



# DANAGENE microRNA KIT

Ref.0804

## 1.INTRODUCCION

Este kit provee un método rápido y eficiente para la extracción y purificación de moléculas pequeñas de ARN (<200 nt) a partir de diferentes muestras como son, células animales cultivadas, pequeños tejidos animales, células bacterianas, levaduras, sangre y tejidos de plantas. Estos pequeños RNA incluyen moléculas reguladoras como **microARN (miARN)** y el **ARN de interferencia (ARNi)**.

La mayoría de kits comerciales de columnas no poseen la capacidad de recuperar las moléculas de ARN < 200 nucleótidos. Utilizando una aproximación que consiste en 2 filtraciones secuenciales con diferentes concentraciones de etanol, **una fracción enriquecida en especies de ARN < 200 nucleótidos puede obtenerse con el DANAGENE microARN Kit.**

## 2. COMPONENTES KIT

	50 extracciones	Tª Stock
Lysis Buffer RNA	25 ml	15-25°C
Wash Buffer RNA*	22 ml	15-25°C
Elution Buffer RNA	6 ml	15-25°C
LargeRNA removal Spin Columns	50 unid.	15-25°C
microRNA Spin Columns	50 unid.	15-25°C
Collection tubes	200 unid.	15-25°C

\*Ver en el apartado de preparaciones preliminares como preparar estas soluciones

### Equipos y reactivos necesarios y no provistos

- Etanol 100 %
- Etanol 70 %
- Microcentrifuga.
- Microtubos de 1.5 ml y 2.0 ml.
- Homogenizadores generales para homogenizar tejidos animales y de plantas.
- Nitrogeno líquido.
- $\beta$ -mercaptoetanol.

### Almacenamiento y estabilidad

- Todos los componentes son estables durante 12 meses desde la fecha de la compra siendo almacenados como se indica.

**ATENCION:** El Tampón de Lisis RNA contiene guanidinio isotiocianato que es irritante, utilizar guantes y gafas.

### 3. PROTOCOLO

#### 3.1 Preparaciones preliminares

- Añadir Etanol 100 % al Tampón de Lavado RNA indicado en la etiqueta, unos **50 ml** con lo que el volumen final será de 72 ml .Mantener el envase bien cerrado para evitar la evaporación del etanol.
- Asegurarse que todas las soluciones se encuentran a temperatura ambiente.
- **OPCIONAL:** El uso de  $\beta$ -mercaptoetanol en la lisis es altamente recomendado para tejidos animales, particularmente en aquellos que se sabe que tienen un alto contenido en RNAsas (ejem.páncreas), al igual que en tejidos de plantas. También se recomienda para aquellos usuarios que quieren aislar RNA para aplicaciones muy sensibles o enriquecimiento de microRNA. **Preparar una cantidad apropiada de Tampón de Lisis RNA añadiendo 10  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol por 1 ml de Tampón de Lisis RNA.** Alternativamente, la Solución de Lisis RNA puede ser utilizada tal y como es suministrada.
- **Para minimizar la degradación del ARN y obtener un rendimiento óptimo de ARN es importante realizar la rotura del tejido en el Tampón de Lisis rápidamente y no exceder la cantidad inicial de muestra recomendada. Utilizar cantidades mayores de muestra provocará una copurificación de ARN ribosomal y ARN mensajero, y posiblemente ADN genómico que no se unirán a la primera columna y se copurificarán junto a las moléculas pequeñas de ARN.**

#### 3.2 Protocolo de extracción de microARN a partir de células animales en cultivo

**Nota:** La máxima cantidad recomendada de células es  $1 \times 10^6$ . Pellets de células pueden ser conservados a  $-70^\circ\text{C}$  para un uso posterior (determinar el número de células antes de congelar). Los pellets congelados no deberán ser conservados más de 2 semanas para asegurar que la integridad del ARN no se verá comprometida. El Tampón de lisis RNA se añadirá directamente sobre los pellets congelados sin dejar que alcancen la temperatura ambiente.

