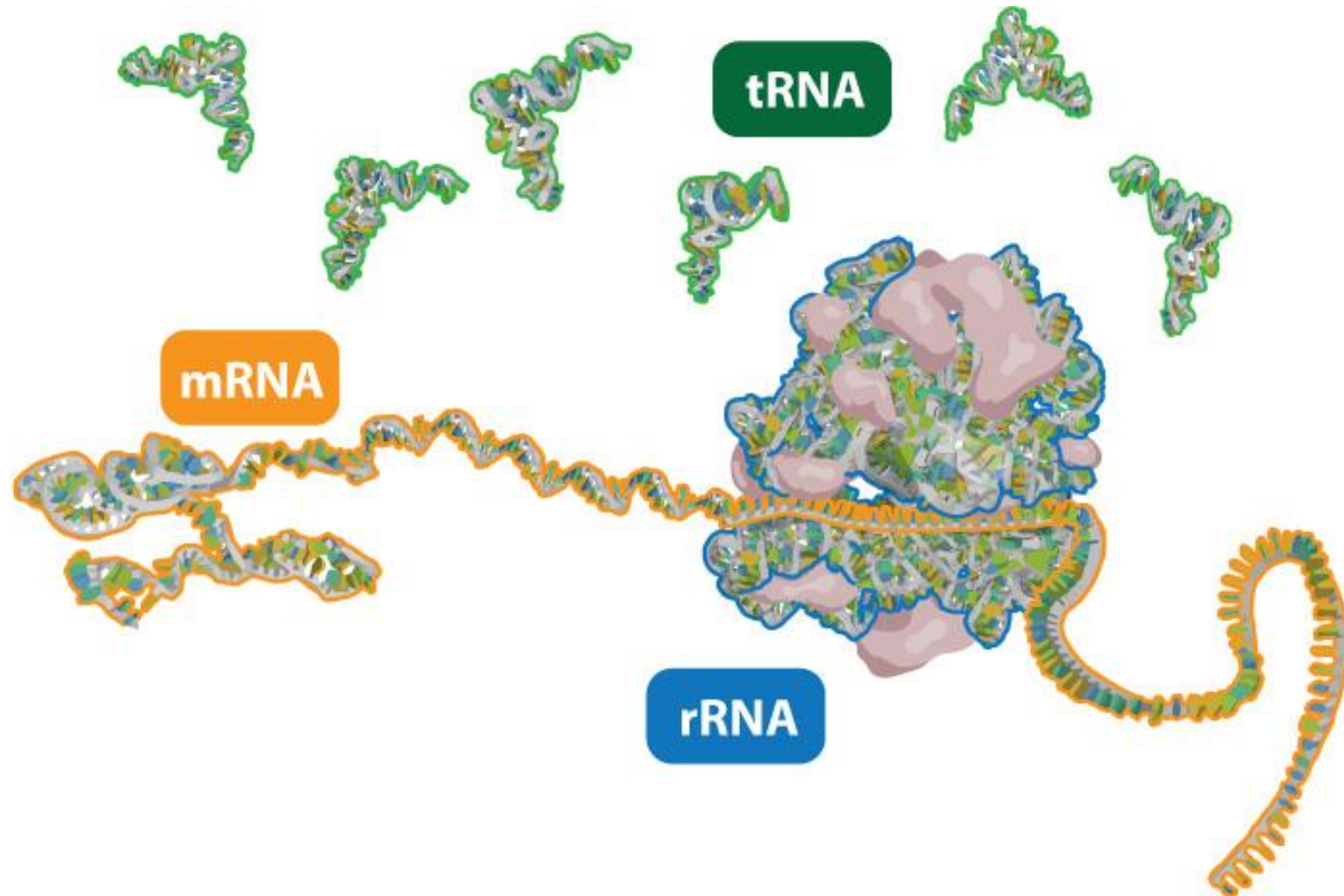


RNA izolasyonu

RNA molekülü

- Yaşayan tüm canlılarda ve virüslerde bulunan polimerik yapıdaki nükleik asittir.
- Tek zincirli yapıda bulunur. İçerisinde Adenin, Guanin, Urasil ve sitozin bazları olup, şeker molekülü olarak da Riboz pentozu taşımaktadır.
- DNA molekülünden farklı olarak;
 - Daha kısıdırlar. DNA molekülünden üretilirler.
 - Nükleozom yapısı olmadan farklı katlanma tipleri gösterirler.
 - mRNA, tRNA, rRNA, miRNA, siRNA, LongRNA, LincRNA, siRNA gibi farklı fonksiyonlara sahip RNA molekülleri bulunur.
 - Ribozomlar hem prokaryot hem de ökaryotlarda iki altbirimden oluşur. Bu altbirimler santrifüjleme sırasında hangi hızda sedimente oldukları ile ilişkili olarak adlandırılır (adlarındaki S, Svedberg birimine karşılık gelir). Tabloda parantez içindeki rakamlar, altbirimde bulunan rRNA moleküllerine aittir.

RNA molekülü



- %80-85 rRNA (28S, 18S, 5S ökaryot)

- %1-5 mRNA

- %10-15 tRNA

RNA İzolasyonu

- Moleküler Biyoloji çalışmalarının en kritik aşamalarından biri RNA izolasyonudur.
- **RNA izolasyonu çok zordur.** DNA kadar kararlı bir molekül değildir.
- Çünkü, Ribonükleazlar (Rnaz =RNase) çok stabildir.
- İzolasyon sırasında RNA'ların parçalanması çok sık karşılaşılan bir durumdur.
- Çünkü, RNA stabil olmayan bir moleküldür. Kolay yıkılır.

RNA İzolasyonu Temel Basamaklar

- Hücre çeperinin ve membranının parçalanması (LİZİS)
- Hücre lizatının santrifüjlenmesi ile RNA'nın diğer makromoleküllerden ayrılması
