

Uso exclusivo para pesquisa.

Reagente TRIpure, extração de RNA Total

Catálogo	Especificação	Armazenamento/Validade
CV-T013-100	100 ml	4°C por 1 ano
CV-T013-250	250 ml	4°C por 1 ano

Introdução

O reagente TRIpure para extração de RNA Total é um reagente para extração de RNA total de diversos tecidos/células animais, vegetais e bacterianas. Possui forte capacidade de clivagem, sendo capaz de lisar amostras de células e tecidos rapidamente, mantendo o RNA intacto na amostra e inibindo efetivamente sua degradação. A amostra pode ser totalmente clivada no reagente. Após a centrifugação com clorofórmio, a solução forma uma camada de sobrenadante, uma camada intermediária e uma camada orgânica (camada vermelha inferior). O RNA é distribuído na fase aquosa superior, e a camada de sobrenadante é coletada. O RNA total pode ser recuperado por precipitação com propanol. O RNA total extraído é de alta pureza e não contém proteínas ou DNA genômico. Ele pode ser usado diretamente para Northern blotting, hibridização, purificação de mRNA, RT-PCR, seleção de poly(A)⁺, análise de proteção de RNase e construção de bibliotecas de cDNA, além de uma variedade de experimentos de biologia molecular.

Além disso, após a remoção da camada aquosa, o DNA e as proteínas na amostra também podem ser sucessivamente precipitados. A precipitação com etanol pode precipitar o DNA da camada intermediária, e o isopropanol pode ser adicionado à camada orgânica para precipitar a proteína.

Este produto é simples e rápido de operar, com todas as etapas sendo concluídas em uma hora. Funciona eficazmente em pequenas quantidades de tecido (50-100 mg) e células (5×10^6) e em grandes quantidades de tecidos (≥ 1 g) e células ($> 10^7$).

I. Preparação antes do uso

1. Você precisará de clorofórmio, álcool isopropílico, etanol 75% e água DEPC.
2. Usar luvas descartáveis; operar em uma área limpa separada; evitar falar durante a operação para evitar a contaminação da RNase do suor e da saliva do experimentador.
- 3) Usar equipamentos livres de RNase, incluindo a ponteiros e o tubos de centrífuga. Instrumentos e reagentes para experimentos de RNA devem ser usados exclusivamente e não devem ser usados em outros experimentos.
- 4) Este produto contém fenol, que é tóxico e corrosivo. Se inalado, em contato com a pele, engolido, etc., pode causar envenenamento, queimaduras e outros danos corporais. Use equipamentos de proteção, como roupas de proteção, luvas, máscaras para os olhos, máscaras faciais, etc. ao usar este produto. Se você acidentalmente entrar em contato com os olhos, lave imediatamente com bastante água e vá ao hospital para tratamento;
- 5) Após a amostra ser homogeneizada com TRIpure, se não for imediatamente adicionada ao clorofórmio para experimentos posteriores, ela pode ser congelada a -70 °C por mais de um mês. O precipitado de RNA armazenado em etanol a 75% f armazenado a 4 °C por 1 semana e armazenado a -20 °C por 1 ano.
- 6) A meia-vida do RNA é relativamente curta e fácil de degradar. Recomenda-se realizar experimentos subsequentes o mais rápido possível após a extração.

Tabela 1 - A quantidade máxima da amostra que pode ser totalmente lisada por 1 ml do reagente TRIpure

Tipo de amostra	Quantidade*
Células aderentes	10 cm ² de área de cultura
Células animais ou vegetais suspensos ou células de levedura	5 × 10 ⁶ -1 × 10 ⁷
Bactérias	10 ⁷
Sangue total	50 μ l
Tecido animal	30-100 mg
Tecido vegetal (baixo teor de polissacarídeos e polifenóis)	50-100 mg

*O volume excessivo da amostra pode resultar em lise insuficiente e diminuição da pureza do produto.

Passos operacionais

1. Processamento da Amostra

1.1 Homogeneização da Amostra

○ Células aderentes

- Descarte o máximo possível do meio de cultura e adicione 1 ml de TRIpure diretamente em uma placa de 3,5 cm de diâmetro. Pipete o lisado várias vezes para cima e para baixo. Determine a quantidade de TRIpure necessária (1 ml por 10 cm²) com base na área da placa, em vez do número de células. Quando a quantidade de TRIpure adicionada for insuficiente, o RNA extraído pode estar contaminado com DNA. As células aderentes cultivadas frequentemente não se destacam completamente do frasco (ou placa) de cultura. Isso não significa que a lise esteja incompleta. Nessa fase, a membrana celular já foi completamente rompida, o RNA foi liberado e os experimentos subsequentes podem continuar.