##### 1.A) microARN de células creciendo en monocapa

1. Aspirar el medio y lavar las células con una cantidad apropiada de PBS. Aspirar el PBS.
2. Añadir directamente **400 $\mu$ l de Tampón de Lisis RNA** directamente a la placa de cultivo.
3. Lisar las células, tapar la placa y agitar el tampón alrededor de la superficie de la placa durante 5 minutos.
4. Pasar el lisado a un microtubo.
5. Añadir **210  $\mu$ l de etanol 95-100%** al lisado. Mezcla por vortex 10 segundos.
6. Ensamblar una **Large RNA removal column** con un tubo de recogida que se suministra.
7. Añadir el lisado + etanol a la columna. **Centrifugar durante 1 minuto.**
8. **Retener el líquido que ha pasado a través de la columna y que se encuentra en el tubo de recogida,** el cual contiene las **especies pequeñas de ARN.** *Si se desea extraer el ARN de mayor tamaño, conservar la columna y proceder con el protocolo del APENDICE A. Sino eliminar la columna.*
9. **Pasar el líquido retenido a un** microtubo nuevo de 1.5 ml ( no suministrado con el kit). Añadir **700  $\mu$ l de Etanol 95-100%** para obtener una concentración final del 70%.Mezcla por vortex durante 10 segundos.Después de la adición del etanol se podrá apreciar un precipitado, **asegurarse** de que todo el precipitado se añada a la microRNAColumna.
10. Ensamblar **una microRNA column** con un tubo de recogida que se suministra.
11. Aplicar el líquido retenido + etanol a la **microRNA column. Centrifugar durante 1 minuto.** Eliminar el tubo y ensamblar la columna con un nuevo tubo de recogida
12. Repetir el punto 11 si hay más líquido por pasar.
13. Añadir **400  $\mu$ l de Tampón de Lavado RNA** a la columna y centrifugar durante 1 minuto. Asegurarse que todo el tampón de lavado ha pasado a través de la columna , sino fuera así centrifugar otro minuto adicional.
14. Eliminar el líquido y ensamblar la columna con el tubo de recogida. Añadir **400  $\mu$ l de Tampón de Lavado RNA** a la columna y centrifugar durante 1 minuto.
15. Realizar un tercer lavado. Añadir **400  $\mu$ l de Tampón de Lavado RNA** a la columna y centrifugar durante 1 minuto. Eliminar el líquido del tubo de recogida y centrifugar durante 2 minutos adicionales para eliminar todo el etanol residual. Eliminar el tubo de recogida.
16. Colocar la columna en un microtubo nuevo de 1.5 ml ( no suministrado con el kit) para eluir el ARN total.
17. Añadir **25-50  $\mu$ l de Tampón de Elución RNA** a la columna.
18. Centrifugar durante 2 minutos a **200x g (aprox. 2.000 rpm)**, seguido de 1 minuto a **14.000 x g (aprox. 14.000 rpm)**. Ver la cantidad de eluido de la columna, sino se han eluido los 50  $\mu$ l centrifugar por 1 minuto adicional a 14.000 x g (aprox. 14.000 rpm).
19. El ARN purificado puede ser conservado a  $-20^\circ\text{C}$  durante algunos días. Se recomienda que las muestras se conserven a  $-70^\circ\text{C}$  para almacenamientos largos.

