

| | | |
|---|---|---|
|  | MANUAL – BIOLOGIA MOLECULAR |  |
| Data: 01/07/2018 Próxima revisão: 01/07/2019 | LABORATÓRIO DE METABOLISMO E LÍPIDES | Nº: 05 Versão: 04 Página 1 |

EXTRAÇÃO DE RNA PELO MÉTODO DO TRIZOL

Introdução

O produto comercial TRIZOL (Invitrogen) consiste num reagente pronto para o uso no isolamento de RNA total de células e tecidos. O reagente consiste numa solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina, que deriva da melhoria do método de isolamento de RNA num único passo desenvolvido por Chomczynski & Sacchi (1987). Durante a homogenização ou lise da amostra, o TRIZOL mantém a integridade do RNA enquanto rompe as células e dissolve os componentes celulares. A adição do clorofórmio, seguido da centrifugação, separa a solução em fases aquosa e orgânica. O RNA permanece exclusivamente na fase aquosa. Depois da transferência da fase aquosa para um novo tubo, o RNA total é recuperado por precipitação com isopropanol. Depois da remoção de fase aquosa, o DNA e as proteínas da amostra ainda podem ser recuperados por precipitação sequencial. A precipitação com etanol resulta em DNA na interface e uma precipitação adicional com isopropanol produz proteínas a partir da fase orgânica. A co-purificação do DNA pode ser útil na normalização da produção de RNA entre amostras.

Essa técnica apresenta bons resultados com pequenas quantidades de tecido (50 a 100 mg de tecido) e células (5×10^6) ou até grande quantidades de tecidos (>1 g) e células ($>10^7$) de origem humana, animal, plantas ou bacteriana. O procedimento de extração pode ser realizado em menos de 1

| | |
|--|---|
| Elaborado por: Priscila Oliveira de Carvalho | Aprovado por: Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão |
| Revisado por: Carolina Graziani Vital | |

| | | |
|---|---|---|
|  | MANUAL – BIOLOGIA MOLECULAR |  |
| Data: 01/07/2018 Próxima revisão: 01/07/2019 | LABORATÓRIO DE METABOLISMO E LÍPIDES | Nº: 05 Versão: 04 Página 2 |

hora e um grande número de amostras podem ser preparadas. O RNA total produzido é livre de contaminações por DNA ou proteínas.

➤ **Cuidado ao manusear o Trizol. O *TRI Reagent Solution* (Invitrogen, Applied Biosystems) contém fenol e tiocianato de guanidina. Consultar a tabela FISPQ do produto antes de iniciar o procedimento.**

- ✓ ligar a máquina de gelo
- ✓ colocar luvas e máscara
- ✓ limpar a bancada com hipoclorito, álcool 70% e por fim, RNase away.
- ✓ pegar as pipetas específicas para o isolamento de RNA (limpá-las com uma gaze embebida em álcool 70% e deixá-las por 15 minutos no banho de UV no fluxo).
- ✓ pegar todo o material plástico a ser utilizado, estéril e autoclavado: ponteiros com filtro (específicas para RNA), microtubos autoclavados; gaze e reagentes também autoclavados ou específicos para RNA.
- ✓ **consulte a sessão Tratamento DNase/RNase-free com água DEPC**

Para cultura celular

Fase de Homogeneização

| | |
|--|---|
| Elaborado por: Priscila Oliveira de Carvalho | Aprovado por: Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão |
| Revisado por: Carolina Graziani Vital | |



MANUAL – BIOLOGIA MOLECULAR



Data: 01/07/2018

Próxima revisão:

01/07/2019

LABORATÓRIO DE METABOLISMO E LÍPIDES

Nº: 05

Versão: 04

Página 3

- **Células em monocamadas**

Adicione 1mL de Trizol por 10 cm² de área da placa de cultura. Use a área, e não o número de células, para determinar o volume de Trizol a ser utilizado.

- **Células em suspensão**

Adicione 1mL de Trizol ao pellet do lisado celular que deve conter em torno de 5-10 x 10⁶ células. Homogenize com a pipeta até o pellet se dissolver no

Trizol. Caso esteja difícil a homogeneização, usar o politron em velocidade mínima.

