

Materiais

Isopor com gelo
Etano 70 % (com água RNase-free)
Tubos eppendorf 1,5 ml e tips RNase-free;
Pipetas
Seringas de insulina
Pinças

Procedimento

1- Ligar e ajustar centrífuga para temperatura de 23°C.

2- Lavar tecido ou células com PBS gelado;

3- Retirar ao máximo o PBS

4 - Adicionar 10 µ de Beta-Mercapto para 1 ml de RLT

5- Adicionar 600 µl da solução RLT + B-Me

6 - Remover os cristais das amostras

7 - Lisar mecanicamente com auxílio do tip da P1000, pipetando para cima e para baixo 10 vezes;

No caso de células transferir p/ eppendorf de 1,5 ml

8 - Centrifugar na bancada por 2 minutos

9 - Com o auxílio de uma seringa de insulina (agulha 29G), homogeneizar o lisado, succionando e retornando lentamente todo o conteúdo para o eppendorf 5 vezes; em seguida, repetir o processo com a seringa mais fina

Descartar seringa/agulha em lixo de perfuro-cortantes.

9b - No caso de amostras de tecido, centrifugar por 3 minutos na velocidade máxima e transferir o sobrenadante para tubo novo;

10 - Adicionar 600 microlitros de etanol 70% e misturar pipetando para cima e para baixo 5 vezes, imediatamente

11 - Identificar as colunas rosas do Kit;

12 - Transferir 700 µl da mistura RLT/etanol;

Eventuais precipitados também devem ser transferidos

13- Centrifugar 10000 rpm (8000g) por 15 segundos e descartar o que passou pela coluna;

14 - Adicionar os 700 µl restantes da mistura RLT/etanol e repetir passo 13;

15- Adicionar a coluna 700 µl do tampão RW1, centrifugar 10000 rpm por 15 segundos, descartar o que passou pela coluna e trocar o tubo de descarte

Cuidado ao retirar da centrífuga para a solução não encostar na coluna.

16- Adicionar 500 µl do tampão RPE e centrifugar 10000 rpm por 15 segundos e descartar o que passou pela coluna;

17- Adicionar 500 µl do tampão RPE e centrifugar 10000 rpm por 2 minutos e descartar o que passou pela coluna e o tubo de 2 ml (sem tampa);

Cuidado ao retirar da centrífuga para a solução não encostar na coluna.

18 - Colocar coluna rosa em novo tubo de 2ml e centrifugar na velocidade máxima por 1 minuto;

19 - Descartar tubo de 2 ml (sem tampa);

20- Colocar coluna rosa em tubo de 1,5 ml (com tampa/ do kit) e adicionar 50 µl de água RNase-free do próprio kit e centrifugar a 10000 rpm por 1 minuto; deixar em contato com a água por 5 min antes de centrifugar

20- Adicionar mais 50 µl de água RNase-free do próprio kit e centrifugar a 10000 rpm por 1 minuto;

21- Deixar os tubos no gelo e proceder para tratamento com DNase (Kit Ambion)

22- Caso não for realizar tratamento com DNase imediatamente, congelar amostras no freezer - 80°C.

Reagentes	Fonte
Etanol #1.00983.1000	Merck
Seringa Insulina # 328327	BD
Kit #74104	Qiagen