### 1.B) microARN de células creciendo en solución

1. Transferir la suspensión celular a un tubo libre de RNAsas (no suministrado) y centrifugar a no más de **200x g (aprox. 2.000 rpm)** durante 10 minutos para pellet las células.
2. Cuidadosamente eliminar el sobrenadante.
3. Añadir **400 µl de Tampón de Lisis RNA** al pellet. Lisar las células por vortex durante 15 segundos. Asegurarse que todo el pellet está disuelto antes de proceder con el siguiente paso.
4. Añadir **210 µl de etanol 95-100%** al lisado. Mezcla por vortex 10 segundos.
5. Ensamblar una **Large RNA removal column** con un tubo de recogida que se suministra.
6. Añadir el lisado + etanol a la columna. **Centrifugar durante 1 minuto.**
7. **Retener el líquido que ha pasado a través de la columna y que se encuentra en el tubo de recogida**, el cual contiene las **especies pequeñas de ARN**. *Si se desea extraer el ARN de mayor tamaño, conservar la columna y proceder con el protocolo del APENDICE A. Sino eliminar la columna.*
8. **Pasar el líquido retenido a un** microtubo nuevo de 1.5 ml ( no suministrado con el kit). Añadir **700 µl de Etanol 95-100%** para obtener una concentración final del 70%.Mezcla por vortex durante 10 segundos.Después de la adición del etanol se podrá apreciar un precipitado, **asegurarse** de que todo el precipitado se añade a la microRNAColumn.
9. Ensamblar **una microRNA column** con un tubo de recogida que se suministra.
10. Aplicar el líquido retenido + etanol a la **microRNA column**. **Centrifugar durante 1 minuto.** Eliminar el tubo y ensamblar la columna con un nuevo tubo de recogida
11. Repetir el punto 10 si hay más líquido por pasar.
12. Añadir **400 µl de Tampón de Lavado RNA** a la columna y centrifugar durante 1 minuto. Asegurarse que todo el tampón de lavado ha pasado a través de la columna , sino fuera así centrifugar otro minuto adicional.
13. Eliminar el líquido y ensamblar la columna con el tubo de recogida. Añadir **400 µl de Tampón de Lavado RNA** a la columna y centrifugar durante 1 minuto.
14. Realizar un tercer lavado. Añadir **400 µl de Tampón de Lavado RNA** a la columna y centrifugar durante 1 minuto. Eliminar el líquido del tubo de recogida y centrifugar durante 2 minutos adicionales para eliminar todo el etanol residual. Eliminar el tubo de recogida.
15. Colocar la columna en un microtubo nuevo de 1.5 ml ( no suministrado con el kit) para eluir el ARN total.
16. Añadir **25-50 µl de Tampón de Elución RNA** a la columna.
17. Centrifugar durante 2 minutos a **200x g (aprox. 2.000 rpm)**, seguido de 1 minuto a **14.000 x g (aprox. 14.000 rpm)**. Ver la cantidad de eluido de la columna, sino se han eluido los 50 µl centrifugar por 1 minuto adicional a 14.000 x g (aprox. 14.000 rpm).
18. El ARN purificado puede ser conservado a -20°C durante algunos días. Se recomienda que las muestras se conserven a -70°C para almacenamientos largos.

### 3.3 Protocolo de extracción de microARN a partir de tejidos animales.

**Nota:** El ARN en tejidos animales no se encuentra protegido hasta que después de su recolección es roto y homogenizado en la Solución de Lisis. Tejidos frescos o congelados pueden ser utilizados para este procedimiento.Los tejidos deberían congelarse en nitrógeno líquido y transferidos inmediatamente a -70°C. Cuando aislamos microARN de tejidos congelados asegurase que no desciende mucho su temperatura durante el pesaje y la pulverización con una mano de mortero.

1. Determinar la cantidad de tejido a pesar , se recomienda no utilizar más de 10 mg de tejido.
2. Colocar el tejido en un mortero que contenga una cantidad apropiada de nitrógeno líquido para cubrir la muestra. Pulverizar el tejido utilizando una mano de mortero. Permitir que el nitrógeno líquido se evapore.
3. Pasar la muestra a un microtubo libre de RNAsas (no suministrado) y añadir **400 µl de Tampón de Lisis RNA** . Homogenizar pasando el lisado 5 o 10 veces a través de una jeringa con una aguja de 25 o con un homogenizador eléctrico de mano.
4. Centrifugar durante 2 minutos para pellet algún desecho celular que pueda quedar. Pasar el sobrenadante a un microtubo libre RNAsas nuevo (no suministrado).**IMPORTANTE: Anotar la cantidad de sobrenadante/lisado.**
5. Añadir **etanol 100%** siguiendo esta regla, **55µl de etanol 100% es añadido por cada 100 µl de sobrenadante/lisado**. Mezclar por vortex durante 10 segundos.
6. Ensamblar una **Large RNA removal column** con un tubo de recogida que se suministra.
7. Añadir el lisado + etanol a la columna. **Centrifugar durante 1 minuto.**
8. **Retener el líquido que ha pasado a través de la columna y que se encuentra en el tubo de recogida**, el cual contiene las **especies pequeñas de ARN**. *Si se desea extraer el ARN de mayor tamaño, conservar la columna y proceder con el protocolo del APENDICE A. Sino eliminar la columna.*