Para sangue periférico (Trizol LS)

Coleta e processamento

1. As amostras devem ser coletadas em tubo contendo anticoagulante, de preferência, o EDTA (homogeneizar bem, evitando a coagulação)
2. Colher 2 tubos de EDTA, totalizando 10mL de sangue periférico
3. Centrifugar os tubos EDTA a 3000 rpm por 10 minutos para a separação das células brancas (formação de uma nuvem na fase intermediária, interfase)
4. Recuperar as células brancas em um microtubo de 2,0mL (ou dividir em 2, se desejar). Com a pipeta de 1000uL, passar a ponteira em toda a borda da “nuvem” para desprender as células antes de aspirar (em torno de 300uL).
5. Adicionar 1mL do tampão de lise* no microtubo com as células brancas recuperadas
6. Centrifugar a 400xg por 10 minutos a temperatura ambiente

Elaborado por: Priscila Oliveira de Carvalho

Aprovado por:

Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão

Revisado por: Carolina Graziani Vital



MANUAL – BIOLOGIA MOLECULAR



Data: 01/07/2018

Próxima revisão:

01/07/2019

LABORATÓRIO DE METABOLISMO E LÍPIDES

Nº: 05

Versão: 04

Página 4

7. Descartar o sobrenadante e adicionar novamente 1mL de tampão de lise, ressuspendendo o pellet com cuidado, a fim de evitar a ruptura dos leucócitos
8. Centrifugar a 400xg por 10 minutos a temperatura ambiente
9. Se desejar, para ficar totalmente livre de células vermelhas, o pellet poderá ser lavado mais uma vez com o tampão de lise e novamente centrifugado como no item anterior
10. Ressuspender o pellet com tampão PBS ou água DEPC e adicionar 1mL de Trizol LS, homogeneizando bem com a pipeta
11. Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente e vortexar por 30 segundos
12. Neste momento as amostras podem ser estocadas a -80°C e proceder com o protocolo no futuro ou iniciar ou continuar o protocolo na *Fase de Separação*
13. Caso tenha retirado a amostra processada do freezer -80°C, deixar descongelar a temperatura ambiente

*Tampão de lise para isolamento de RNA de sangue periférico

NH₄Cl – 4,14g [155mM] P.M. = 53,49g

KHCO₃ – 0,5g [10mM] P.M. = 100,12g

EDTA 0,5M – 0,1mL [0,1mM] pH = 8,0

Ajustar o pH para 7,3 com HCl 1M

Ajustar volume para 500mL

Filtrar utilizando filtro 0,22µm ou autoclavar

Armazenar a 4°C por 6 meses.

Elaborado por: Priscila Oliveira de Carvalho

Aprovado por:

Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão

Revisado por: Carolina Graziani Vital

| | | |
|---|---|---|
|  | MANUAL – BIOLOGIA MOLECULAR |  |
| Data: 01/07/2018 Próxima revisão: 01/07/2019 | LABORATÓRIO DE METABOLISMO E LÍPIDES | Nº: 05 Versão: 04 Página 5 |

Para tecidos

Fase de Homogeneização

1. Montar o politron no suporte e encaixar a haste específica de RNA ou o suporte para hastes descartáveis, se for o caso.
2. Separar 6 tubos falcons estéreis com as seguintes soluções: 1- hipoclorito 1%; 2-NaOH 0,5M; 3-álcool 100%; 4-álcool 70%; 5-água milliQ; 6- água milliQ (esta última deve sempre ser tocada a cada amostra processada). Fazer uma lavagem prévia da(s) haste(s) passando por todas essas soluções (aproximadamente uns 15 seg em cada). Secar a haste delicadamente, de cima para baixo, com gaze autoclavada. E, em outra gaze limpa e estéril, embeber (pouca quantidade, solução faz espuma) com RNase away e passar na haste.
3. Separar e identificar (colocar o nome das suas amostras, tanto na tampa quanto no corpo) os microtubos de 2,0mL com 1mL de Trizol. Separar um microtubo a mais com 1mL de Trizol apenas para passar no politron antes de passar a amostra propriamente dita.
4. Assim, depois da haste estar limpa e seca, passar o microtubo de 2mL contendo apenas o Trizol para equilibrar a haste e daí passar o seu tecido com o Trizol.
5. O tecido deve ser retirado com uma pinça e/ou tesoura previamente limpa (da mesma maneira que as hastes) do microtubo em que está congelado ou em solução de RNAlater, colocado em uma gaze estéril e levemente picotado para ser adicionado no seu respectivo microtubo já com Trizol. O tecido deve

| | |
|--|---|
| Elaborado por: Priscila Oliveira de Carvalho | Aprovado por: Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão |
| Revisado por: Carolina Graziani Vital | |

| | | |
|---|---|---|
|  | MANUAL – BIOLOGIA MOLECULAR |  <small>CIÊNCIA E HUMANISMO</small> |
| Data: 01/07/2018 Próxima revisão: 01/07/2019 | LABORATÓRIO DE METABOLISMO E LÍPIDES | Nº: 05 Versão: 04 Página 6 |

pesar entre 50–100mg para cada 1mL de Trizol. Dessa maneira, o tecido está pronto para ser processado.

