

## Estrazione RNA con kit su colonnina Qiagen; retrotrascrizione in cDNA

### Vi serviranno:

- 1 eppendorf di RLT Buffer (350  $\mu$ l)
- 1 eppendorf di etanolo 70%, marchiata ET
- 1 eppendorf di RW1 Buffer (700  $\mu$ l) *LAVAGGIO che lava le proteine*
- 1 eppendorf di RPE Buffer (1000  $\mu$ l); vi servirà per due passaggi da 500  $\mu$ l cad. *BASE ALCOLICA che toglie i lipidi*
- 1 eppendorf da 200  $\mu$ l con RNase-free H<sub>2</sub>O
- 1 collection tube pulito
- 1 eppendorf da 1,5 ml RNase-free; marchiatela con RNA + identificativo del vs. gruppo
- 1 eppendorf da 200  $\mu$ l pulita

### 1. Estrazione RNA da pellet cellulari (esperienza del 11.5.18)

- 1.1. Risospendere accuratamente le cellule con 350  $\mu$ l di RLT utilizzando un puntale da 1000  $\mu$ l, pipettando più volte, sino ad ottenere una sospensione omogenea. *CON FORZA per rompere le pareti cellulari*
- 1.2. Aggiungere 350  $\mu$ l di etanolo 70% alla sospensione e miscelare.
- 1.3. Spostare tutti i 700  $\mu$ l sulla colonnina rosa del kit, montata sul suo collection tube.
- 1.4. Centrifugare a 8000 g per 15".
- 1.5. Eliminare, smontando la colonnina, l'eluato.
- 1.6. Rimontare la colonnina sul collection tube.
- 1.7. Aggiungere 700  $\mu$ l di RW1 sulla colonnina.
- ✓ 1.8. Centrifugare a 8000 g per 15".
- ✓ 1.9. Eliminare, smontando la colonnina, l'eluato.
- ✓ 1.10. Aggiungere 500  $\mu$ l di RPE sulla colonnina.
- ✓ 1.11. Centrifugare a 8000 g per 15".
- ✓ 1.12. Eliminare, smontando la colonnina, l'eluato.
- ✓ 1.13. Rimontare la colonnina sul collection tube.
- ✓ 1.14. Aggiungere una seconda volta 500  $\mu$ l di RPE sulla colonnina.
- ✓ 1.15. Centrifugare a 8000 g per 2'.
- ✓ 1.16. Eliminare, smontando la colonnina, l'eluato.
- ✓ 1.17. Rimontare la colonnina sul nuovo collection tube fornito.
- 1.18. Centrifugare a massima velocità per 1'. *14680 rpm*
- ✓ 1.19. Eliminare il collection tube; porre la colonnina su eppendorf da 1,5 ml RNase-free fornita già marchiata.
- 1.20. Aggiungere 30  $\mu$ l di RNase-free H<sub>2</sub>O sulla colonnina. *per non degradare l'RNA*
- 1.21. Centrifugare a 8000 g per 1' CON LA NOSTRA ASSISTENZA. *il TAPPO deve stare in coda al senso di rotazione*
- 1.22. L'RNA estratto è ora sul fondo della eppendorf.

*H<sub>2</sub>O maggiormente affine all'RNA rispetto alla matrice quindi centrifugando porta nel tubo l'RNA*

MATRICE AFFINE RNA

### 2. Quantificazione RNA estratto

- 2.1. Quantificare al NanoDrop l'RNA che avete estratto.
- 2.2. Aliquotarne 8  $\mu$ l su eppendorf da 200  $\mu$ l pulita. *SONO GIÀ 8  $\mu$ l*
- 2.3. Portare a volume di 8  $\mu$ l totali; vi servirà così diluito nella successiva reazione di retrotrascrizione.

RISULTATI NANODROP	
ng/ $\mu$ l :	381.6
A260/A280 :	2.12
A260/A230 :	1.62

*(un po' basso! l'ottimale sarebbe > 2.0)*



### 3. Retrotrascrizione dell'RNA in cDNA

- 3.1. Utilizzerete l'RNA aliquotato in precedenza.
- 3.2. Denaturarlo a 65°C per 10' nel termociclatore. *OGNI SINGOLO FILAM SI DISAPPAIA*
- 3.3. Spostare velocemente in ghiaccio i campioni. *OGNI SINGOLO FILAM SI APPAIA CON SE STESSO*
- 3.4. Aggiungere 7 µl di reagente di retrotrascrizione, che vi forniremo noi, al tubo con l'RNA denaturato; miscelare pipettando.
- 3.5. Centrifugare brevemente i tubi, in modo da trattenere la miscela di reazione sul fondo.
- 3.6. Avviare la reazione, ponendo i tubi a 37°C per 60'.
- 3.7. Conservare a -20°C.

TRASCRITTASI INVERSA

CON BUFFER DI REAZ

• PRIMER GENERICO CHE SI LEGA A TUTTI I  
FILAMENTI SINGOLI IN PIÙ PARTI

la polimerasi  
NON AGISCE SULLE  
STRUTTURE  
SECONDARIE!