9. **Pasar el líquido retenido a un** microtubo nuevo de 1.5 ml ( no suministrado con el kit). **IMPORTANTE: Anotar el volumen de líquido retenido (140 µl de etanol 100% es añadido por cada 100 µl de líquido retenido).** Mezclar por vortex durante 10 segundos. Después de la adición del etanol se podrá apreciar un precipitado, **asegurarse** de que todo el precipitado se añade a la microRNA column.
10. Ensamblar **una microRNA column** con un tubo de recogida que se suministra.
11. Aplicar el líquido retenido + etanol a la **microRNA column**. **Centrifugar durante 1 minuto.** Eliminar el tubo y ensamblar la columna con un nuevo tubo de recogida
12. Repetir el punto 11 si hay más líquido por pasar.
13. Añadir **400 µl de Tampón de Lavado RNA** a la columna y centrifugar durante 1 minuto. Asegurarse que todo el tampón de lavado ha pasado a través de la columna , sino fuera así centrifugar otro minuto adicional.
14. Eliminar el líquido y ensamblar la columna con el tubo de recogida. Añadir **400 µl de Tampón de Lavado RNA** a la columna y centrifugar durante 1 minuto.
15. Realizar un tercer lavado. Añadir **400 µl de Tampón de Lavado RNA** a la columna y centrifugar durante 1 minuto. Eliminar el líquido del tubo de recogida y centrifugar durante 2 minutos adicionales para eliminar todo el etanol residual. Eliminar el tubo de recogida.
16. Colocar la columna en un microtubo nuevo de 1.5 ml ( no suministrado con el kit) para eluir el ARN total.
17. Añadir **25-50 µl de Tampón de Elución RNA** a la columna.
18. Centrifugar durante 2 minutos a **200x g (aprox. 2.000 rpm)**, seguido de 1 minuto a **14.000 x g (aprox. 14.000 rpm)**. Ver la cantidad de eluido de la columna, sino se han eluido los 50 µl centrifugar por 1 minuto adicional a 14.000 x g (aprox. 14.000 rpm).
19. El ARN purificado puede ser conservado a -20°C durante algunos días. Se recomienda que las muestras se conserven a -70°C para almacenamientos largos.

### 3.4 Protocolo de extracción de microARN a partir de sangre y fluidos biológicos.

**Nota:** Se recomienda no utilizar más de 100 µl de sangre total y que se haya utilizado EDTA como anticoagulante.

1. Transferir 100 µl de sangre no coagulada a un microtubo libre RNAsas (no suministrado).
2. Añadir **300 µl de Tampón de Lisis RNA** a la sangre. Lisar las células por vortex durante 15 segundos. Asegurarse que la mezcla está transparente antes de proceder con el siguiente paso.
3. Añadir **210 µl de etanol 95-100%** al lisado. Mezcla por vortex 10 segundos.
4. Ensamblar una **Large RNA removal column** con un tubo de recogida que se suministra.
5. Añadir el lisado + etanol a la columna. **Centrifugar durante 1 minuto.**
6. **Retener el líquido que ha pasado a través de la columna y que se encuentra en el tubo de recogida,** el cual contiene las **especies pequeñas de ARN.** *Si se desea extraer el ARN de mayor tamaño, conservar la columna y proceder con el protocolo del APENDICE A. Sino eliminar la columna.*
7. **Pasar el líquido retenido a un** microtubo nuevo de 1.5 ml ( no suministrado con el kit). Añadir **700 µl de Etanol 95-100%** para obtener una concentración final del 70%. Mezcla por vortex durante 10 segundos. Después de la adición del etanol se podrá apreciar un precipitado, **asegurarse** de que todo el precipitado se añade a la microRNAColumn.
8. Ensamblar **una microRNA column** con un tubo de recogida que se suministra.
9. Aplicar el líquido retenido + etanol a la **microRNA column**. **Centrifugar durante 1 minuto.** Eliminar el tubo y ensamblar la columna con un nuevo tubo de recogida
10. Repetir el punto 9 si hay más líquido por pasar.
11. Añadir **400 µl de Tampón de Lavado RNA** a la columna y centrifugar durante 1 minuto. Asegurarse que todo el tampón de lavado ha pasado a través de la columna , sino fuera así centrifugar otro minuto adicional.
12. Eliminar el líquido y ensamblar la columna con el tubo de recogida. Añadir **400 µl de Tampón de Lavado RNA** a la columna y centrifugar durante 1 minuto.
13. Realizar un tercer lavado. Añadir **400 µl de Tampón de Lavado RNA** a la columna y centrifugar durante 1 minuto. Eliminar el líquido del tubo de recogida y centrifugar durante 2 minutos adicionales para eliminar todo el etanol residual. Eliminar el tubo de recogida.
14. Colocar la columna en un microtubo nuevo de 1.5 ml ( no suministrado con el kit) para eluir el ARN total.
15. Añadir **25-50 µl de Tampón de Elución RNA** a la columna.
16. Centrifugar durante 2 minutos a **200x g (aprox. 2.000 rpm)**, seguido de 1 minuto a **14.000 x g (aprox. 14.000 rpm)**. Ver la cantidad de eluido de la columna, sino se han eluido los 50 µl centrifugar por 1 minuto adicional a 14.000 x g (aprox. 14.000 rpm).
17. El ARN purificado puede ser conservado a -20°C durante algunos días. Se recomienda que las muestras se conserven a -70°C para almacenamientos largos.

