

# İnsan Kan Örneğinden Total RNA İzolasyonu

## GİRİŞ

DNA'da depolanan genetik bilginin diğeri bir nükleik asit olan RNA'ya transfer olduğunu biliyoruz. Genetik analizlerin bazıları RNA üzerinde çalışılarak gerçekleştirilir. Kesin bir boyutlandırma ve karakterizasyon işlemi yapmak ve cDNA kütüphaneleri oluşturabilmek için RNA intakt olarak elde edilmelidir. İntakt RNA izolasyonu için Guanidium thiocyanide metodu kullanılacaktır.

## Prosedür

### Total RNA İzolasyonu

1- 5 ml kan örneği alınır ve (0.5 ml 0.5 M EDTA,ph:8.0) EDTA içeren tüpe transfer edilir.

2-Eşit hacimde fikolle kan tabakası yavaşça oluşturulur ve 1000xg ,20 dakika satrifüjlenir.

3-Lökosit tabakası dikkatlice alınır ve 1ml PBS ile yıkanır.

4-6500 rpm de 2 dakika mikrosantifüj uygulanır ve süpernatant atılır.

5-Hücrelerin üzerine 1000 µl solusyon D ve 100 µl sodyum asetat eklenir.

6-Tüp çalkalandıktan sonra 100 µl asidik fenol eklenir.

7-İyice karıştırılır ve 200 µl kloroform:izoamil alkol (49:1) karışımından eklenir.

8-15 dakika buz üzerinde bekletilir ve 10000xg,20 dakika satrifüjlenir.

9-Süpernatant alınır ve 1000 µl izopropanol eklenir. Sonra 30 dakika boyunca -20 C°de inkübe edilir.

10-10000xg de 20 dakika tekrar santifüjlenir. Santifüj sonrası RNA peleti tüpün yüzeyinde beyaz bulutsu biçimde görünebilir. Süpernatant atılır.

11-RNA molekülleri %75lik alkolde tekrar süspanse edilir.

## İzolatanın Agaroz Jel Elektroferez Yöntemi ile Denetimi

1-0.2 gr agaroz 17.4 ml su içerisinde kaynatılır.( DEPC ile muamele edilmiş)

2-MOPS tamponundan 2 ml, %37'lik formaldehitten 600µl eklenir.

3-60C°'deki jel elektroferez tankına dökülür.

### Solüsyonlar

#### Örnek Karışımı

#### Kloroform: İzoamilalkol

2.5µl	MOPS tamponu	26.26 gram	MOPS (3-(N-morfolino)propeno sülfonik asit)
4.3 µl,%37	Formaldehit	50ml,1 M	Sodyum asetat
5.7	RNA örneği	6.20 ml 0.5 M	EDTA

\*Elektroferez yürütülürken MOPS tamponu kullanılır.  
tamamlanır.

\* dH<sub>2</sub>O kullanarak 1 litreye

### Solüsyon D:

4M	Guanidyum tiyosiyanat
25 mM	Sodyum sitrat
%0.5	Sarkosil
0.1 M	B-Merkaptoetanol

#### PBS Tamponu

20ml,5M	NaCl
20ml,1M	Tris-HCl (pH:7.4)
20 ml,0.5 M	EDTA (pH:7.5)

\*dH<sub>2</sub>O kullanarak 1 litreye tamamlanır.

### Sodyum asetat:

2 M Sodyum asetat, pH: 4.0