

## EXTRACCION DE RNA TOTAL USANDO TRIZOL+SDS

**Adaptado de:** Wang *et al.*, 2012. Isolation of High Quality RNA from Cereal Seeds Containing High Levels of Starch. *Phytochem Anal* **23**: 159–163 (2012)

1. Moler muestra en Nitrógeno líquido con mortero previamente enfriado.
  2. Disponer alícuotas de muestra en eppendorf (aprox. 200 mg).
  3. A cada 200 mg de muestra se le añaden 500 µL de **tampón de extracción de RNA** (Tris-HCl + β-mercaptoetanol) en tubos eppendorf libres de RNasa de 1.5 mL.
  4. Mezclar a fondo con vórtex.
  5. Incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
  6. Añadir 25 µL de **SDS** al 20%, invertir suavemente unas 5-8 veces.
  7. Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
  8. Centrifugar la mezcla a 12000 rpm durante 10 min a 4°C.
  9. Se transfiere la fase acuosa a un tubo nuevo, y se añade 1 mL de **TRIZOL**.
  10. Se mezcla a fondo usando vórtex durante 10 minutos.
  11. Centrifugar 12000 rpm durante 10 min a 4°C en una centrífuga refrigerada.
  12. Pasar el sobrenadante a un nuevo eppendorf.
  13. Agregar 200 µL de **cloroformo: isoamílico** (24:1).
  14. Vórtex bajo por 2 min.
  15. Incubar a T<sup>a</sup> ambiente 2-3 minutos.
  16. Centrifugar a 12000 rpm durante 15 min a 4°C.
  17. Recuperar el sobrenadante a nuevos tubos.
- \* Repetir los pasos: 13-17 las veces que sean necesarias para eliminar la interfase.
18. Agregar 200 µL de **cloroformo**.
  19. Vórtex bajo 2-3 min.
  20. Centrifugar 12000 rpm durante 15 min.
  21. Recuperar la fase acuosa a nuevos tubos.
  22. Agregar 250 µL de **isopropanol** y 250 µL de una **solución salina concentrada** (Citrato de sodio 0.8M y NaCl 1.2 M)
  23. Mezclar por inversión e incubar a T<sup>a</sup> ambiente por 10 min.
  24. Centrifugar 12000 rpm durante 10 min.
  25. Tirar el sobrenadante y lavar la pastilla con 1 mL de **etanol 70%** (en DEPC).
  26. Vórtex bajo durante 30 seg.

27. Centrifugar a 7500 rpm durante 5 min.
28. Tirar el sobrenadante y lavar la pastilla con 1 mL de **etanol 75%** (en DEPC).
29. Vórtex bajo durante 30 seg.
30. Centrifugar a 7500 rpm durante 5 min.
31. Tirar el sobrenadante y secar la pastilla a T<sup>a</sup> ambiente.
32. Resuspender en 50 µL de H<sub>2</sub>O DEPC (El agua DEPC puede calentarse previamente a 55° C durante 10 min para que se resuspenda totalmente la pastilla)
33. Cuantificar en Nanodrop (A260/A280 y A260/A230).
34. Verificar calidad en gel DESNATURALIZANTE de agarosa al 1.2 %.

**Gel analítico (100 mL):**

- Agua DEPC (25 mL)
- Agarosa 1.2% (1.2 g)
- MOPS 1X (10 mL MOPS 10X)
- 15 mL de Formaldehído.

**Buffer de corrida:** MOPS 1X

**Buffer de carga:**

- |                |   |
|----------------|---|
| - Colorantes   | 4 µL  |
| - Formamida    | 6.25 µL                                     |
| - MOPS 10X     | 1.25 µL                                     |
| - Formaldehído | 2.0 µL                                      |
| - EtBr         | 0.5 µL                                      |
|                | <b>Total: 14 µL</b>                         |
| - RNA muestra  | 2-5 µL                                      |
| - Agua DEPC    | Hasta completar <b>volumen final: 25 µL</b> |

Calentar 5 min a 65°. Enfriar en hielo 3 minutos y cargar en el gel.

**SOLUCIONES:**

**Tampón de Extracción de RNA:** 100mM Tris-HCl (pH 8.0), añadir 2% β-mercaptoetanol (v/v) justo antes del uso (preparado con agua DEPC autoclavada), almacenado a temperatura ambiente.

**SDS 20%:** (dodecilsulfato sódico) (w/v), añadir DEPC al 0.1%, **autoclavar** y almacenar a temperatura ambiente. No almacenar a 4°C, puede precipitar el SDS.