- RNA izolasyonunda hücre tipi ve RNA'nın ne amaçla kullanılacağı ÇOK önemli !

RNA izolasyon Prensipleri 1

- Bir çok RNA izolasyon protokolünde çok güçlü protein denatüranı ve ayrıca RNazların güçlü bir inhibitörü olan **Guanidyum içeren Lizis solüsyonları** kullanılır.
- İzolasyon sırasında kullanılacak olan materyaller çok dikkatli bir şekilde hazırlanmalıdır.
 - Kullanılacak tüpler ve pipetler otoklavlanmalı.
 - Kullanılacak tüm solüsyonlar Rnase free (Rnaz'sız su) distile su ile hazırlanmalıdır.
 - Bu amaçla Rnase free su **Dietilpropiyonat (DEPC)** ile hazırlanmalıdır.
 - DEPC Rnazları irreversibl (Geri Dönüşümsüz) olarak denatüre eder.
 - **Not:** Tris DEPC'yi inaktif eder. Bu yüzden Tris içeren çözeltiler DEPC ile hazırlanmamalıdır.

RNA izolasyon Prensipleri 2

- RNA molekülü genomik DNA'dan asidik solüsyonlar kullanılarak ayrılır.
- **RNAse her yerde vardır. Özellikle ellerimizde bulunur. Bu nedenle RNA izolasyonu yapılırken mutlaka eldiven kullanmalıyız.**
- Ayrıca kullanılan solüsyonlar oldukça toksik maddelerdir.
- RNA izolasyonu kesinlikle soğuk ortamda (Buz içerisinde) yapılmalıdır. **İzolasyon sırasında tüpler 30 saniye kadar kısa bir süre dışarıda kalsa RNA'lar degrade olur.**
- İzole edilen RNA'lar -80 derecede saklanır.

RNA İzolasyonu Metotları

1. Guanidine Tiyosiyanat Methodu
2. Proteinaz K Methodu
3. Sezyum Klorid Gradient Pürifikasyonu
4. Trizol ile RNA izolasyonu methodu (Birleştirilmiş Metot)

