

Protocolo de extração de RNA de amostras conservadas em TriZol[®]

(LAB. PROTOZOLOGIA – IMT – FMUSP)

1. Pré-ajustar a microcentrífuga refrigerada para que se obtenha a temperatura de 4°C.
2. Transferir toda a solução conservante para um tubo de 1.5mL, tomando o cuidado de não transferir pedaços do órgão ou o pellet de células.
3. Adicionar 0.2mL de clorofórmio para cada 1mL de TriZOL[®] que foi transferido para o tubo. Vortexar vigorosamente até obter uma solução rósea de aspecto leitoso.
4. Centrifugar a 13.000g a 4°C por 15 minutos.
5. Observar as 3 fases da solução: a primeira, aquosa, contém o RNA; a interfase branca e leitosa contém principalmente DNA e a fase inferior rósea contém predominantemente proteínas. Separar a fase aquosa para um novo tubo de 1.5mL.
6. Adicionar a cada tubo isopropanol, na mesma quantidade de solução obtida.
7. Vortexar vigorosamente e incubar por 15 minutos a -20°C. Neste ponto, o procedimento pode ser interrompido por até 24 horas, desde que as amostras sejam mantidas nesta temperatura.
8. Centrifugar a 13.000g a 4°C por 5 minutos. Após este processo, pode ser possível visualizar o pellet de RNA.
9. Desprezar o sobrenadante em descarte comum, com o cuidado de não descartar o pellet, e ressuspender com 0.5mL de etanol absoluto, gelado preferencialmente. Vortexar vigorosamente.
10. Centrifugar a 13.000g a 4°C por 15 minutos. OBS.: Os passos 9 e 10 devem ser repetidos até a obtenção de um pellet branco ou preferencialmente transparente. No caso do órgão utilizado ser um fígado, pode-se precisar de até 6 repetições destes passos.
11. Desprezar o sobrenadante em descarte comum e deixar os tubos secando invertidos sobre papel filtro ou toalha dentro da capela do fluxo laminar até o máximo de 10 minutos. Após este tempo, provavelmente o pellet não se dissolverá mais.
12. Ressuspender o pellet em 100µL de água Milli-Q[®] estéril.
13. Estocar a -80°C até o momento de uso

ATENÇÃO: Durante todo o procedimento, os tubos são mantidos em gelo picado. Salvo quando indicado, o descarte de qualquer material deve ser feito em um recipiente especialmente destinado ao descarte de fenólicos.