

3. EXTRAÇÃO DE RNA

Adriana Mércia Guaratini Ibelli

Luciana Correia de Almeida Regitano

Simone Cristina Méo

A análise do RNA pode fornecer informações importantes sobre expressão gênica. Para que isto seja possível, é necessário que seja feita uma purificação eficaz do RNA, mantendo sua integridade e qualidade.

Os métodos para isolamento de RNA baseiam-se na lise e na desnaturação das células que permitem a liberação dos ácidos nucléicos totais e na presença de inibidores que impedem a ação de ribonucleases (RNAses) (Ausubel, 1987).

A principal dificuldade na extração de RNA é a presença de grande quantidade de ribonucleases (RNAses) estáveis e ativas nos tecidos, que permitem que o RNA (altamente instável) seja rapidamente degradado. Desta maneira, a primeira etapa em todos os métodos de isolamento de RNA após a pulverização dos tecidos, é a exposição deste material a tampões de extração. Estes apresentam substâncias como o cloreto de lítio que auxilia a precipitação do RNA e isotiocianato de guanidina que permite a manutenção do RNA intacto nas etapas posteriores da extração, através da degradação das ribonucleases endógenas (Sambrook, 2002).

Atualmente, há vários reagentes comerciais como, por exemplo, Trizol (Invitrogen®) e Brazol (Lab Trade do Brasil®) que possuem em sua composição reagentes combinados, como isotiocianato de guanidina e fenol, possibilitando uma extração de RNA mais rápida que a dos protocolos convencionais e garantindo a integridade do material (Sambrook, 2002).

É necessária ainda a adição de clorofórmio ao tampão contendo RNA que solubiliza os lipídios permitindo a sua remoção. Após a centrifugação, três fases poderão ser observadas: uma rósea formada pela presença do fenol, uma interfase formada pelo clorofórmio e DNA e uma fase aquosa, onde estará presente o RNA.

A precipitação do RNA é feita com um álcool, como por exemplo, o isopropanol. Nesta etapa, observa-se uma nuvem branca contendo o RNA. Posteriormente, uma limpeza com álcool permite a retirada de sais que tenham ainda aderido ao precipitado de RNA (Ausubel, 1987).

Na extração de RNA, alguns fatores além da escolha do protocolo utilizado, são extremamente importantes para a obtenção e a manutenção do RNA de qualidade.

Primeiramente, todas as soluções utilizadas deverão ser feitas com água DEPC (dietilporocarbonato) autoclavada. O DEPC atua inativando RNAses, pois degrada as histidinas presentes.

Os almofarizes, pistilos, vidrarias e outros utensílios devem ser previamente esterilizados em estufa a 180 °C por um período de quatro horas.

As ponteiros, tubos de polipropilenos devem ser novos e livres de RNAses.

As micropipetas devem ser utilizadas apenas para os procedimentos com RNA.

A bancada deve ser constantemente limpa com SDS 10% e com etanol 70% e, se possível, exclusiva para a manipulação de RNA.

E, principalmente, devem ser tomados cuidados com as luvas utilizadas, de forma a mantê-las livres das RNAses, normalmente liberadas abundantemente pelas secreções da pele.

3.1. Protocolo de Extração de RNA (adaptado de Chomczynski, 1987)

1. Macerar o tecido em nitrogênio líquido
2. Para cada 50 a 100 mg de tecido adicionar 1 mL de trizol (em tubo de polipropileno de 1,5 mL). Homogeneizar em vórtex
3. Incubar 5 min a temperatura ambiente
4. Acrescentar 200 μ L de clorofórmio
5. Agitar vigorosamente com as mãos por 15 segundos
6. Incubar durante 5 min a temperatura ambiente
7. Centrifugar a 16.000 $xg/4$ °C durante 15 min
8. Remover a fase aquosa para tubo limpo
9. Adicionar 500 μ L de isopropanol. Homogeneizar com as mãos
10. Incubar por 10 min a temperatura ambiente
11. Centrifugar a 13.000 $xg/4$ °C por 10 min
12. Descartar o sobrenadante
13. Lavar com 1 mL de etanol 75% (feito com água DEPC)

(Neste ponto, pode armazenar em freezer -20 °C por até um ano)

14. Centrifugar a 10.500 $xg/4$ °C por 5 min
15. Secar o *pellet* durante 15 min a temperatura ambiente

Obs. Não pode ficar nada de etanol.

16. Ressuspender o *pellet* em água DEPC (20 μ L a 50 μ L)

Obs. Verificar o tamanho do pellet, para avaliar em que volume ressuspender.