1. Guanidine Tiyosiyanat Methodu

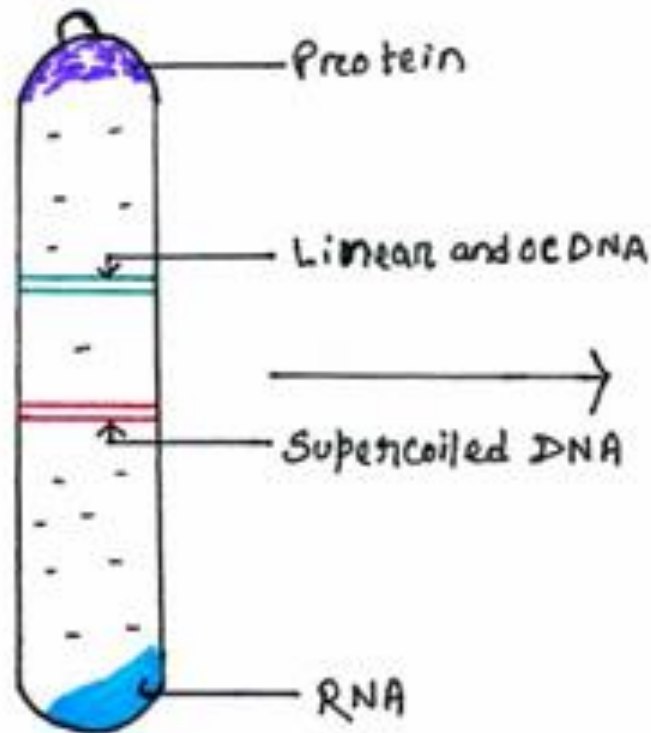
- Hücreler Guanidin tiyosiyanat ve 2-merkaptoetanol içeren buffer içerisinde lizis edilir.
- Süpernatant **CsCl**(Sezyum Klorür) Üzerine eklenir ve santrifüj edilir.
- Oluşan RNA pelleti buffer içerisinde çözülür.
- RNA'yı presipite etmek için Etanol eklenir.

2. Proteinaz K Methodu

- Hipotonik bir solüsyon ile yapılan lizis hücreleri parçalar ve nükleusu serbest bırakır.
- Santrifüj sonucu Sitoplazmik RNA süpernatantta kalır.
- Proteinaz K ile inkübasyon sonrasında fenol/kloroform ile ekstraksiyon yapılır.
- Santrifüj sonrasında RNA sıvı fazda kalır.
- **Bu metottaki Asidik Fenol RNA'yı sıvı fazda bırakır. Bu asidik fenol DNA'yı kolay nötralize olan fosfat grupları varlığından dolayı fenol fazda tutar.**
- Etanol eklenerek RNA presipite edilir.

3. Sezyum Klorid Gradienti ile Pürifikasyon

- RNA DNA'dan daha yoğundur. Bu nedenle CsCl solüsyonunda dibe çöker.
- Bu metod ultrasantrifüj de gerçekleştirilir.



Ultrasantrifüj sonrasında protein, lipid ve polisakkaritler en yukarıda, DNA ortada kalırken, RNA dibe çöker.

4. Trizol ile Total RNA İzolasyonu

Yönteminin Prensipleri 1

- En iyi ve etkili Manual RNA izolasyon tekniğidir.
- Ticari kit kullanımına göre daha fazla miktarda RNA izole edilir. Fakat kite göre izole edilen RNA'nın saflık miktarı daha düşük olabilir.
- **Trizol:** Guanidinium thiocyanate – phenol – chloroform.
- +4 derecede saklanır ve vücuda teması halinde yanma ve tahriş söz konusudur. İçerisinde fenol bulunduğu için kesinlikle solunmamalıdır.

