

Materiais

Isopor com gelo
Tubos eppendorf 1,5 ml, pipetas, tips;
Água DNase / RNase free;

Soluções

Solução 1:- Álcool 75%

Misturar em tubo falcon de 50 ml novo:
30 ml álcool Merck 100% (*exclusivo para Biomol*)
10 ml água DNase, RNase free

Procedimento

- 1- Ligar e ajustar centrífuga para temperatura de 4°C.
- 2- Homogeneizar as amostras com o auxílio de um seringa de insulina, que após o uso deve ser descartada em lixo de perfuro-cortantes.
- 3- Adicionar 200 µl de clorofórmio por tubo. Esse reagente deve ser pipetado uma primeira vez dentro do frasco, para em seguida ser adicionado ao tubo. Atenção para não pingar.
- 4- Homogeneizar os tubos, sacudindo-os durante 20 segundos.
- 5- Incubar por 3 minutos à temperatura ambiente.
- 6- Centrifugar por 15 minutos, à 12000 rpm (12000G), 4°C.
- 7- Retirar os tubos CUIDADOSAMENTE da centrífuga e transferir a fase contendo o RNA (fase superior, aproximadamente 400 µl) para um novo tubo. Deve se ter atenção para não ser pipetado também a fase intermediária de DNA (fase branca).
- 8- Adicionar 0,5 µl de glicogênio por tubo e em seguida 500 µl de isopropanol.
- 9- Homogeneizar os tubos por inversão.
- 10- Incubar por 10 minutos à temperatura ambiente.
- 11- Centrifugar por 10 minutos, à 12000 rpm, 4°C.
- 12- Checar pellets e descartar o sobrenadante.
- 13- Lavar o pellet com 1 mL de álcool 75%, mexendo o tubo por inversão a fim de soltá-lo.
- 14- Centrifugar por 5 minutos, à 9500 rpm (7500G), 4°C.

- 15- Repetir passos 13 e 14.
- 16- Retirar o álcool, utilizando primeiramente uma P1000 e em seguida uma P200.
- 17- Deixar os tubos secando, deitados, durante 5 minutos.
- 18- Quando o pellet estiver perdendo a coloração branca (aproximadamente após os 5 minutos), ressuspender em 20 µl de água RNase free.
- 19- Pipetar a solução para cima e para baixo por volta de 20 vezes.
- 20- Incubar a 55°C durante 5 minutos.
- 21- Pôr as amostras no gelo e caso não for utilizar imediatamente, congelar.

Reagentes	Fonte
Clorofórmio (CHCl ₃) # 1.02445.1000	Merck
Isopropanol # 066K3712	Sigma
Glicogênio # 9510	Ambion
Água RNase free # 10977	Promega
Etanol # 1.00983.1000	Merck
Trizol # 15596-018	Invitrogen