○ Células suspensas

- Coletar as células por centrifugação, adicionar 1 ml de TRIpure para cada 5 x 10⁶ - 1 x 10⁷ células e pipetar repetidamente até que não haja grânulos visíveis. Evite lavar as células antes de adicionar TRIpure, pois isso pode aumentar a possibilidade de degradação do mRNA. Para quebrar certas leveduras e bactérias, pode ser necessário o uso de um homogeneizador.

○ Tecidos animais/vegetais

- Tecidos vegetais frescos ou tecidos congelados a -70°C devem ser moídos completamente em nitrogênio líquido, e a quantidade apropriada de TRIpure deve ser adicionada.

De acordo com a **Tabela 1**, pegue o máximo possível de tecido animal ou vegetal fresco, adicione a quantidade adequada de TRIpure e faça a homogeneização.

O volume da amostra geralmente não deve exceder 10% do volume de TRIpure.

1.2. Agite vigorosamente a amostra homogeneizada e coloque-a no gelo por 5 minutos para dissociar completamente o ribossomo.

1.3. (Opcional) Centrifugue a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C e remova o sobrenadante.

Se a amostra contiver mais proteínas, gordura, polissacarídeos ou músculos, os nódulos tuberosos da planta podem ser removidos por centrifugação. O precipitado após a centrifugação contém membranas extracelulares, polissacarídeos e DNA de alto peso molecular, e o sobrenadante contém RNA. Ao processar amostras de tecido adiposo, a camada superior, que contém uma grande quantidade de óleo, deve ser removida tanto quanto possível, e um homogeneizado claro deve ser usado para os experimentos subsequentes.

2. Extração do RNA total

2.1. Adicione 300 µl de clorofórmio ao lisado mencionado acima. Feche bem a tampa do tubo, agite vigorosamente por 15 segundos e deixe repousar por 2-3 minutos à temperatura ambiente.

2.2. Centrifugue a 12.000 rpm por 4-15 minutos a 10°C.

Após a centrifugação, a mistura se divide em três camadas: uma camada superior incolor semelhante a água, uma camada intermediária e uma camada inferior de fenol vermelho orgânico/clorofórmio. O RNA está presente na camada superior incolor.

A capacidade desta parte é cerca de 50-60% do volume total de TRIpure adicionado. Se extraído com 1 ml de TRIpure, a camada superior terá aproximadamente 500-600 µl. Recomenda-se aspirar 400-500 µl, evitando aspirar demais para prevenir a absorção da camada intermediária, o que pode levar à contaminação genômica.

O fenol vermelho orgânico/clorofórmio e a camada intermediária contêm proteínas e DNA. Se necessário, mantenha essas camadas para realizar experimentos de purificação relevantes.

2.3. Pipete cuidadosamente a camada superior para um novo tubo de centrifugação e adicione um volume igual de isopropanol. Deixe a mistura em -20°C por 20 minutos após inverter e misturar. (A precipitação do RNA geralmente não é visível antes da centrifugação. Quando a quantidade de extração é grande, um precipitado gelatinoso se forma na lateral e no fundo do tubo após a centrifugação.)

2.4. Centrifugue a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C.

2.5. Descarte cuidadosamente o sobrenadante e adicione 1 ml de etanol a 75% em água DEPC. Lave a tampa do tubo e as paredes do tubo completamente e agite o fundo do tubo para suspender o sedimento. O *pellet* deve ser lavado com 1 ml de etanol a 75% para cada 1 ml de TRIpure.

2.6. Centrifugue a 12.000 rpm por 5 minutos, à temperatura ambiente ou a 4°C. Descarte o sobrenadante, tomando cuidado para não perder a precipitação de RNA.

A pequena quantidade de líquido restante pode ser centrifugada brevemente e depois aspirada com uma pipeta, tomando cuidado para não abandonar o sedimento.

2.7. Deixe o tubo à temperatura ambiente por 2-3 minutos para secar. Adicione 30-100 µl de água livre de RNase (água DEPC). Após a dissolução completa, retire uma pequena quantidade para teste e armazene a -70°C.

Teste de integridade do RNA

Adicione 1 µl de RNA ao buffer de carregamento de DNA 10× apropriado e misture.

Realize a eletroforese em gel de agarose a 1%. Se forem visíveis três bandas claras, isso indica que a integridade do RNA está boa.

Na eletroforese em gel de agarose comum, a posição da banda de 28S é cerca de 2 kb, e a posição da banda de 18S é cerca de 1 kb. A posição das bandas no gel pode variar bastante com diferentes concentrações.

Teste de pureza do RNA

Meça o valor de OD a 260 nm e 280 nm e calcule a razão OD₂₆₀/OD₂₈₀. A razão para RNA puro deve estar entre 1,9 e 2,2.