Trizol ile Total RNA İzolasyonu Yönteminin Prensipleri 2



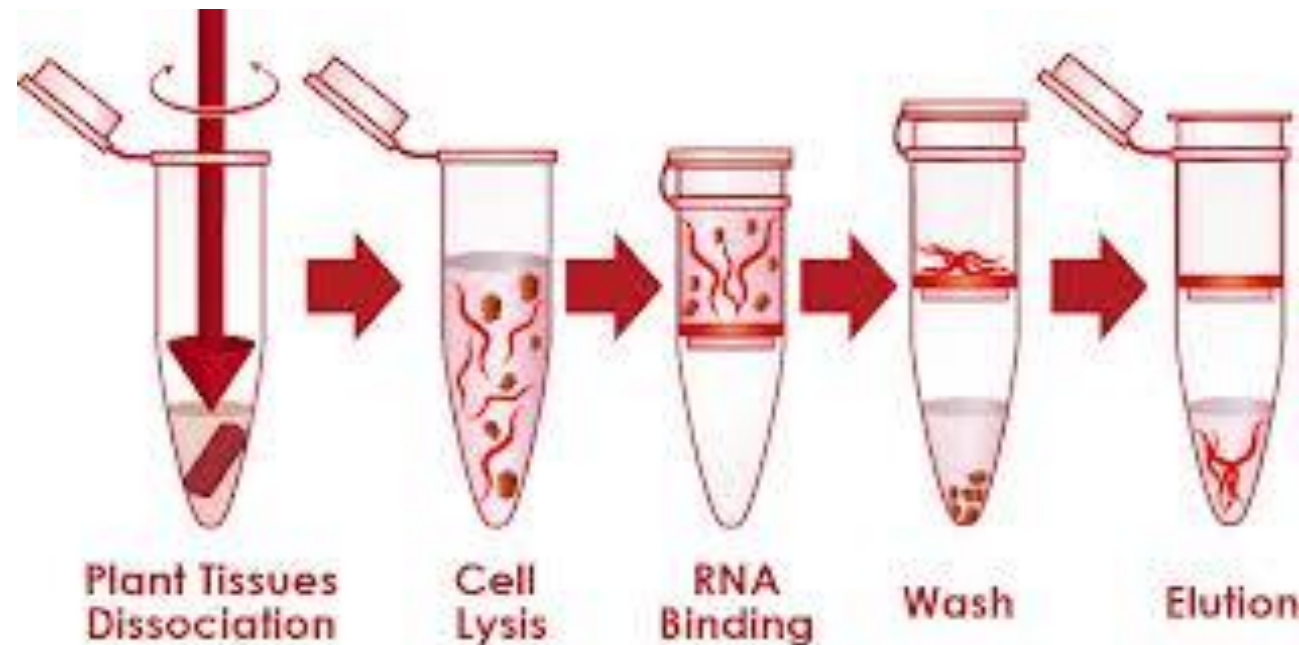
Trizol ile Total RNA İzolasyonu

Yönteminin Prensipleri 3

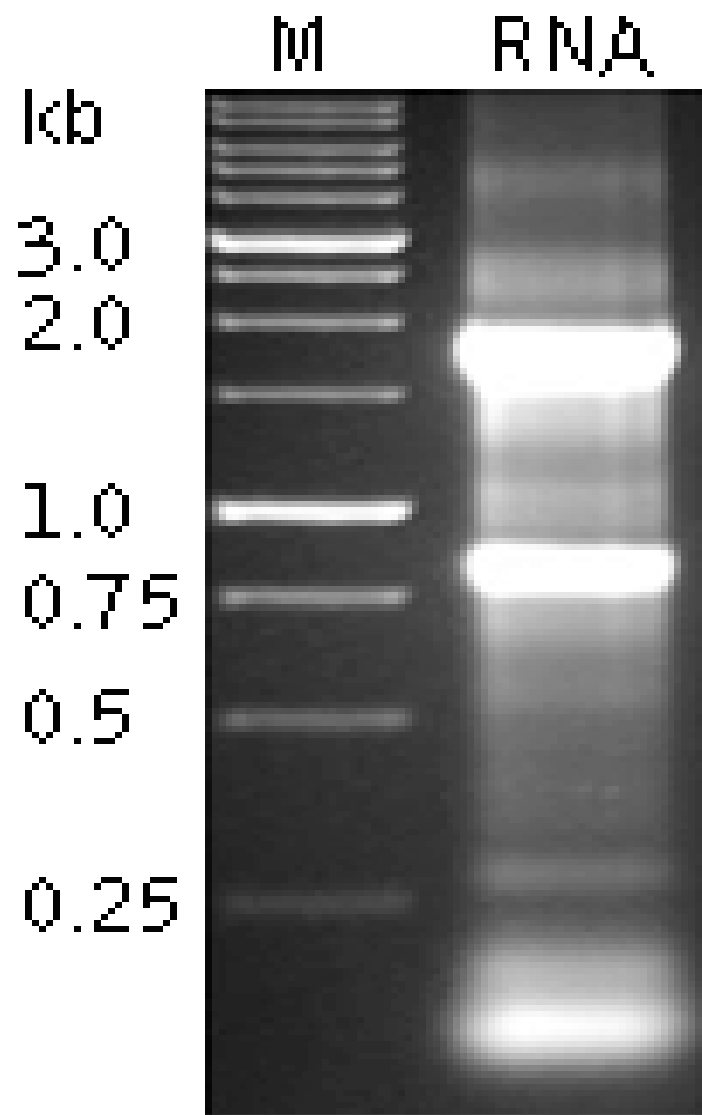
- Trizol ile izole edilmiş olan RNA Northern Blotting, RT-PCR, Dot Blot assay ve RNase Protection Analysis çalışmalarında kullanılabilir.
- Trizol ile izole edilen RNA Northern blot ve immunoprecipitasyon çalışmaları için kullanılacak ise **akrilamid jeller** kullanılarak elektroforez yürütülmesi yapılır.

