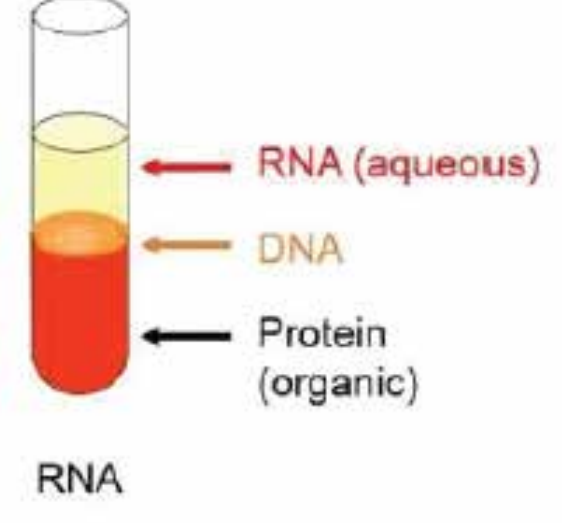


Toplam RNA İzolasyonu: Yüksek Saflıkta RNA Elde Etmenin Kolay Yöntemleri

DNA uzun yıllar uygun koşullarda saklandığında stabil kalabilirken RNA kısa ömürlüdür. Çünkü her türlü koşulda bulunabilen "RNaz" adı verilen enzimler RNA'nın bozulmasına sebep olur. Bu nedenle hücrelerden toplam RNA'nın izolasyonunu yüksek verimle yapabilecek aynı zamanda RNA'nın bozulmasını da engelleyecek bir yöntem gereklidir.



Toplam RNA nedir?

Toplam RNA, bir hücrenin içinde bulunan tüm RNA molekülleridir. Tüm prokaryot ve ökaryot hücreleri aşağıdaki türleri içerir:

> Messenger RNA (mRNA):

Belirli koşullar altında hücresel gen ekspresyonunun anlık okunması olarak hizmet eden uzun protein kodlayan ve DNA'ya taşıyan haberci RNA'dır.

> MikroRNA (miRNA):

Birçoğu gen ekspresyonunun düzenlenmesi ve susturulmasında yer alan sayısız diğer kodlayıcı olmayan RNA molekülüdür.

> Ribozomal RNA (rRNA):

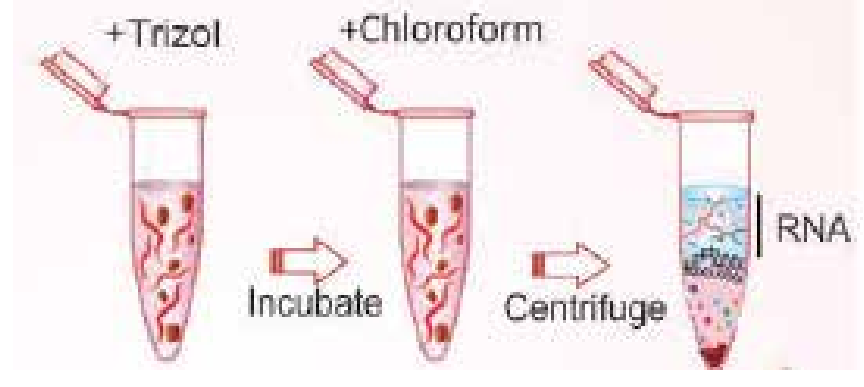
Ribozomların önemli bir bileşenidir ve protein sentezi için kritiktir.

> Transfer RNA (tRNA):

Protein sentezi için başka bir kritik bileşendir. Bir öncü molekülün nükleusta işlenmesiyle oluşur. Bu RNA molekülleri, sentezlenen proteine doğru amino asidin eklenmesini sağlamak için amino asitleri ribozoma ve baz çiftine mRNA ile taşır.

RNaz Nedir?

Ribonükleazlar (RNazlar), RNA'yı parçalayan enzimlerdir. Bu enzimler RNA izolasyonu sırasında çok sorun yaratırlar, çünkü her yerde bulunurlar ve ortadan kaldırılmaları da çok zordur. Toplam RNA izolasyonu yaparken RNazı eleme ettiğinizden emin olmanız gerekir.



Toplam RNA İzolasyonunda RNazları Trizol Kullanarak Uzaklaştırmak

RNaz'ları etkisiz hale getirmek elbette ki imkânsız değildir. RNaz'ları inhibe ederken aynı zamanda RNA'ları da güvenli bir şekilde izole etmeyi sağlayan ilk yöntemi Piotr Chomczynski ve Nicoletta Sacchi tarafından uygulanan Guanidinium tiyosiyanat-fenol-kloroform izolasyon yöntemidir. Bu yöntem, protein hücre bileşenlerini parçalayan ve RNazlar dahil tüm enzimleri inaktive eden güçlü bir protein denatüre eden kimyasal bileşenlerden oluşan bir formdur. İzolasyonu tipik olarak toplam RNA'yı berrak bir sulu fazda sınırlamak için asidik fenol-kloroform kullanılır, proteinler ve hücre kalıntıları ise pembe organik katmanda son bulur. RNA, izopropanol ile çöktürülerek geri kazanılabilir, yıkanabilir ve daha sonra suda yeniden çözülebilir. Bu yöntemin hazır formda olan birçok markası vardır. Ve kendi fenol guanidin izotiyosiyanat karışımınızı da yapmanız mümkündür.

Toplam RNA izolasyonu için Trizol'ün Faydaları

- RNazların denatüre edilmesi,
- miRNA gibi küçük moleküler ağırlıklı RNA'lar da dahil toplam RNA'nın izolasyonu,
- Yüksek kaliteli RNA,
- Kullanımı nispeten basit,
- Bir numuneden aynı anda DNA protein ve RNA izolasyonuna izin verir.

Trizol Kullanmanın Dezavantajları

- Diğer RNA izolasyonu yöntemleriyle karşılaştırıldığında maliyetli olabilir,
- Tehlikeli ve toksiktir,
- Dikkatli çalışılmaz ise izole edilmiş RNA faz ayrımı esnasında fenol ile kontamine olabilir,
- Zaman alıcı olabilir.

RNA izolasyonu için Trizole Alternatif Olarak Kullanılan Ticari Kitler

Trizol veya diğer tehlikeli kimyasalları kullanmayan birçok ticari kit vardır. Bugün günümüzde neredeyse tüm uygulamalar için uygunluk gösterebilen ticari kitler mevcuttur. Bu kitler RNA'yı yakalamak için spin kolon ya da manyetik boncuk yöntemlerini kullanabilir. miRNA veya diğer küçük moleküler ağırlıklı RNA türleri için de özel olarak tasarlanmış kitler bulunmaktadır. Kit metotları çoğu zaman farklı kaynak ve materyallerden RNA çıkarmak için optimize edilmiş oldukları için Trizole göre daha güvenli ve stabildirler.

ÖZET

Trizol ve ticari olarak temin edilebilen kit metotlarının maliyet, tehlikeli kimyasalların kullanımı ve uygunluk açısından artıları ve eksileri vardır ve bunların her biri seçilmeden önce dikkatlice düşünülmelidir.