### 3.5 Protocolo de extracción de microARN a partir de bacterias.

**Nota:** Se recomienda no utilizar más de  $1 \times 10^9$  células /ml, el crecimiento bacteriano puede ser medido por un espectrofotómetro, como regla general, un cultivo de E.coli de  $1 \times 10^9$  células /ml tiene una  $DO_{600}$  de 1.0. Preparar una cantidad apropiada de TE conteniendo lisozima, esta solución se preparará con TE libre de RNAsas y conservado en hielo hasta su uso. Para Gram-negativos la concentración de lisozima será de 1 mg/ml y Gram-positivos la concentración de lisozima será de 3 mg/ml.

1. Pellet las células por centrifugación a **14.000 x g (aprox. 14.000 rpm) durante 1 minuto.**
2. Eliminar el sobrenadante y resuspender por vortex el pellet en **100 µl del TE con la cantidad apropiada de lisozima.** Incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
3. Añadir **300 µl de Tampón de Lisis RNA** y vortex durante 15 segundos.
4. Añadir **200 µl de etanol 95-100%** al lisado. Mezcla por vortex 10 segundos. Asegurarse que el pellet es completamente disuelto antes de proceder con el siguiente paso.
5. Ensamblar una **Large RNA removal column** con un tubo de recogida que se suministra.
6. Añadir el lisado + etanol a la columna. **Centrifugar durante 1 minuto.**
7. **Retener el líquido que ha pasado a través de la columna y que se encuentra en el tubo de recogida,** el cual contiene las **especies pequeñas de ARN.** *Si se desea extraer el ARN de mayor tamaño, conservar la columna y proceder con el protocolo del APENDICE A. Sino eliminar la columna.*
8. **Pasar el líquido retenido a un microtubo nuevo de 1.5 ml** ( no suministrado con el kit). Añadir **700 µl de Etanol 95-100%** para obtener una concentración final del 70%. Mezcla por vortex durante 10 segundos. Después de la adición del etanol se podrá apreciar un precipitado, **asegurarse** de que todo el precipitado se añade a la microRNAColumna.
9. Ensamblar una **microRNA column** con un tubo de recogida que se suministra.
10. Aplicar el líquido retenido + etanol a la **microRNA column.** **Centrifugar durante 1 minuto.** Eliminar el tubo y ensamblar la columna con un nuevo tubo de recogida
11. Repetir el punto 10 si hay más líquido por pasar.
12. Añadir **400 µl de Tampón de Lavado RNA** a la columna y centrifugar durante 1 minuto. Asegurarse que todo el tampón de lavado ha pasado a través de la columna , sino fuera así centrifugar otro minuto adicional.
13. Eliminar el líquido y ensamblar la columna con el tubo de recogida. Añadir **400 µl de Tampón de Lavado RNA** a la columna y centrifugar durante 1 minuto.
14. Realizar un tercer lavado. Añadir **400 µl de Tampón de Lavado RNA** a la columna y centrifugar durante 1 minuto. Eliminar el líquido del tubo de recogida y centrifugar durante 2 minutos adicionales para eliminar todo el etanol residual. Eliminar el tubo de recogida.
15. Colocar la columna en un microtubo nuevo de 1.5 ml ( no suministrado con el kit) para eluir el ARN total.
16. Añadir **25-50 µl de Tampón de Elución RNA** a la columna.
17. Centrifugar durante 2 minutos a **200x g (aprox. 2.000 rpm)**, seguido de 1 minuto a **14.000 x g (aprox. 14.000 rpm)**. Ver la cantidad de eluido de la columna, sino se han eluido los 50 µl centrifugar por 1 minuto adicional a 14.000 x g (aprox. 14.000 rpm).
18. El ARN purificado puede ser conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante algunos días. Se recomienda que las muestras se conserven a  $-70^{\circ}\text{C}$  para almacenamientos largos.

