

Materiais

Isopor com gelo
Tubos eppendorf 1,5 ml e tips RNase-free;
Pipetas
Banho-Maria a 37°C

Procedimento

- 1- Descongelar todos os reagentes do kit no gelo;
- 2- Misturar 20 µl de RNA, 2,5 µl de 10 X DNase Buffer, 0,5 µl de rDNase e 2 µl de água RNase-free;
- 3- Incubar a 37 ° C por 20 minutos, vortexar e baixar na centrífuga comum;
- 4- Adicionar 2,5 µl do “DNase Inactivation Reagent”,
- 5- Misturar pipetando 5 vezes;
- 6- Incubar por 2 minutos a temperatura ambiente;
- 7- Centrifugar amostras a 11000 rpm (10000g) por 2 minutos a 4° C;
- 8- Identificar eppendorfs de 1,5 ml RNase-free novos e **mantê-los no gelo**;
- 9- Transferir parte de cima para tubo novo correspondente.
Cuidado para não encostar no precipitado branco. Caso encoste, repita passos 8 e 9.

Procedimento p/ Eletroforese do RNA (Reservar ChemiDoc para o horário da foto)

- 1- Fazer gel de agarose Hipoclorito;
50 ml TAE 1x;
0,5 g de agarose
600 µl de água sanitária 5%
(Levar ao microondas por 1 min)
0,5 µl de UNISAFE
Usar pente estreito grosso
- 2- Qdo estiver tudo pronto para correr o gel, misturar:
 - 2 µl de RNA;
 - 3 µl de tampão de amostra 6X;
 - 13 µl de água RNase-free.
- 3- Aplicar amostras e DNA ladder 1Kb;

OBS: DNA corre do preto (-) para o vermelho (+)
- 14- Conectar fios da cuba e da fonte;

OBS: DNA corre do preto (-) para o vermelho (+)
- 4- Correr amostras:
150 mA na cuba grande
80 mA cuba pequena
- Verificar que bolhas estão sendo formadas junto aos fios da cuba e que DNA está correndo na direção correta;
- Desligar fonte quando o “front” (amarelo) do gel chegar ao lado oposto (antes do gel seguinte);
- Checar resultado em transiluminador de UV.

Reagentes	Fonte
DNase kit # AM1906	Ambion