

EXTRACTION AU TRIZOL

PRECAUTIONS GENERALES :

- Toutes les manipulations se font avec des gants de façon à limiter le risque de dépôt de RNAses présentes en grande quantité sur notre peau.
- Tout le matériel utilisé (pointes, tubes...) doit être exempt de RNase, de même que l'eau.
- Pour la préparation de toutes les solutions et la dilution des ARN, utiliser de l'eau milliQ **non-autoclavée**.

MODE OPERATOIRE :

1. Après une culture ou une séparation au Ficoll, laver les cellules en RPMI (ou DMEM) 0% FCS, centrifuger à 1500 tr/min 5 minutes, ou monter à 3000 tr/min et redescendre.
2. Reprendre le culot cellulaire ou le tissu dans du Trizol (bien assécher le culot) : 1 ml de Trizol pour 50 à 100 mg de tissu ou $5 \cdot 10^6$ - $5 \cdot 10^7$ cellules en suspension.
3. Incuber 5 minutes à température ambiante.
4. Ajouter 0.2 ml de chloroforme pour 1 ml de Trizol.
5. Agiter vigoureusement par inversion pendant 15 secondes.
6. Incuber à température ambiante 3 minutes.
7. Centrifuger le tube à 12000 tr/min, (max) 15 minutes à 4 °C
Après centrifugation, on obtient 2 phases :
 - Rouge = phénol chloroforme en bas
 - Phase aqueuse translucide = ARN (environ 0.6 ml)
8. Récupérer la phase aqueuse dans un nouveau tube sans prélever l'anneau de la zone à l'interface.
9. Rajouter 0.5 ml d'Isopropanol et agiter rapidement.
10. Incuber 10 minutes à température ambiante.
11. Centrifuger le tube à 12000 tr/min (max) 15 minutes à 4 °C.
12. Enlever le surnageant et laver le culot avec 75 % d'éthanol en H₂O DEPC (1 ml pour 1 ml de Trizol).
13. Vortexer et centrifuger 12000 tr/min.
14. enlever le surnageant par inversion et laisser sécher à température ambiante.
15. Reprendre le culot dans 20 à 40 µl d' H₂O DEPC.
16. Incuber 10 minutes à 55-60 °C et congeler à - 80 °C.
17. Mesurer la DO à 260 nm.
18. Congeler à -80°C.

