

Protocolo para aislar mRNA (PolyAtract System III)

para usar con un máximo de 1 mg de RNA total

A. Annealing de la sonda

1. Poner de 0,1-1 mg de RNA total en un tubo esteril de 1,5 ml y llevar a volumen final 500 ul.
2. Poner el tubo a 65 °C por 10 minutos
3. Agregar al RNA 3 ul de la sonda Biotinilada-Oligo(dT) y 13 ul de 20X SSC. Mezclar generosamente e incubar a temperatura ambiente hasta que esté totalmente fría (10 min aprox).

B. Preparación de Soluciones Stock

1. Preparar 1,2 ml de SSC 5X (30 ul de SSC 20X + 1,170ml de H₂O)
2. Preparar 1,4 ml de SSC 0,1X (7 ul de SSC 20X + 1,393 ml de H₂O)

C. Lavado de las partículas paramagnéticas

1. Resuspender 1 tubo de las partículas paramagnéticas-streptavidina (SA-PMPs) por muestra de RNA purificada, mezclando hasta que estén completamente dispersas, luego capturarlas poniendo el tubo en el "magnetic stand" hasta que las SA-PMPs estén agrupadas al costado del tubo (30 seg. aprox).
2. Descartar el sobrenadante. No centrifugar.
3. Lavar las SA-PMPs 3 veces con SSC 0,5X (300 ul por lavado), cada vez capturando las bolitas paramagnéticas y retirando el sobrenadante.
4. Resuspender las SA-PMPs en 100 ul de SSC 0,5X.

D. Captura y Lavado de los híbridos mRNA-oligo dt

1. Agregar todo el contenido de la reacción del paso A.3 al tubo que contiene las SA-PMPs ya lavadas.
2. Incubar a temperatura ambiente 10 minutos. Mezclar generosamente por inversión 1-2 minutos.
3. Capturar las SA-PMPs y retirar cuidadosamente el sobrenadante sin disromper el pellet.
4. Lavar las partículas 4 veces con 0,1X SSC (300 ul por lavado) mezclando hasta que estén completamente dispersas. Luego del lavado final, retirar la mayor cantidad de sobrenadante posible sin disromper las partículas de SA-PMP.

E. Elución del mRNA

1. Resuspender el pellet final de SA-PMP en 100 ul de H₂O.
2. Capturar magneticamente las SA-PMPs y transferir los mRNA eluidos a otro tubo. No tirar las partículas.
3. Repetir el paso de elución resuspendiendo las partículas en 150 ul de H₂O. Capturar nuevamente y juntar el sobrenadante con el anterior (250 ul de volumen final).

La concentración y pureza del mRNA eluido puede ser determinado por espectrofotometría ya que el radio de Abs A260/A280 del mRNA puro debería ser > 2. Para estimar la concentración, asumir que una sc de mRNA de 40ug/ml tiene una Abs de 1 a 260nm. Generalmente de 1-5 % del RNA total es mRNA.