

## **Procesamiento para obtener en RNA a partir de las alícuotas de células lisadas en tiocianato de guanidinio**

### **Obtención de la muestra**

1. Se prepararon monocapas de células UFL-AG 286 en frascos falcon (tamaño según ensayo, 5 de 25cm<sup>2</sup> para cinética, 1 de 75 para +1)
2. Se infectaron con ..... cantidad de AgMNPV-Arg (título.....) y se incubaron a 27°C.
3. A los tiempos correspondientes post-infección se recolectaron las muestras con 5ml de solución de lisis (tiocianato de guanidinio 4M, β-mecaptoetanol.

### **Extracción de RNA total**

- 1- Agregar 5ml más de solución de lisis.
- 2- Agregar 8 ml de fenol ácido Mezclar suavemente por inversión (5 ó más veces). Agregar cloroformo-isoamílico 2 ml. Mezclar suavemente por inversión (5 ó más veces)
- 3- Centrifugar 10 min. A 5000 rpm en la centrífuga clínica.
- 4- Trasvasar la fase del acuosa (superior) a otro tubo de 15ml.
- 5- Agregar al primer tubo 5ml de agua estéril, mezclar suavemente y centrifugar 10 min. A 5000 rpm en la centrífuga clínica.
- 6- Recuperar la fase acuosa de la re-extracción y agregarla a la del punto 4.
- 7- Realizar una segunda extracción con 8ml de fenol ácido. Mezclar suavemente por inversión (5 ó más veces, todo en un tubo de 15ml). Agregar cloroformo-isoamílico 2 ml. Mezclar suavemente por inversión (5 ó más veces)
- 8- Centrifugar 10 min a 5000 rpm en la centrífuga clínica.
- 9- Trasvasar la fase acuosa a Eppendorfs de 1,5 ml. Extraer con 1 vol cloroformo-isoamílico. Mezclar suavemente por inversión (5 ó más veces). centrifugar.
- 10- Trasvasar la fase acuosa a Eppendorfs de 1,5 ml. Agregar 0,1 vol de 3M de NaAcO y 0,8 vol. De isopropanol. **OJO! Recuperar un total de 1,7 a 1,8ml.** Incubar a -20 °C (mínimo 2hs).
- 11- Centrifugar 30 min. A 16000 xg a 4°C. Descartar el sobrenadante. Lavar con EtOH 70%. Centrifugar 5min. A 16000xg a 4°C. Descartar el sobrenadante.
- 12- Secar el pellet (no en exceso). Agregar 20-30ul de agua por tubo, incubar a 50°C 15-20 min. Y mezclar por pipeteo suave.