

51. Extração de RNA (Trizol)

1. Pode ser realizada a extração de RNA a partir de soluções, tecidos, monocamadas de células, sangue e suabes.
2. O ideal é utilizar 100-150mg de tecido, *pellet* de células a partir de garrafa T25, e 330 μ L de soluções, sangue e suabe, para 1ml de Trizol Reagent.
3. Os tecidos devem ser previamente macerados com bisturi, com materiais livres de RNase e DNase.
4. Ressuspender o material com auxílio da pipeta;
5. Incube durante 5 minutos em temperatura ambiente;
6. Acrescentar 200 μ L de clorofórmio;
7. Agite vigorosamente o tubo por 15 segundos;
8. Incubar por 3 minutos em temperatura ambiente;
9. Centrifugar durante 15 minutos a 14.000 rpm (ou 12000xg) à 4°C;
10. Remover fase aquosa (superior e translúcida) e transferir para outro tubo (RNase free); +/- 600 μ L
11. Adicionar 500 μ L álcool isopropílico;
12. Incubar por 10 minutos em temperatura ambiente;
13. Centrifugar por 10 minutos a 14.000 rpm (ou 12000xg) à 4°C;
14. Descartar o sobrenadante com cuidado para não tocar no *pellet* (às vezes pode ficar gelatinoso);
15. Adicione 500 μ L de etanol 75% para lavar o *pellet* e centrifugue 7500xg por 5 minutos;
16. Remova o etanol por inversão, e faça uma centrifugação rápida (1 min na máxima rotação), e retire a última gota com pipeta;
17. Secar à temperatura ambiente por 1 a 5 minutos;
18. Dissolver o *pellet* em 40 μ L de água DEPC, e aqueça a 65°C por 10min.
19. Está pronto para confecção de cDNA. Estocar a -80°C.