

B. PROTOCOLO REACTIVO TRIZOL®

- Centrifugar la muestra y retirar el sobrenadante. Añadir 1ml de TRIzol por cada $5-10 \times 10^7$ células y pipetear la muestra.
- Incubar la muestra homogenizada por 5 minutos a temperatura ambiente para permitir una disociación completa de los complejos nucleoprotéicos. Añadir 0.2ml de cloroformo por cada 1ml de TRIzol. Agitar los tubos vigorosamente por 15 segundos e incubarlos a temperatura ambiente por 2 a 3 minutos. Centrifugar las muestras a no más de 12,000xg durante 15 minutos a 4°C. Después de centrifugar la mezcla se separa en dos fases, el RNA se encuentra en la fase superior.
- Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo. Precipitar el RNA de la fase acuosa mezclándolo con isopropil alcohol. Usar 0.5ml por cada 1ml de TRIzol usado en la homogenización inicial. Incubar las muestras a temperatura ambiente por 10 minutos y centrifugar a no más de 12,000xg durante 10 minutos a 4°C. El precipitado de RNA, generalmente invisible, forma una pastilla en la base del tubo.
- Remover el supernadante. Lavar la pastilla de RNA con etanol al 75%, añadiendo al menos 1ml por cada 1ml de TRIzol utilizado. Mezclar la muestra en el vortex y centrifugar a no más de 7,500xg por 5 minutos a 4°C.
- Secar brevemente la pastilla de RNA (al aire por 5-10 minutos). Disolver parcialmente las muestras de RNA en agua libre de rnasas. Conservar la muestra a -70°C.

