



University of Isfahan
Biological Science and Technology
Department of Cell and Molecular Biology
Cellular and Molecular Laboratory
Farzaneh Forouharfar

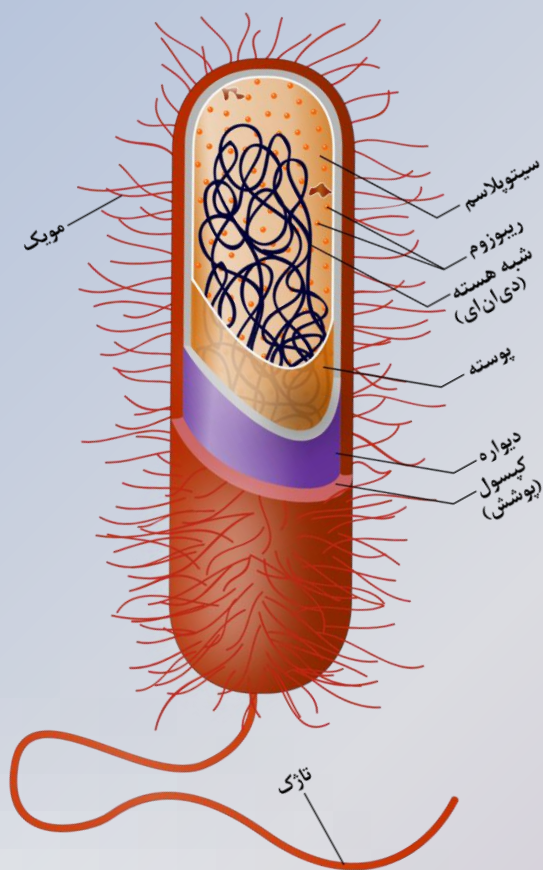
عنوان استخراج RNA از سلول های پروکاریوتی

اهداف

۱. آشنایی با روش‌های استخراج RNA از سلول‌های پروکاریوتی
۲. بررسی مراحل لیز سلولی و خالص‌سازی RNA
۳. آشنایی با روش Trizol برای استخراج RNA
۴. یادگیری نحوه ارزیابی کیفیت و غلظت RNA استخراج شده

مقدمه

استخراج RNA از سلول‌های پروکاریوتی، مانند باکتری‌ها، یکی از مراحل اساسی در مطالعات بیولوژی مولکولی و تحقیقات ژنتیکی است. RNA نقش کلیدی در فرایندهای سلولی، از جمله تنظیم بیان ژن و سنتز پروتئین، دارد. بنابراین، خالص‌سازی RNA با کیفیت بالا برای تکنیک‌هایی مانند RT-PCR و توانایی RNA ضروری است. روش تریزول یکی از روش‌های رایج برای استخراج RNA است که ترکیبی از فنول و گوانیدین ایزوتیوسیانات را برای لیز سلولی و جداسازی RNA به کار می‌گیرد. در این فرایند، جداسازی دقیق RNA از DNA و پروتئین‌ها و حفظ کیفیت آن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در این تکنیک آموزشی، استخراج RNA از پروکاریوت‌ها با استفاده از روش تریزول (Trizol) به‌طور کامل شرح داده شده است.



وسائل مواد و تجهیزات مورد نیاز



مواد شیمیایی

۱. محلول Trizol (حاوی فنول و گوانیدین ایزوتیوسیانات)
۲. ایزوپروپانول (برای رسوبدهی RNA)
۳. اتانول ۷۵٪ (برای شستشوی RNA)
۴. آب دیونیزه (DEPC-treated water) (برای حل کردن RNA)
۵. کلروفرم (برای جداسازی فازهای آلی و آبی)
۶. محیط کشت مایع (مانند LB broth) (برای رشد باکتری‌ها)

وسایل آزمایشگاهی

۱. لوله‌های میکروسانتریفیوژ (۱,۵ یا ۲ میلی‌لیتری)
۲. پیپت و نوک پیپت RNase-free
۳. میکروپیپت (برای اندازه‌گیری دقیق حجم‌ها)
۴. ویورتکس (برای مخلوط کردن نمونه‌ها)
۵. حمام یخ (برای حفظ پایداری RNA در برخی مراحل)
۶. میکروسانتریفیوژ (با توانایی چرخش در ۱۲,۰۰۰ تا ۱۴,۰۰۰ rpm)

