**Extracción de RNA con TRIZOL**

**Antes de empezar:**

* Poner microcentrífuga a 4° C.
* Limpiar la mesa y pipetas con alcohol o RNAse ZAP.
* Usar guantes y evitar respirar en las muestras…

**Materiales:**

* TRIZOL
* Cloroformo
* Isopropanol 100%
* Etanol 75%
* DEPC H2O

**Procedimiento:**

1. Lavar células en suspensión (o adherentes despegadas) con PBS frío.
2. Aspirar el sobrenadante y resuspender en 1mL de TRIZOL.
3. Incubar 5 min RT y congelar a -20° C o pasar al paso 4.
4. Agregar 200 L de cloroformo y agitar con la mano vigorosamente (sin vortexear) durante 15 seg.
5. Incubar a RT durante 3 min.
6. Centrifugar a 12,000 g, 15 min, 4° C.
7. Aspirar la fase acuosa (~400 L) y ponerla en un ependorff nuevo. *No tratar de sacar toda la fase acuosa y tener mucho cuidado de no aspirar la interfase.*
8. Agregar 500 L de isopropanol 100% e incubar RT durante 10 min.
9. Centrifugar a 12,000 g, 10 min, 4° C. Se forma un botón gelatinoso en la base y lado del tubo. A veces no se ve.
10. Aspirar el sobrenadante con cuidado. *No tratar de aspirar todo para evitar aspirar el botón*.
11. Agregar 1 mL de etanol 75%. Vortexear.
12. Centrifugar a 7,500 g, 5 min, 4° C.
13. Aspirar el sobrenadante y secar el tubo boca abajo sobre un papel secante (~ 5 min).
14. Resuspender en DEPC H2O e incubar a 60° C en el baño de agua o el heat block durante 15 min.
15. Medir concentración y pureza en el nanodrop.
16. Guardar a -80° C.