



REACTIVO RNAGET

El reactivo RNAget es una solución para la purificación de RNA en un solo paso. Este reactivo está basado en el método de P. Chonczynski y N. Sacchi (Anal. Biochem. 1987, 162:156-159), que emplea detergentes, agentes reductores y tiocianato de guanidina, para disgregar y solubilizar eficientemente macromoléculas orgánicas, y fenol ácido, que atrapa el ADN y proteínas en la fase orgánica. Este reactivo es la formulación más ampliamente usado en la obtención de RNA de una forma rápida y económica.

PROCEDIMIENTO PARA LA PURIFICACIÓN DE RNA CON EL REACTIVO RNAGET

1. A la muestra de tejido¹ (0.5 gr) o líquido (500ul) agregar 1 ml de **RNAGET** homogenizar vigorosamente (vortex) por 15 segundos.
2. Adicionar 200 µl de cloroformo, agitar vigorosamente por 15 segundos (vortex).
3. Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.
4. Centrifugar a 10,000 g por 15 min a 4°C.
5. Recuperar la fase acuosa² en un tubo eppendorf de 1.5 ml y adicionar 10 µg de glicógeno³ (opcional), mezclar.
6. Adicionar 1 volumen de isopropanol absoluto frío, homogenizar por inversión.
7. Incubar a -20°C por una hora (opcional).
8. Centrifugar 10,000 g por 10 min a 4°C.
9. Decantar y adicionar a la pastilla 500 µl de etanol al 75% en H₂O DEPC⁴, mezclar.
10. Centrifugar 10,000 g por 5 min a 4°C.
11. Decantar cuidadosamente y secar la pastilla al vacío a temperatura ambiente.
12. Resuspender la pastilla en H₂O DEPC (aprox. 25 ul)
13. Almacenar a -70°C.

MATERIAL REQUERIDO:

Etanol al 75% en H₂O DEPC, H₂O DEPC; cloroformo: alcohol isoamílico (24:1); isopropanol.

NOTAS:

- ¹.- Se recomienda que el tejido se pulverice triturándolo en nitrógeno líquido.
- ².- Si accidentalmente en el paso 5 arrastra restos de la fase orgánica o de la interfase, es conveniente realizar una extracción con un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Mezclar con vortex y centrifugar bajo las mismas condiciones. Recuperar nuevamente la fase acuosa y continuar con el paso 6.
- ³.- La adición de glicógeno mejora la recuperación de pequeñas cantidades de RNA. El glicógeno deberá estar estéril y libre de RNAsas. Se recomienda preparar una solución stock a 10mg/ml.
- ⁴.- El H₂O DEPC es dietilpirocarbonato al 0.1% v/v en H₂O bidestilada. Se agrega el DEPC al H₂O, agitar por 30 minutos y después esterilizar.

ADVERTENCIAS DE SEGURIDAD

SUSTANCIA PELIGROSA. Contiene fenol e isotiocianato de guanidina. Corrosivo, tóxico por inhalación, ingestión o contacto. Causa quemaduras graves. La exposición prolongada a los vapores es peligrosa. Evite el contacto en piel y ojos. En caso de contacto a ojos, lave inmediatamente con mucha agua y busque atención médica. Si hay contacto en piel, lave con agua abundante. Use equipo de protección adecuado: bata, guantes y protección de cara y ojos. En caso de accidente y no sentirse bien, busque atención médica. Manipular en una campana de extracción o en lugares ventilados. Deseche los residuos de forma apropiada.