Ticari Kitlerdeki RNA izolasyonu Mantığı

- RNA izolasyonu da tıpkı DNA izolasyonunda size anlatılan mantık ile presipite edilir.
- Hücreler lizis edilir. Hücre lizati kolon içeren tüplere alınır. Kolonlar RNA'yı kendine bağlarken, diğer molekülleri bağlamaz.
- Son olarak kolona bağlanan RNA kolondan ayrılarak presipite edilir.



RNA Kalite Kontrolü 1

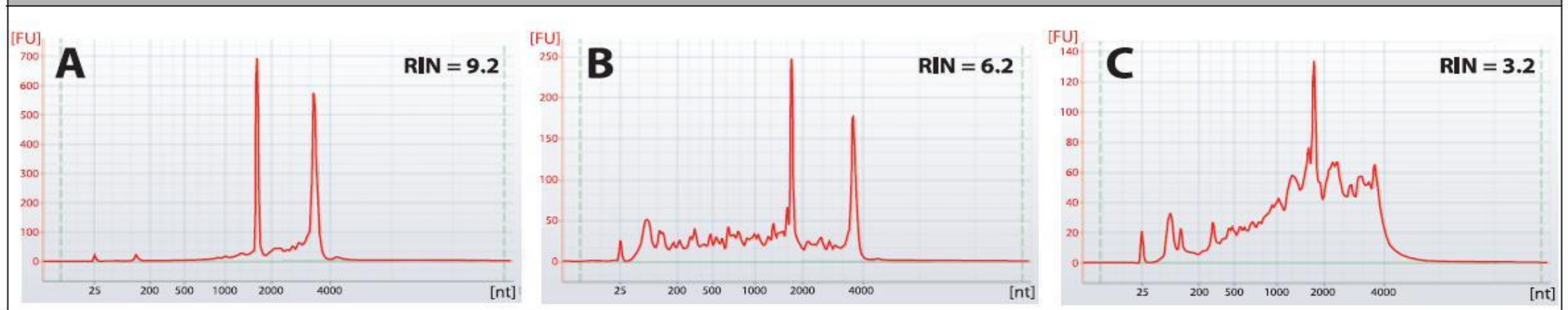


- RNA Kalite kontrolü birkaç farklı şekilde yapılabilir.
- Bunlardan biri; RNA'nın agaroz jelde yürütülmesidir.
- Agaroz jelde 28 S ve 18 S RNA yoğun bir şekilde görülüyorsa total RNA izolasyonu başarılı olmuştur(ökaryotik organizma).
- Fakat bu bantların dışında smear görüntüsü varsa parçalanma gerçekleşmiştir.
- Yeniden izolasyon yapmak gerekir.

RNA Kalite Kontrolü 2

➤ İzole edilen RNA molekülü dizileme çalışmalarında kullanılacaksa, Kalite kontrolü **RNA bioanalyzer cihazları** ile yapılmalıdır.

Figure 2.1 Example Agilent Bioanalyzer Electropherograms from three different total RNAs of varying integrity. Panel [A] represents a highly intact total RNA (RIN = 9.2), panel [B] represents a moderately intact total RNA (RIN = 6.2), and panel [C] represents a degraded total RNA sample (RIN = 3.2).

