

## **Metoda: Izolace RNA fenol – chloroformovou metodou**

Zuzana Nováčková, Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví, 2. ročník

Školitelé: Mgr. Kateřina Chudějová, Ph.D.

**Princip:** Technik k izolaci nukleových kyselin se v dnešní době využívá celá řada. Mě však nejvíce zaujala klasická metoda izolace RNA pomocí fenol – chloroformu. Nejprve je důležité připravit si lyzát, který získáme přidáním specifických enzymů a detergentů ke vzorku. Tyto látky naruší celistvost buněk a umožní vylítí jejich obsahu. Kromě nukleových kyselin jsou to však i různých proteiny, které vzorek kontaminují. Následně tedy přidáme lyzační roztok, který buněčné proteiny degraduje. Nejčastěji se využívá proteináza K či RNáza nebo DNáza (záleží, jakou nukleovou kyselinu chceme izolovat a jakou potřebujeme degradovat.)

V tuto chvíli je již lyzát připraven k dalšímu kroku metody, kterým je přidání roztoku fenolu a chloroformu. Fenolová část odděluje nukleové kyseliny od natrávených proteinů pomocí rozdílné rozpustnosti v polárních (vodný roztok) a méně polárních rozpouštědlech (fenol). Nukleové kyseliny jsou vysoce polární a ve fenolu se špatně rozpouští, proto přechází do vodné fáze. Proteiny jsou složeny z více či méně polárních aminokyselin, takže se shromažďují na rozhraní mezi fenolem a vodným roztokem.

Následně necháme vzorek centrifugovat, díky čemuž dojde k jeho rozdělení na fenolovou fázi, fázi se zbytkem denaturovaných proteinů a buňek (tzv. mezifázi) a vodnou fázi s rozpuštěnými nukleovými kyselinami. K separaci těchto fází napomáhá chloroform. Poté se odpipetuje vodná fáze do směsi izoamylalkoholu s chloroformem, čímž dojde k očištění od proteinů.

V závěrečné fázi RNA precipujeme z vodného roztoku, čehož dosáhneme přidáním etanolu, případně izopropanolu.

**Uplatnění metody:** Izolace obecně nukleových kyselin má mnohá využití, neboť získaná nukleová kyselina tvoří výchozí materiál pro téměř všechny molekulárně genetické metody, například metoda PCR, NGS nebo aCGH.

**Úskalí metody:** Hlavní nevýhodou metody je značná pracnost a časová náročnost. Kromě toho je molekula RNA v porovnání s molekulou DNA náchylnější na působení ribonukleáz. Po kontaktu s nimi dojde k její degradaci. Z tohoto důvodu je velmi důležité přísné používání rukavic, speciálních špiček s filtrem a vody bez aktivních ribonukleáz. Dalším problémem je využití fenolu a chloroformu, které mohou být pro laboratorní personál zdravotním rizikem. V neposlední řadě je při práci s nukleovými kyselinami nutné dodržovat etická pravidla.

**Přístrojové vybavení:** Tato metoda není na přístrojové vybavení nijak náročná. Zapotřebí je pouze centrifuga, která je však v dnešní době běžnou výbavou téměř každé laboratoře.

**Odběr a transport:** Pro izolaci nukleových kyselin se téměř ve většině případů používá nesrážlivá žilní krev. Proto je důležitý odběr do K3EDTA zkumavek, které zabrání jejímu srážení. Kromě krve se zpracovávají i jiné tělesné tekutiny, nativní tkáň nebo buněčné kultury.