

Extração de mRNA total de amostras (MÉTODO DE EXTRAÇÃO POR ISOTIOCIANATO DE GUANIDINA E FENOL- CLOROFÓRMIO)

1. SOLUÇÕES

A) Tampão de Lise

	[]	p/ 1L (Milli-Q® q.s.p.)
Citrato de Sódio	42mM	12.35 g
N-lauroyl sarcosine	0.83%	2.435 g
β-mercaptanoetanol	0.2mM	140 μL

B) Solução Isotiocianato de Guanidina

	[]	p/ 1L (Milli-Q® q.s.p.)
Isotiocianato de Guanidina	6M	708.96 g
Acetato de Potássio	2M	196.28 g

Forma Precipitado; aquecer a 65°C antes de misturar à Solução A

C) Tampão Denaturante

33mL Solução A + 35.27mL Solução B

Aquecer a 65°C para a dissolução eficiente dos compostos.
Manter a 4°C.

D) Solução de Acetato de Sódio 2M pH 4.0

196,28g de NaAc
+
1000 mL água deionizada q.s.p.

Corrigir o pH para 4.0 em temperatura ambiente, com HCl concentrado.
Manter a 4°C

I) Isolamento a partir de amostras de tecidos sólidos

1. Num tubo estéril de 50mL em banho de gelo por no mínimo 5 minutos, pipetar 12mL do Tampão Denaturante (C) pré-resfriado a 4°C para cada grama de tecido utilizado.
2. Homogeneizar a amostra com um bastão de vidro estéril.
3. Homogeneizar por inversão
4. Realizar o protocolo de extração

II) Isolamento a partir de suspensões celulares

1. Num tubo de 50mL estéril, pipetar 1×10^8 células. Centrifugar a 300xg por 5 minutos a 4°C.
2. Desprezar o sobrenadante e ressuspender o *pellet* com 25mL de PBS (ou solução fisiológica) estéril gelado (4°C). Centrifugar como descrito.
3. Desprezar o sobrenadante e adicionar 15mL do Tampão Denaturante (C) pré-resfriado a 4°C. Homogeneizar por inversão e vortexar por 15 segundos.
4. Realizar o protocolo de extração.

PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO

1. Adicionar 1,2mL de Acetato de Sódio 2M pH 4.0 a 4°C. Agitar vigorosamente por inversão.
2. Adicionar a cada tubo 12mL de Fenol-Clorofórmio a 4°C. Homogeneizar por inversão e vortexar por 10 segundos. Deixar em banho de gelo por 15 minutos.
3. Transferir a mistura a outro tubo de 50mL e centrifugar a 10.000xg por 20 minutos a 4°C.
4. **Remover cuidadosamente a fase superior da solução e transferi-la para outro tubo de 50mL.**

PRECIPITAÇÃO DO RNA EXTRAÍDO

1. Adicionar Isopropanol a 4°C na proporção 1:1 (v/v). Incubar a -20°C por 15 minutos. Para resultados otimizados, a precipitação pode seguir *overnight*.
2. Centrifugar por 10.000xg por 15 minutos a 4°C.
3. Remover o sobrenadante e ressuspender o *pellet* em 10mL de Etanol 75% gelado (4°C). Dependendo da coloração do *pellet*, que deve variar do branco ao incolor, este passo deve ser realizado. Por exemplo, *pellets* amarelados indicam presença de restos celulares, que devem ser removidos por essa precipitação com Etanol 75%.
4. Secar os tubos invertidos sobre papel absorvente em fluxo laminar por no máximo 10 minutos.

5. Ressuspender o material em 1mL de água deionizada estéril a 4°C e armazenar a -20°C. Para estocagem por longos períodos, recomenda-se a dissolução do *pellet* em Acetato de Sódio 0.25M, pH 5.0 e adicionar 2.5 volumes de Etanol absoluto. Manter a -70°C.

APÊNDICE:

Água *RNAse Free* (DEPC treated)

Adicionar Dietil-piromcarbonato (DEPC) aos poucos em água deionizada estéril até a concentração de 0.1%. Incubar em capela *overnight*. Tampar adequadamente e autoclavar por 20 minutos. A solução pode ser usada como substituto para a água deionizada comum, como forma de inibir a ação de RNAses.

Para o tratamento de tubos e ponteiros, é necessário mergulhá-los na solução de DEPC a 0.05% *overnight*. Após isso, escorrer o líquido e autoclavar por 20 minutos.