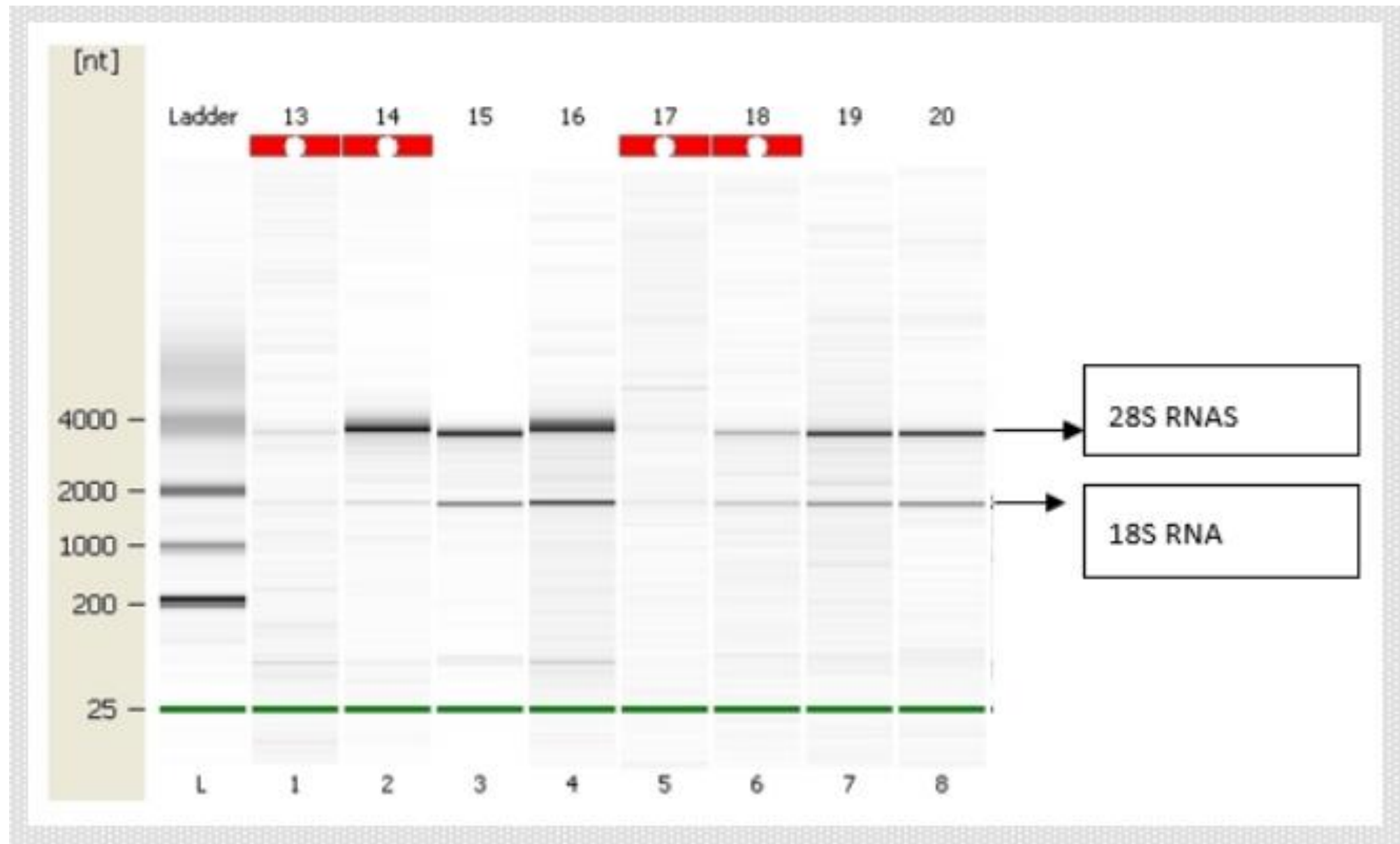


NOTE: Total RNAs with lower RIN values may require increased input amounts to generate enough aRNA for hybridization to an array.