تجهیزات حفاظتی و ایمنی

۱. دستکش یک بار مصرف (برای جلوگیری از آلودگی RNA)
۲. عینک ایمنی (برای محافظت در برابر مواد شیمیایی)
۳. روپوش آزمایشگاهی (برای حفظ ایمنی شخصی)

تجهیزات ارزیابی RNA

۱. نانودراپ یا اسپکتروفوتومتر (برای اندازه گیری غلظت و خلوص RNA)
۲. دستگاه الکتروفورز ژل آگارز (برای بررسی کیفیت RNA)

این تجهیزات و مواد برای استخراج موفقیت آمیز RNA از سلول های پروکاریوتی ضروری هستند و رعایت اصول ایمنی و استریل بودن محیط کار از اهمیت بالایی برخوردار است.

روش کار



جمع‌آوری نمونه پروکاریوتی (باکتری‌ها)

۱. انتخاب سویه مناسب: برای استخراج RNA از پروکاریوت‌ها، ابتدا باید سویه مناسب باکتری را انتخاب کنید. معمولاً از باکتری‌های کشت شده در محیط‌های مایع استفاده می‌شود. سویه‌هایی مانند *E. coli* به‌طور رایج برای آزمایش‌های بیولوژی مولکولی استفاده می‌شوند.
 ۲. کشت باکتری‌ها: باکتری‌ها باید در محیط کشت مایع (مانند LB یا محیط اختصاصی دیگر) کشت داده شوند. بسته به نوع باکتری، ممکن است نیاز به شرایط ویژه‌ای مانند دما یا pH خاص برای رشد مناسب داشته باشید.
 ۳. جمع‌آوری سلول‌ها: باکتری‌ها باید در فاز لگاریتمی رشد (log phase) جمع‌آوری شوند، چراکه در این فاز، تولید RNA به اوج خود می‌رسد.
- پس از کشت باکتری‌ها، آن‌ها باید از محیط کشت با سانتریفیوژ جدا شوند. معمولاً ۱,۵ تا ۲ میلی‌لیتر از محلول کشت را برای استخراج RNA در نظر می‌گیرند.
- سانتریفیوژ با سرعت ۶۰۰۰ تا ۸۰۰۰ rpm برای ۵ تا ۱۰ دقیقه انجام می‌شود تا سلول‌ها در ته لوله جمع شوند.

آماده‌سازی مواد و تجهیزات

۱. محلول تریزو (Tri reagent) : این محلول حاوی فنول، گوانیدین ایزوتیوسیانات و کلروفرم است. برای جلوگیری از تخریب RNA، باید از محلول تریزول تازه استفاده کرد.

۲. آب دیونیزه (DEPC-treated water): برای حل کردن RNA پس از استخراج.

۳. آسیاب و تجهیزات: از یک سانتریفیوژ، پیت‌های استریل، لوله‌های سانتریفیوژ و مواد شیمیایی در دسترس استفاده می‌شود.

۴. مواد شیمیایی ایمنی: شال دستکش، عینک ایمنی و روپوش آزمایشگاهی برای جلوگیری از تماس با مواد شیمیایی خطرناک.



استخراج RNA از باکتری ها (روش مرحله به مرحله)

۱. لیز کردن سلول ها:

رزولوشن سلولی: پس از جمع آوری سلول ها، باکتری ها باید در محلول تریزول به خوبی هم زده شوند تا لیز شوند و RNA آزاد گردد.

پاسخ به آنزیم ها: اگر RNA از باکتری هایی که دارای آنزیم های RNase هستند (مثل باکتری های گرم مثبت) استخراج می شود، ممکن است نیاز به استفاده از مواد خاص برای غیرفعال کردن RNase باشد.

در این مرحله از RNase-free conditions باید استفاده شود تا RNA به طور کامل از آنزیم های RNase محافظت شود.

