

Estrazione dell'RNA totale con TRIZOL

1) Triturare le foglie in un mortaio versando azoto liquido fino ad ottenere una polvere.

Trasferire circa 100 mg di campione (1-2 spatole) all'interno di 1 Eppendorf da 2 mL etichettati con il nome del gruppo.

2) risospendere i tessuti tritati in TRIZOL (1 ml per 50-100 mg di tessuto) e vortexare 10 secondi.

3) lasciare il campione per 5 minuti a temperatura ambiente per assicurare la completa dissociazione dei complessi nucleoproteici.

4) aggiungere 0.2 ml di cloroformio per ml di TRIZOL usati e vortexare vigorosamente per 15 secondi.

5) lasciare 15 minuti a temperatura ambiente.

6) centrifugare a 12000xg per 15 minuti a 4°C. La centrifugazione permette di ottenere tre fasi: una fase organica rossa (contenente le proteine), un'interfase (contenente il DNA genomico precipitato) e una fase acquosa superiore (contenente l'RNA). *p200 gialle → acquosa in eppendorf nuovo sotto cappa*

7) trasferire la fase acquosa in una nuova provetta a aggiungere 0.5 ml di 2-propanolo per ml di TRIZOL usati e mescolare.

8) lasciare 20 min a -20 °C e successivamente centrifugare a 12000xg per 10 minuti a 4°C. L'RNA precipita formando un pellet nel fondo della provetta.

9) rimuovere il supernatante e lavare il pellet aggiungendo 1 ml di etanolo 70% per ml di TRIZOL usato.

10) vortexare il campione e centrifugare a 12000xg per 5 minuti a 4°C.

11) asciugare il pellet (RNA) per 10 minuti all'aria (non aspettare che l'RNA si asciughi completamente).

12) aggiungere al pellet un volume appropriato (50-100 ul) di acqua DEPC e risospendere.

475 H₂O 25 RNA

$\frac{1}{10}$

per avere la concentrazione bisogna moltiplicare per 20

Quantificazione del RNA totale e del DNA mediante Spettroscopia UV

Spettrofotometro a cuvetta:

- 1) Diluire 1:20 il campione di RNA in acqua (volume finale 500 μ L) in una eppendorf pulita.
- 2) Dopo aver registrato il bianco, acquisire lo spettro di assorbimento tra 230 e 400 nm.
- 3) Calcolare la quantità di RNA ($A=1 \rightarrow 40$ ng/ μ L) e la sua purezza (rapporto A_{260}/A_{280}) tenendo conto delle diluizioni.

Spettrofotometro nanodrop:

Si misurerà la concentrazione del pUC18 (miniprep della prima esperienza)

- 1) Depositare una goccia (2 μ L) di acqua sul tip del nanodrop.
- 2) Abbassare delicatamente il braccio e registrare il bianco.
- 3) Sollevare il braccio, asciugare il tip con della carta assorbente.
- 4) Depositare una goccia (2 μ L) di campione sul tip del nanodrop.
- 5) Abbassare delicatamente il braccio e registrare lo spettro.
- 6) Calcolare la quantità di RNA ($A=1 \rightarrow 40$ ng/ μ L) e la sua purezza (rapporto A_{260}/A_{280})

Congelare l'RNA non diluito ed il plasmide pUC18.