

C. PROTOCOLO RNEASY®

- Centrifugar el cultivo a 5,000xg durante 5 minutos a 4°C. Decantar el supernadante y remover el medio restante cuidadosamente mediante aspiración.
- Desprender la pastilla de bacterias golpeando ligeramente el fondo del tubo. Resuspender en 100µl de buffer RE con lisozima y mezclar en el vortex. Incubar a temperatura ambiente durante 3-5 minutos.
- Añadir 350µl del buffer RLT a la muestra. Mezclar vigorosamente con el vortex. Si se observa material insoluble centrifugar por 2 minutos a velocidad máxima y utilizar únicamente el supernadante para pasos subsecuentes.
- Añadir 250µl de etanol al lisado, pipetear la mezcla y NO centrifugar.
- Aplicar la muestra a una minicolumna RNeasy con un tubo de recolección de 2ml. Centrifugar a 8,000 xg durante 15 segundos. Tirar el residuo del tubo recolector.
- Añadir 700µl del buffer RW1 a la columna y centrifugar por 15 segundos a 8,000xg para lavar la columna. Cambiar a un tubo de recolección nuevo.
- Pipetear 500µl de buffer RPE a la columna y centrifugar durante 15 segundos a 8,000xg para lavar la columna. Quitar los residuos del tubo recolector.
- Agregar otros 500µl del buffer RPE a la columna. Centrifugar por 2 minutos a 8000xg para segar la membrana RNeasy.
- Transferir la columna a un tubo de recolección (1.5ml) nuevo. Pipetear de 30 a 50µl de agua libre de RNasas directamente en la membrana de la columna. Centrifugar por 1 minuto a 8000xg para eluir.

- Guardar la muestra a -71°C .