دما: لیز کردن سلول ها باید در دمای اتاق و به مدت 5 تا 10 دقیقه انجام شود.

۲. ترکیب با محلول Trizol:

مخلوط کردن: پس از لیز شدن سلول ها، حجم معین از محلول تریزول (معمولاً 1 میلی لیتر به ازای هر 100 میلی گرم سلول) به نمونه اضافه می شود.

همزدن نمونه: نمونه باید به خوبی هم زده شود تا تمام اجزای سلولی از هم جدا شوند و RNA از دیگر اجزای سلولی آزاد شود. همزدن به مدت 5 دقیقه در دمای اتاق صورت می گیرد.

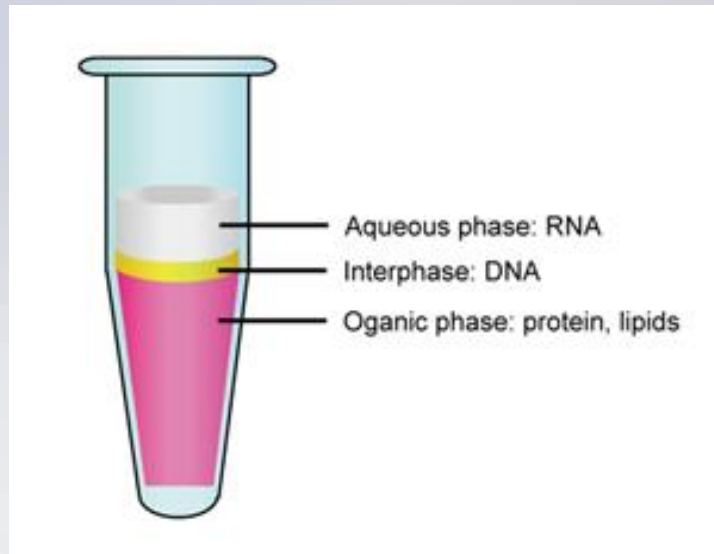
۳. سانتریفیوژ و جداسازی فازها:
سانتریفیوژ اولیه: نمونه باید به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شود
تا نمونه به سه فاز مختلف تقسیم شود:

- فاز آبی (فاز RNA): RNA در این فاز قرار دارد.

- فاز آلی (پروتئین‌ها): این فاز شامل پروتئین‌ها و چربی‌ها می‌باشد.

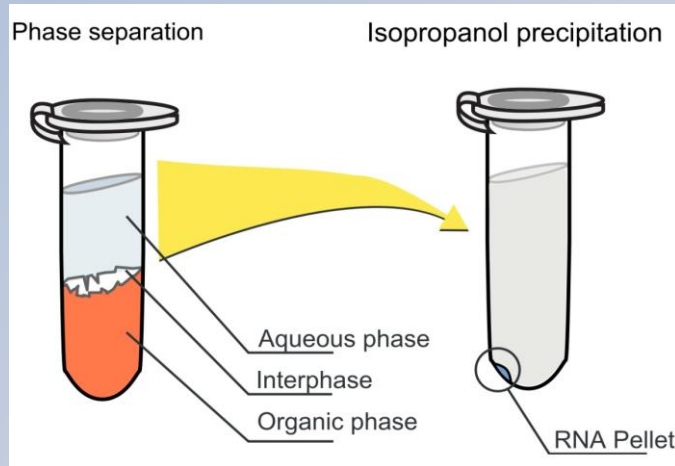
- پلیسه (رسوب DNA): DNA در این فاز قرار دارد.

جدا کردن فاز آبی: فاز آبی (که حاوی RNA است) باید به‌دقت از فاز آلی و پلیسه جدا شود و در لوله جدید منتقل گردد.



