REACTIVO RNAGET

RP-200 RNAget - 200ml. Reactivo para purificar RNA. **Almacenar a 4°C**

DESCRIPCIÓN

El reactivo **RNAget** es una solución utilizada en la purificación de RNA en un solo paso. Está basado en el método de Chomczynski P. y Sacchi N. (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; siendo la formulación más ampliamente usada en la obtención de RNA de una forma rápida y económica. Este reactivo es de **color amarillo** (debido a un antioxidante), lo que facilita su monitoreo durante el proceso de purificación.

PROCEDIMIENTO PARA LA PURIFICACIÓN DE RNA CON RNAGET

1. Homogenizar la muestra: tejido sólido[1] (200 mg), líquido o suspensión celular (500 µl), con 1 ml de **RNAGET** y mezclar vigorosamente (vortex) por 15 seg. Incubar a temperatura ambiente por 5 min.

2. Adicionar 0.2 ml de cloroformo, agitar vigorosamente por 15 seg (vortex). Incubar a temperatura ambiente por 3 min.

3. Centrifugar a 12,000 g por 15 min a 4°C.

4. Recuperar cuidadosamente la fase acuosa[2] (incolora) en un microtubo de 1.5 ml. Se recomienda adicionar 10 µg de glicógeno libre de RNAsas[3], para mejorar el nivel de recuperación del RNA, mezclar por inversión vigorosa y continuar directamente con el paso 5.

5. Adicionar 1 volumen de alcohol isopropílico absoluto, homogenizar por inversión. Incubar por 10 min.

6. Centrifugar a 12,000 g por 10 min a 4ºC (En ocasiones el RNA puede observarse como una pastilla al fondo del tubo).

7. Descartar el sobrenadante por decantación y adicionar a la pastilla de RNA 1 ml de etanol al 75% en H_2O libre RNAsas[4], mezclar vigorosamente (vortex).

8. Centrifugar a 10,500 g por 5-10 min a 4ºC.

9. Eliminar el sobrenadante por decantación y secar la pastilla a temperatura ambiente por 5-10 minutos.

10. Adicionar 25-50 µl de H_2O libre de RNAsas. Incubar a 55°C por 10 min. Resuspender pipeteando cuidadosamente la pastilla de RNA. Almacenar a -70°C

NOTAS:

[1] - Se recomienda que el tejido solido sea previamente pulverizado triturándolo en nitrógeno líquido o con ayuda de un homogeneizador.

[2] - Si accidentalmente en el paso 4 se arrastran 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 5.

[3] - La adición de glicógeno libre de RNAsas mejora la recuperación de pequeñas cantidades de RNA. Se recomienda utilizar una solución stock a 10mg/ml.

[4] - El agua libre de RNAsas puede prepararse adicionando dietilpirocarbonato (DEPC) 0.1% v/v en agua destilada (1 ml DEPC por cada 1L de agua), mezclando en agitador magnético por 2h y posteriormente esterilizar por autoclave. Enfriar a temperatura ambiente antes de su uso.

MATERIAL REQUERIDO - NO PROPORCIONADO:

Cloroformo.
Glicógeno libre de RNAsas.
H_20 libre de RNAsas.
Alcohol isopropílico (Isopropanol).
Etanol al 75% en agua libre RNAsas.

ADVERTENCIAS DE SEGURIDAD

SUSTANCIA PELIGROSA. Contiene fenol y tiocianato 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.