6. Se aumentar a quantidade de tecido, aumentar o volume de Trizol proporcionalmente. Ex: para 150mg de tecido usar 2mL de Trizol.

7. Macerar com o politron, aumentando a velocidade gradativamente, até o tecido ficar completamente diluído no Trizol; deve-se formar uma mistura homogênea. Deixar a amostra+Trizol em temperatura ambiente, depois de processada, por pelo menos meia hora antes de armazená-la a -80°C ou para dar seguimento ao protocolo.

8. Atentar para que nenhum pedaço de tecido fique contido na haste. Passar uma gaze já usada para tirar o excesso de resíduo da haste e iniciar as lavagens (vide item 2). Caso a haste utilizada seja a descartável, apenas retirá-la e descartá-la.

9. Caso não vá fazer em seguida a fase de separação, as amostras podem ser armazenadas assim, no Trizol, a -80°C por até 1 ano. Caso vá dar prosseguimento, seguir o protocolo abaixo.

Fase de Separação

1. Ligar a microcentrífuga refrigerada
2. Adicionar 0,2mL de clorofórmio para cada 1mL de Trizol
3. Agitar vigorosamente com as mãos por 15 segundos
4. Incubar por 2-3 minutos a temperatura ambiente
5. Centrifugar as amostras a 12000xg por 15 minutos a 4°C

*Nesta fase o RNA será separado das proteínas e de restos celulares através da ação do clorofórmio. Neste processo observamos 3 fases distintas:

-Fenol-clorofórmio (rosada), onde estão contidos os restos celulares

| | |
|--|---|
| Elaborado por: Priscila Oliveira de Carvalho | Aprovado por: Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão |
| Revisado por: Carolina Graziani Vital | |



MANUAL – BIOLOGIA MOLECULAR



Data: 01/07/2018

Próxima revisão:

01/07/2019

LABORATÓRIO DE METABOLISMO E LÍPIDES

Nº: 05

Versão: 04

Página 7

-Fase intermediária (branca), onde estão as proteínas

-Fase translúcida (superior/sobrenadante), onde está presente o RNA.

Fase de Precipitação

1. Transferir a fase sobrenadante para um novo microtubo de 1,5mL previamente identificado tomando cuidado ao pipetar, não deixando a ponteira tocar em nenhuma outra fase)
2. Adicionar 0,5mL de isopropanol para cada 1mL de Trizol utilizado. Vortexar por 10 segundos. Deixar o isopropanol agir sobre o RNA por, no mínimo, 10 minutos a temperatura ambiente. Se desejável, deixar de um dia para outro no -80°C
3. Centrifugar a 12000xg por 10 minutos a 4°C

Fase de Lavagem

1. Desprezar o sobrenadante por inversão
2. Acrescentar 1mL de etanol 75%, para cada 1mL de Trizol utilizado, ao pellet de RNA
3. Ressuspender o pellet usando as mãos de maneira a desprendê-lo do fundo do microtubo.
4. Centrifugar a 7500xg por 5 minutos a 4°C

Fase de Eluição do RNA

1. Forrar um pedaço da bancada com papel de filtro
2. Desprezar o sobrenadante por inversão

Elaborado por: Priscila Oliveira de Carvalho

Revisado por: Carolina Graziani Vital

Aprovado por:

Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão

| | | |
|---|---|---|
|  | MANUAL – BIOLOGIA MOLECULAR |  |
| Data: 01/07/2018 Próxima revisão: 01/07/2019 | LABORATÓRIO DE METABOLISMO E LÍPIDES | Nº: 05 Versão: 04 Página 8 |

3. Deixar o microtubo de ponta cabeça ou deitado sobre o papel no fluxo laminar para evitar contaminação, durante 10 minutos, para secar
4. Ressuspender o pellet com 30-50uL (dependendo do tamanho do pellet) de água DEPC ou livre de RNases
5. Homogeneizar usando as mãos de maneira a eluir o pellet na água
6. Incubar a 55°C por 10 minutos (para esticar a fita de RNA)
7. Gelo por 3 minutos (choque térmico para manter a fita esticada)
8. Armazenar a -80°C

Laboratório de Metabolismo e Lípidos

| | |
|--|---|
| Elaborado por: Priscila Oliveira de Carvalho | Aprovado por: Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão |
| Revisado por: Carolina Graziani Vital | |