۴. رسوب RNA:

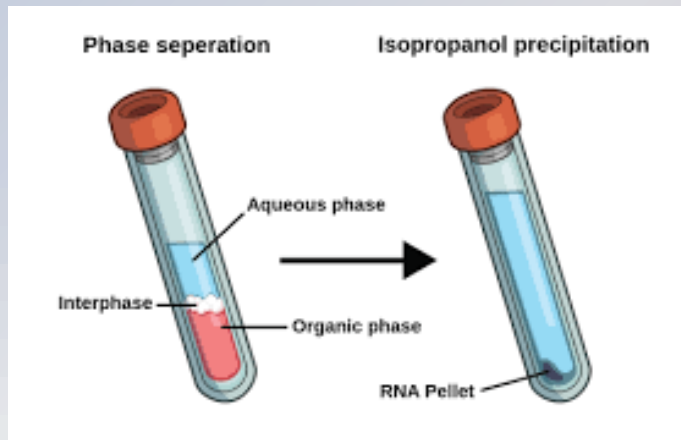
افزودن ایزوپروپانول: به فاز آبی، ایزوپروپانول به حجم معادل ۰.۵ برابر حجم فاز آبی اضافه می‌شود. مخلوط کردن و نگهداری: نمونه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای -۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود تا RNA رسوب کند.



۵. سانتریفیوژ و جمع‌آوری RNA:

سانتریفیوژ: پس از ۱۰ دقیقه، نمونه باید به مدت ۱۰ دقیقه در سرعت ۱۲,۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شود تا RNA رسوب کند.