Bioanalyser

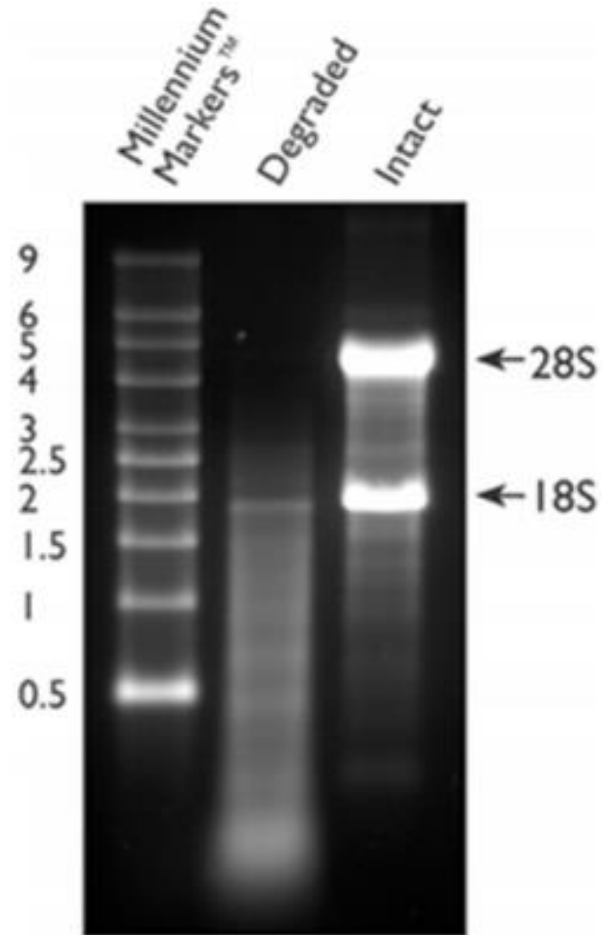


Bioanalyser



RNA'nın Agaroz Jelde Görüntülenmesi 1

- RNA molekülü tıpkı DNA molekülü gibi agaroz jelde yürütülebilir. Fakat kullanılan tamponlar ve ortam şartları farklıdır.



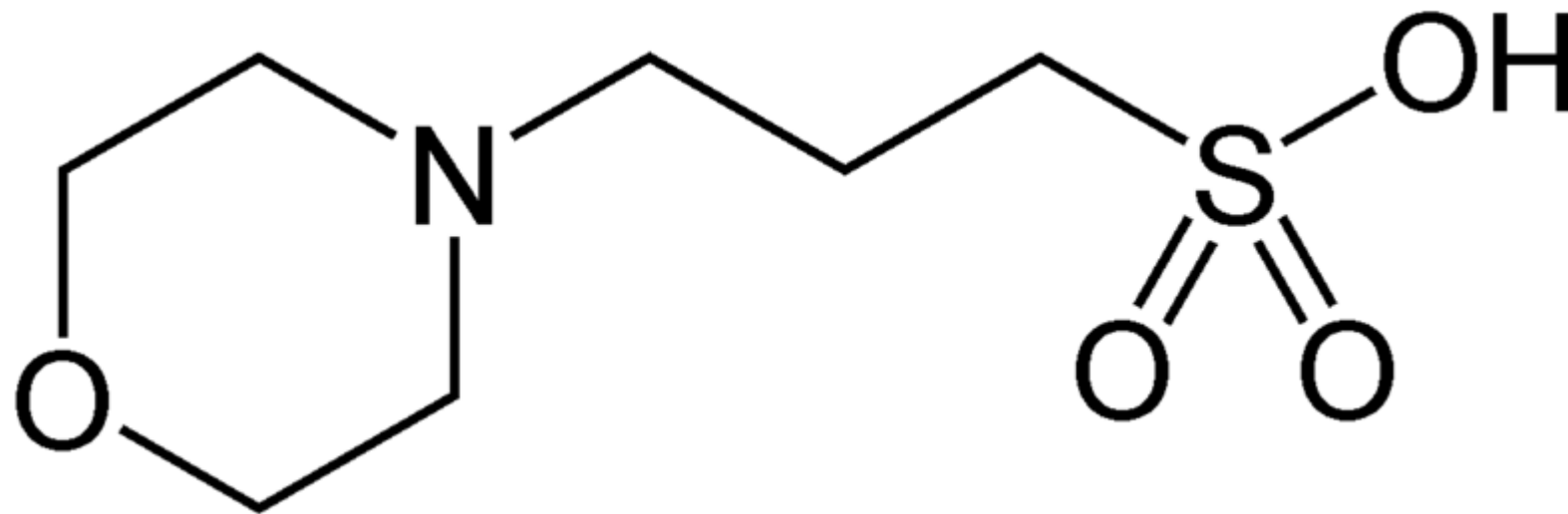
Total RNA izolasyonu sonucu eğer RNA degrede olmuşsa agaroz jelde smear görüntüsü oluşur. RNA parçalanmamışsa 18 S ve 28 S olarak yoğun görülen RNA bantları oluşur.

