soluzione chimica utilizzata nell'estrazione di DNA, RNA e proteine dalle cellule. CAS 108-95-2; 593-84-0; 1762-95-4. Prestare attenzione durante l'uso di TRIzol (a causa del fenolo e del cloroformio). L'esposizione può provocare ustioni ed irritazioni. Si raccomandano l'utilizzo di una cappa chimica aspirante, di un camice da laboratorio e guanti.

Aggiunta di 0,1 mL di cloroformio ed incubare per 3 minuti a temperatura ambiente.

Centrifugare il campione per 15 minuti a $12.000 \times g$ a $4^\circ C$. La miscela si separa in una fase fenolo-cloroformio rossa inferiore, un'interfase bianca e una fase acquosa superiore incolore.

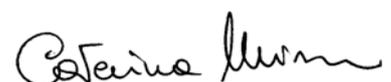
Cloroformio: è un alogenuro alchilico utilizzato per eliminare i residui di fenolo. CAS 67-66-3.

L'esposizione può provocare irritazione può essere tossico se inalato. Si raccomandano l'utilizzo di una cappa chimica aspirante, di un camice da laboratorio e guanti.

Si trasferisce la fase acquosa superiore contenente l'RNA in una nuova provetta inclinando il tubo a $45^\circ C$. È importante evitare il trasferimento di qualsiasi interfase quando si preleva la fase acquosa. Aggiunta di 0,25 ml di alcol isopropilico alla fase acquosa. Si lascia incubare per 10 minuti a temperatura ambiente. Centrifugare per 10 minuti a $12.000 \times g$ a $4^\circ C$. Il precipitato totale di RNA è visibile come un pellet bianco opaco sul fondo della provetta.

Alcol isopropilico: è un alcool incolore e moderatamente volatile, utilizzato come detergente o se in soluzione acquosa, per permettere la precipitazione del DNA e del RNA. CAS 67-63-0. È infiammabile, quindi va conservato e maneggiato lontano da scintille, fiamme o fonti di calore.

Si rimuove e si scarta il surnatante con una micropipetta. Si risospende il pellet del RNA in 0,5 ml di alcool etilico al 75% e si centrifuga per 5 minuti a $7500 \times g$ a $4^\circ C$.



Si rimuove e si scarta il surnatante con una micropipetta e si lascia asciugare il pellet di RNA per 5 minuti a temperatura ambiente.

Risospendere il pellet in 20-30 μ l di acqua ed incubare a 55 ° C per 10 minuti.

Alcol etilico: è un alcol incolore e tendenzialmente, utilizzato come detergente o se in soluzione acquosa, per permettere la precipitazione del DNA e del RNA. CAS 64-17-5. E' infiammabile, quindi va conservato e maneggiato lontano da scintille, fiamme o fonti di calore.

Caterina Mura

Quantificazione del RNA mediante spettrofotometro/nanoDrop e retrotrascrizione del RNA

Fasi operative dell'esercitazione (eseguite dagli studenti sotto la supervisione del docente RADRL)

Note importanti: I dispositivi di protezione individuale (DPI) da utilizzare nelle fasi sperimentali sono di seguito riportati: camice (protezione del corpo) e guanti (protezione delle mani).

Le norme generali di comportamento nei laboratori didattici prevedono inoltre:

- **indossare scarpe chiuse**
- **raccogliere, ove richiesto, i capelli dietro la nuca**
- **attenersi al corretto smaltimento di qualsiasi tipo di rifiuto**

La quantificazione del RNA avverrà mediante lo spettrofotometro Nanodrop.

Successivamente alla quantizzazione, 500ng di RNA verranno retrotrascritti in cDNA mediante l'utilizzo del kit "High Capacity cDNA RT" (Applied Biosystems) utilizzando le seguenti quantità per un volume di reazione finale di 10ul

10X RT Buffer 2.0 µL

25X dNTP Mix (100 mM) 0.8 µL

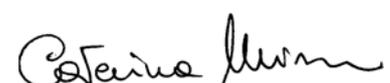
10X RT Random Primers 2.0 µL

MultiScribe™ Reverse Transcriptase 1.0 µL

RNase Inhibitor 1.0 µL

Acqua MilliQ 3.2 µL

I prodotti non contengono sostanze che possono essere considerate pericolose o nocive per la salute. La MultiScribe™ Reverse Transcriptase contiene glicerina, un composto organico liquido ed incolore non pericoloso. CAS 56-81-5



Una volta allestita la reazione, inserire la provetta in un termociclatore ed impostare l'apparecchio con i seguenti settaggi:

25°C per 10 minuti

37°C per 120 minuti

85°C per 5 minuti

4°C ∞

Caterina Mura

Misurazione dell'espressione genica del cDNA ed allestimento della reazione di real time RT-PCR

L'allestimento della reazione di real time RT-PCR verrà eseguita mediante l'utilizzo della SYBR® Select Master Mix (Applied Biosystems) utilizzando le seguenti quantità per un volume di reazione finale di 20ul

SYBR® Select Master Mix (2X) 10 µL

Oligonucleotidi sintetici 400nM

cDNA template 500ng

Acqua MilliQ una quantità sufficiente per arrivare ad un volume finale di 20 µL

I prodotti non contengono sostanze che possono essere considerate pericolose o nocive per la salute. La SYBR® Select Master Mix contiene glicerina, un composto organico liquido ed incolore non pericoloso che preserva la stabilità dei reagenti, ed azoturo di sodio, che alle concentrazioni di utilizzo non risulta pericoloso per la salute. CAS 56-81-5 e 26628-22-8.

Programmare le condizioni del termociclatore Applied Biosystem 7500

50°C per 2 minuti

95°C per 2 minuti

Successivamente, 40 cicli di:

95°C per 15 secondi

60°C per un 1 minuto