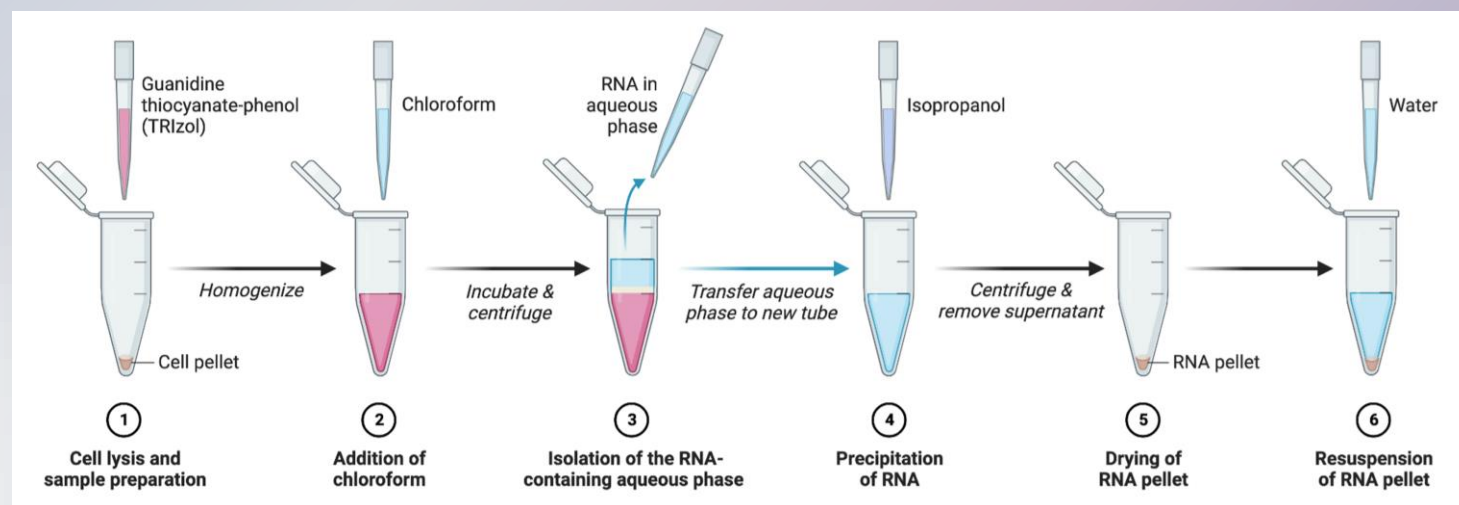
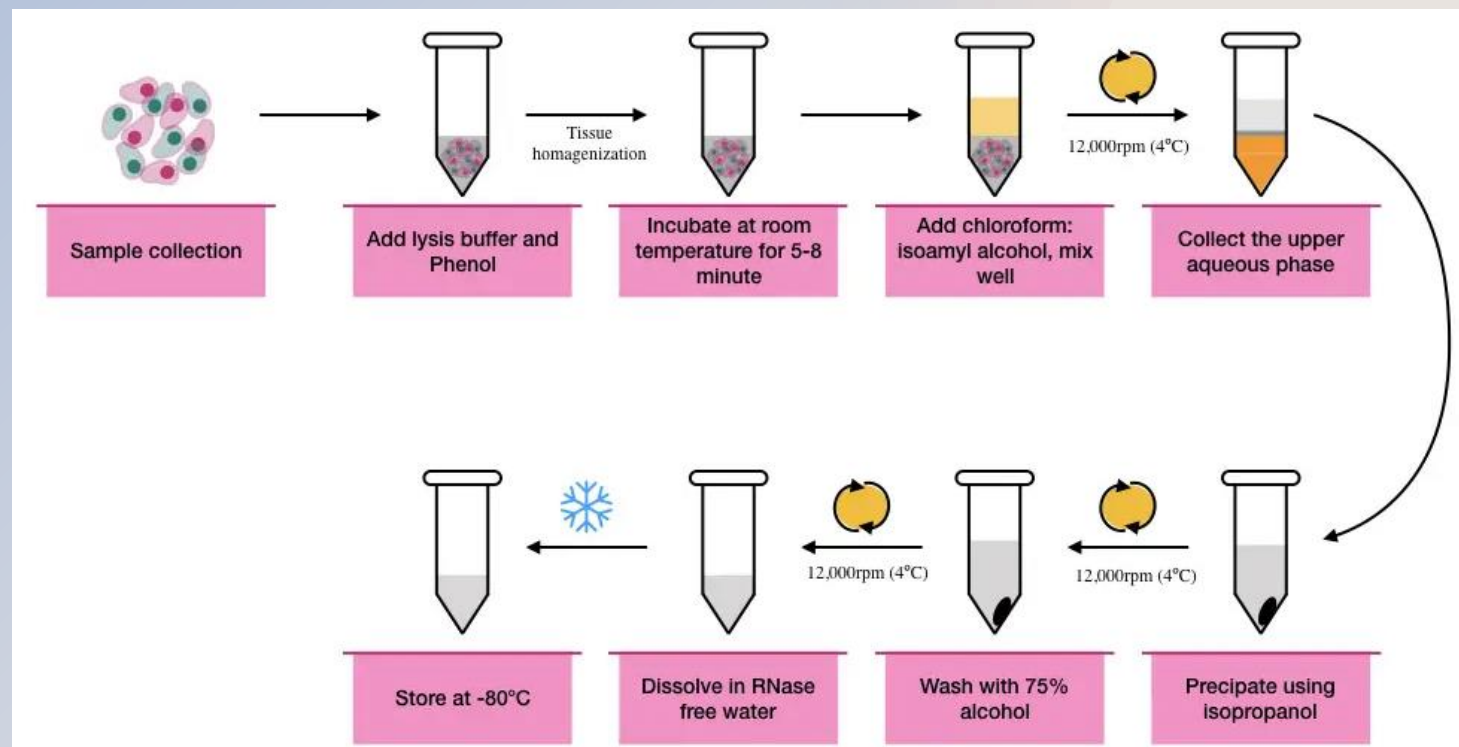
جمع‌آوری RNA: RNA رسوب‌شده در ته لوله باید با دقت جدا شود. این رسوب حاوی RNA است که باید در مراحل بعدی حل شود.



۶. شستشوی RNA :
شستشو با اتانول ۷۵٪ : RNA رسوب شده باید با اتانول ۷۵٪ شسته شود تا هرگونه آلودگی از بین برود.
سانتریفیوژ مجدد: نمونه باید دوباره به مدت ۵ دقیقه در ۷,۵۰۰ rpm سانتریفیوژ شود.

۷. خشک کردن RNA :
پس از شستشو با اتانول، RNA باید به طور کامل در دمای اتاق خشک شود. خشک کردن RNA برای جلوگیری از آلودگی و حفظ کیفیت آن ضروری است. باید توجه داشت که از خشک شدن بیش از حد RNA اجتناب شود، زیرا در این صورت ممکن است حل کردن آن در بافر یا آب دیونیزه مشکل شود.

