

Spis treści

Wstęp	7
1. Analiza northern – detekcja RNA na filtrach. Wykrywanie prekursorów rRNA u drożdży.	9
Opis i cel doświadczenia	9
ĆWICZENIE 1. Izolacja całkowitego RNA z różnych organizmów oraz ocena jakościowa uzyskanego preparatu	10
Metody izolacji RNA	10
RNazy	10
Dobra praktyka laboratoryjna	11
Inhibitory RNaz	11
Przechowywanie RNA	12
Ocena jakości RNA	12
Izolacja całkowitego RNA z komórek drożdżowych	13
Literatura	14
ĆWICZENIE 2. Elektroforetyczny rozdział RNA w żelu agarozowym i ocena jakości RNA	15
Technika northern	15
Znakowanie izotopowe	15
Znakowanie nieizotopowe	15
Detekcja znaczników nieradioaktywnych	16
Elektroforeza RNA z drożdży w żelu agarozowym w warunkach denaturujących	16
Transfer kapilarny	17
ĆWICZENIE 3. Wykrywanie prekursorów rRNA u drożdży – hybrydyzacja	18
Skład buforów	18
Procedura hybrydyzacji	18
Odplukanie nadmiaru sond	18
Wizualizacja hybrydyzacji	18
Literatura	18
2. Analiza northern – wykrywanie transkryptów CUT u drożdży	20
Wstęp.	20
Co to są CUTy?	20
Funkcje CUTów	21
Literatura	21
ĆWICZENIE 4. Elektroforeza RNA w denaturującym żelu poliakrylamidowym	23
Elektroforeza RNA w 6% żelu poliakrylamidowym z 7 M mocznikiem	23
Transfer elektryczny mokry	23

ĆWICZENIE 5. Hybrydyzacja RNA na membranie z sondą radioaktywną specyficzną wobec IGS1-R, wyznakowaną metodą „random-priming”	24
3. Wykrywanie małych RNA	25
Wstęp	25
Małe interferujące RNA: miRNA i siRNA	25
Wybrane metody detekcji małych RNA (iRNA)	26
Literatura	28
ĆWICZENIE 4. Pulsacyjny RT-PCR, cz. 1 – pulsacyjna odwrotna transkrypcja	29
Materiały	29
Trawienie DNazą	29
Pulsacyjna odwrotna transkrypcja	29
ĆWICZENIE 5. Reakcja PCR – cz. 2	31
ĆWICZENIE 6. Rozdział w żelu agarozowym produktów pulsacyjnego RT-PCR	32
Przygotowanie próbek	32
4. Badanie końców cząsteczek RNA na przykładzie drożdżowych prekursorów snoRNA. Technika cRT-PCR	33
Wstęp	33
RNaza H	33
Ligacja RNA	34
Literatura	34
ĆWICZENIE 6. Trawienie RNazą H i ligacja RNA	35
Trawienie RNazą H	35
Ligacja RNA	36
ĆWICZENIE 7. Reakcja odwrotnej transkrypcji i PCR	37
Reakcja odwrotnej transkrypcji	37
PCR	37
ĆWICZENIE 8. Elektroforeza produktów PCR	38
5. PCR ilościowy: RT-qPCR	39
Wstęp	39
Formaty detekcji produktów qPCR	39
Kontrola jakości RNA	40
Analiza doświadczeń qPCR	40
Najbardziej kluczowe elementy RT-qPCR	41
Literatura	42
ĆWICZENIE 8. Projektowanie starterów do qPCR – konkurs na najlepszą parę starterów	43
Wskazówki do projektowania starterów	43
Wykonanie ćwiczenia	44
ĆWICZENIE 9. Testowanie zaprojektowanych starterów do qPCR	45
Przygotowanie starterów	45
Przygotowanie reakcji qPCR	45
ĆWICZENIE 10. Analiza reakcji qPCR	46

6. Oznaczenia aktywności enzymów biorących udział w obróbce RNA	47
Oznaczenie aktywności enzymów hydrolizy kapu	47
Struktura kapu transkryptów polimerazy RNA II	47
Hydroliza kapu	48
Badanie enzymatycznej hydrolizy kapu	49
Oznaczenie aktywności endonukleazy Rnt1	50
Endonukleazy z rodziny RNazy III	50
Rnt1	51
Biogeneza sn/snoRNA u drożdży <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , rola Rnt1	52
Literatura	53
ĆWICZENIE 11. Analiza aktywności Rnt1 w ekstrakcie drożdżowym	55
Protokół	55
7. Analiza oddziaływania białka z kwasem nukleinowym: test opóźnienia migracji w żelu (EMSA)	58
Wstęp	58
Analiza EMSA	58
Terminacja transkrypcji polimerazy RNA I	59
Literatura	60
ĆWICZENIE 12. Wiązanie Reb1 do IGS1 rDNA <i>in vitro</i>	61
Badane warianty IGS1 rDNA <i>S. cerevisiae</i>	61
Wiązanie białka do DNA	61
Rozdział w natywnym żelu poliakrylamidowym	61
8. Sztuczne microRNA – amiRNA	63
Wstęp	63
Wybrane zalety amiRNA	64
Wady amiRNA	64
Literatura	64
ĆWICZENIE 13. Projektowanie amiRNA	64