RNA'nın Agaroz Jelde Görüntülenmesi 2

- **Prensip 1:** RNA Sekonder yapıda bulunur. (1. Slayt) jelde yürütülürken ise bu sekonder yapısını kaybetmesi gerekmektedir. Bunun için denatüre edici ajan olarak jel yapısının içerisinde **formaldehyde** bulunmalıdır.
- **Prensip 2:** Tek zincirli halde bulunan RNA molekülü EtBr gibi bir boya ile etkileşime girme eğilimi göstermez. Bu bakımdan etkileşim oluşmasını zorlamak için hem jel içerisine hem de loading dye içerisine EtBr eklenmesi gerekmektedir.
- Agaroz jel karışımı içerisinde MOPS buffer bulunmalıdır.

RNA'nın Agaroz Jelde Görüntülenmesi 3: **MOPS**

- 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid
- Nötral pH ortamı sağlar.
- 10X MOPS buffer oda sıcaklığında filtre edilerek veya otoklavlanarak karanlıkta saklanır. Rengi sarı olmalıdır. Koyulaşmış olan MOPS'un yapısı bozulmuştur. Kullanılmamalıdır.



Nükleik Asitlerin Spektrofotometrik Ölçümü ve Saflık Kontrolü

- Optik Densite (OD) Ölçümü : Nükleotidler spektrumun UV bölgesinde maximum 260 nm dalga boyundaki ışığı absorbe ederler. Proteinler ise 280 nm UV ışığı daha fazla absorbe ederler.
- OD değeri; DNA ve RNA'nın saflıklarını belirlemede kullanılmaktadır.
- Eğer Solüsyon protein içeriyorsa, OD 260/280 oranı azalır.
- **Saf DNA'nın OD 260/280 oranı: 1,8**
- **Saf RNA'nın OD 260/280 oranı: 2.0**
- **RNA Konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$): $A_{260} \times \text{Sulandırım oranı} \times 40$**

Önemli Noktalar

- RNA yapısından dolayı DNA'ya göre daha kırılgan bir nükleik asittir. Bundan dolayı RNA çalışmalarında gereken titizlik mutlaka gösterilmelidir. Çünkü ortamdaki en ufak olumsuzluk RNA'ların parçalanmasına neden olabilir.
- RNA saflaştırma işlemine başlamadan önce çalışma yapılacak alan öncelikle “RNasezap” ile dezenfekte edilmelidir. Çünkü, çalışmalarda kullanılacak tüm kimyasalların RNase bakımından temiz olması gerekmektedir. Bundan dolayı kullanılan kimyasallar sadece RNA çalışması için kullanılmalıdır.
- Ayrıca laboratuvarda RNA çalışmaları için özel bir alan oluşturulmalıdır. Bir diğer önemli nokta da, çalışmalarda ultra-pure otoklavlanmış DEPC'li su kullanılmasıdır. DEPC ortamdaki RNase'lerinin inaktif olmasını sağlar.

KANDAN RNA İZOLASYONU PROSEDÜR

1. Total kan, 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edilir.
2. Süpernatant uzaklaştırılır. Aradaki faz yeni ependorfa toplanır.
3. Toplanan fazın üstüne 800 µl Trizol eklenir. (Bu aşamada RNA'ya bağlı proteinler uzaklaştırılır).
4. 1-2 dk elde hızlıca çalkalanır. 5 dk oda sıcaklığında bekletilir. (5 dk' dan fazla beklerse RNA zarar görebilir).
5. 160 µl kloroform eklenir.
6. 1-2 dk elde hızlıca çalkalanır. Bu aşamada yoğun kıvamda olacak. 2-3 dk beklet.
7. 13.000 rpm'de 15 dk santrifüj edilir. (+4°C)
8. Üst faz yeni tüpe aktarılır.
9. 400 µl, 2-propanol eklenir. 3-5 defa alt üst edilir. Bulanıklık gözlenir.
10. 10 dk oda sıcaklığında beklenir.
11. 13.000 rpm'de 15 dk santrifüj edilir. (+4°C)
12. 1 ml %70 etanol eklenir.
13. 7.500 rpm'de 5 dk santrifüj edilir. (+4°C) Pellet görünmeli.
14. Pellet 30 µl nuclease-free dH₂O ile çözülmeli.