**Απομόνωση ολικού RNA με την μέθοδο της γουανιδίνης**

Η γουανιδίνη είναι χαοτροπική ουσία η οποία συγχρόνως αποσυνδέει πρωτεϊνες από τα νουκλεϊνικά οξέα και απενεργοποιεί τις RNάσες. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για ιστούς με μεγάλα ποσά RNασών αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθή και για κάθε άλλο είδος ιστού. Τα διαλύματα γουανιδίνης δεν υποβάλονται σε χρήση DEPC. Οι αποδόσεις RNA με την μέθοδο αυτή κυμαίνονται συνήθως στα 0.5-1 mg/g φυτικού ιστού, 150-200 μg/108 ζωϊκά κύτταρα, 30-100 μg/107 βακτηρίδια ή ζυμομύκητες.

1. Φυτικοί (0.1-100 g) και ζωϊκοί (0.1-20 g) κονιοποιούνται σε υγρό άζωτο και κατόπιν προστίθενται 5-10 ml ανά g ιστού διάλυμα 4 Μ ισοθειοκυανική ή θειοκυανική γουανιδίνη, ή 6-7 Μ υδροχλωρική γουανιδίνη, 10 mM DTT ή 100 mM β-μερκαπτοαιθανόλη, 25 mM κιτρικό νάτριο pH 7 ή pH 5.2, 0.5-1% w/v SDS ή σαρκοσύλ. Ιζήματα πυρήνων, χλωροπλαστών, μιτοχονδρίων, ριβοσωμάτων, και κυτταρικών μεμβρανών ενδοπλασματικού δικτύο ομοίως διαλύονται σε 3-5 όγκους του ιδίου μέσου. Ιζήματα βακτηρίων από 5-100 ml καλλιέργειας, ή ζυμομυκήτων από 5-200 ml καλλιέργειας, διαλύονται σε 2-5 όγκους του ιδίου μέσου επίσης. Γενικώς, για απομόνωση αρκετού RNA απαιτούνται τουλάχιστον 107 κύτταρα. *Το παρασκεύασμα γίνεται αρκετά έως εξαιρετικά ιζώδες στo στάδιο αυτό λόγω απελευθέρωσης νημάτων DNA.*

2. Αν και δεν είναι απόλυτα απαραίτητο, η ρευστότητα του παρασκευάσματος στο στάδιο αυτό μπορεί να αυξηθή είτε περνόντας το 4-5 φορές από σύριγγα 18-20G, είτε με θέρμανση στούς 65οC. Κατόπιν, τα αδιάλυτα συστατικά, τα οποία συνήθως συναντώνται στις περιπτώσεις των φυτικών και ζωϊκών ιστών, απομακρύνονται είτε με διήθηση δια μέσου 6 στρωμάτων τυρόπανου ή δια μέσου ενός στρώματος Miracloth, είτε με φυγοκέντρηση στα 10.000 xg επί 10 min. *Εναλλακτικά, και για να αποφευχθή το μεγάλο ιζώδες πού συχνά παρεμποδίζει την διήθηση, το SDS και σαρκοσύλ προστίθενται μετά την διήθηση και όχι κατά το στάδιο 1.*

3. Στο διήθημα ή υπερκείμενο προστίθενται 1/10 όγκοι 3 Μ οξικό νάτριο pH 4-5, 1 όγκος όξινης φαινόλης (κεκορεσμένης με νερό, και δύο όγκοι χλωροφορμίου. Το μίγμα αναμιγνύεται (εκτελείται εκχύληση) και οι φάσεις διαχωρίζονται με φυγοκέντρηση στα 10.000 xg επί 15 min. Η ανωτέρα φάση είναι η υδατική και περιέχει τα RNA. Το DNA έχει παραληφθή από την όξινη φαινόλη στην κατώτερη οργανική φάση. Οι πρωτεϊνες βρίσκονται στην διαχωριστική επιφάνεια μεταξύ των δύο φάσεων. *Για RNA μεγάλης καθαρότητας μεταβαίνουμε στο στάδιο 7 όπου περιγράφεται η μέθοδος τηε φυγοκέντρησης δια μέσου στρώματος CsCl.*

4. Τα RNA της υδατικής φάσεως παραλαμβάνονται με καθίζηση ισοπροπανόλης (1 h, -20oC).

5. To ίζημα επαναδιαλύεται σε 500 μl διαλύματος του σταδίου1 χωρίς όμως SDS ή σαρκοσύλ. Επαναλαμβάνεται η καθίζηση με αιθανόνη την φορά αυτή.

6. Το νέο ίζημα πλύνεται με 70% αιθανόλη, και ζηραίνεται με άζωτο ή σε ζηραντήρα κενού, όχι όμως εντελώς. Διαλύεται σε 30-500 μl ΤΕ ή νερού με ανακίνηση για 1-12 h. Αποθηκεύεται στούς -20oC έως -80oC. Το ποσό και η καθαρότητα του RNA μετρείται όπως περιγράφεται για το DNA με την διαφορά ότι μία μονάδα OD260 ισούται με 40 μg/ml RNA. *Η πλήρης ζήρανση του RNA συχνά δημιουργεί μη επαναδιαλύσιμα ιζήματα. Ακόμη και με μερική ξήρανση η επαναδιάλυση είναι δύσκολη και SDS σε τελική συγκέντρωση 0.5 % w/v συχνά προστίθεται για να υποβοηθήση την διάλυση.*

7. Για RNA ακόμη μεγαλύτερης καθαρότητας, η υδατική φάση του σταδίου 3 προστίθεται CsCl σε τελική συγκέντρωση 1 Μ (0.1 g CsCl ανά ml. Εάν ο όγκος είναι μεγάλος, προηγείται η καθίζηση ισοπροπανόλης του σταδίου 4 και το ίζημα διαλύεται σε 1Μ CsCl, 50 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, όγκου τόσου ώστε να προσαρμόζεται στο μέγεθος του διαθέσιμου υπερφυγοκεντρικού σωλήνα. Το παρασκεύασμα τίθεται εντός του φυγοκεντρικού σωλήνα, υπεράνω ενός πυκνοτέρου στρώματος 2-6 ml 5.7 Μ CsCl, και φυγοκεντρείται στα 80.000-100.000 xg επί 4-18 h. Το RNA διαπερνά το στρώμα του 5.7 Μ CsCl και εμφανίζεται ως ίζημα. Τα ανώτερα στρώματα απομακρύνονται προσεκτικά με μία πιπέτα, ο σωλήνας επαφίεται ανεστραμένος επί 1 h να στραγγίση, και το RNA επαναδιαλύεται σε διάλυμα αποθήκευσης όπως περιγράφεται στο στάδιο 6.