۸. حل کردن RNA :
RNA رسوب شده باید در بافر آب دیونیزه شده با DEPC یا آب دیونیزه حل شود. این مرحله باید با دقت انجام گیرد و RNA باید به طور کامل در مایع حل شود. همچنین، RNA باید در دمای منفی ۸۰ درجه سانتیگراد نگهداری شود تا از تخریب آن جلوگیری گردد.

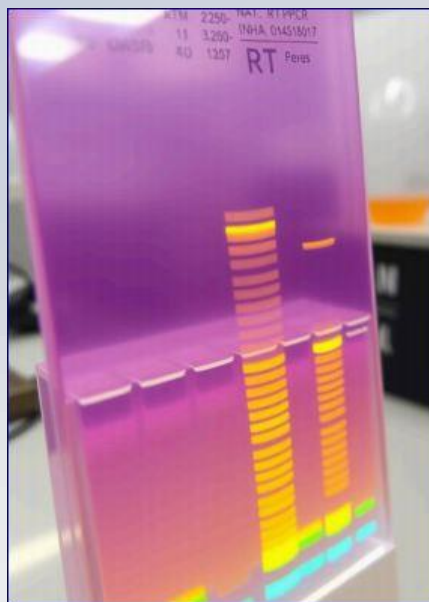
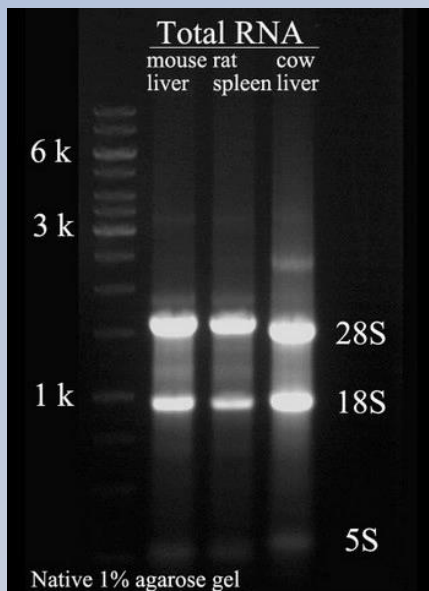


اندازه‌گیری غلظت و کیفیت RNA

اندازه‌گیری غلظت RNA : برای اندازه‌گیری غلظت RNA استخراج‌شده، از دستگاه نانودراپ یا اسپکتروفوتومتر استفاده می‌شود. این دستگاه‌ها به شما کمک می‌کنند تا میزان جذب نور در طول موج ۲۶۰ نانومتر را اندازه‌گیری کرده و غلظت RNA را محاسبه کنید.

تحلیل کیفیت RNA : نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر:
RNA خالص باید نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر بین ۱,۸ و ۲,۰ داشته باشد. این نسبت نشان‌دهنده کیفیت بالای RNA است.

الکتروفورز RNA : برای بررسی کیفیت RNA، از تکنیک الکتروفورز ژل آگارز استفاده می‌شود. باندهای واضح و بدون شکستگی نشان‌دهنده RNA با کیفیت بالا هستند.



نکات مهم و احتیاط‌ها

محیط استریل: برای جلوگیری از آلودگی RNA به آنزیم‌های RNase، تمامی مراحل باید در محیط استریل و با استفاده از تجهیزات استریل انجام شود.

کار در دمای پایین: تمامی مراحل آسیاب کردن و مخلوط کردن باید در دمای پایین انجام شود تا از تخریب RNA جلوگیری شود.

احتیاط در استفاده از مواد شیمیایی: از مواد شیمیایی سمی مانند فنول و کلروفرم باید با دقت استفاده شود و از تجهیزات ایمنی مانند دستکش و عینک استفاده کنید. با استفاده از این روش می‌توانید RNA با کیفیت بالا از پروکاریوت‌ها استخراج کنید. RNA استخراج‌شده از باکتری‌ها می‌تواند در آزمایش‌هایی مانند RT-PCR، تعیین بیان ژن‌ها و توالی‌یابی RNA مورد استفاده قرار گیرد.