### 3.6 Protocolo de extracción de microARN a partir de levaduras

**Nota:** Se recomienda no utilizar más de  $10^7$  células de levadura o 1ml de cultivo. Preparar una cantidad apropiada de Tampón de Resuspensión que contenga liticasa : 50mM tris, pH 7.5, 10 mM EDTA, 1M Sorbitol, 0.10 %  $\beta$ -mercaptoetanol y 1 unidad / µl de liticasa. Esta solución debería prepararse con reactivos estériles y libres de RNAsas y mantenida en hielo hasta ser utilizada.

1. Pellet las levaduras por centrifugación a **14.000 x g (aprox. 14.000 rpm) durante 1 minuto.**
2. Eliminar el sobrenadante y resuspender por vortex el pellet en **100 µl del Tampón de Resuspensión con la cantidad apropiada de liticasa.** Incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos.
3. Añadir **300 µl de Tampón de Lisis RNA** y vortex durante 15 segundos.
4. Añadir **200 µl de etanol 95-100%** al lisado. Mezcla por vortex 10 segundos. Asegurarse que el pellet es completamente disuelto antes de proceder con el siguiente paso.
5. Ensamblar una **Large RNA removal column** con un tubo de recogida que se suministra.
6. Añadir el lisado + etanol a la columna. **Centrifugar durante 1 minuto.**
7. **Retener el líquido que ha pasado a través de la columna y que se encuentra en el tubo de recogida,** el cual contiene las **especies pequeñas de ARN.** *Si se desea extraer el ARN de mayor tamaño, conservar la columna y proceder con el protocolo del APENDICE A. Sino eliminar la columna.*
8. **Pasar el líquido retenido a un microtubo nuevo de 1.5 ml** ( no suministrado con el kit). Añadir **700 µl de Etanol 95-100%** para obtener una concentración final del 70%. Mezcla por vortex durante 10

segundos. Después de la adición del etanol se podrá apreciar un precipitado, **asegurarse** de que todo el precipitado se añade a la microRNA column.

9. Ensamblar **una microRNA column** con un tubo de recogida que se suministra.
10. Aplicar el líquido retenido + etanol a la **microRNA column**. **Centrifugar durante 1 minuto**. Eliminar el tubo y ensamblar la columna con un nuevo tubo de recogida
11. Repetir el punto 10 si hay más líquido por pasar.
12. Añadir **400 µl de Tampón de Lavado RNA** a la columna y centrifugar durante 1 minuto. Asegurarse que todo el tampón de lavado ha pasado a través de la columna, sino fuera así centrifugar otro minuto adicional.
13. Eliminar el líquido y ensamblar la columna con el tubo de recogida. Añadir **400 µl de Tampón de Lavado RNA** a la columna y centrifugar durante 1 minuto.
14. Realizar un tercer lavado. Añadir **400 µl de Tampón de Lavado RNA** a la columna y centrifugar durante 1 minuto. Eliminar el líquido del tubo de recogida y centrifugar durante 2 minutos adicionales para eliminar todo el etanol residual. Eliminar el tubo de recogida.
15. Colocar la columna en un microtubo nuevo de 1.5 ml (no suministrado con el kit) para eluir el ARN total.
16. Añadir **50 µl de Tampón de Elución RNA** a la columna.
17. Centrifugar durante 2 minutos a **200x g (aprox. 2.000 rpm)**, seguido de 1 minuto a **14.000 x g (aprox. 14.000 rpm)**. Ver la cantidad de eluido de la columna, sino se han eluido los 50 µl centrifugar por 1 minuto adicional a 14.000 x g (aprox. 14.000 rpm).
18. El ARN purificado puede ser conservado a -20°C durante algunos días. Se recomienda que las muestras se conserven a -70°C para almacenamientos largos.

### 3.7 Protocolo de extracción de microARN a partir de tejidos vegetales.

**Nota:** Se recomienda no utilizar más de 30 mg de tejido o  $5 \times 10^6$  células de plantas.

Tejidos frescos o congelados pueden ser utilizados para este procedimiento. Los tejidos deberían congelarse en nitrógeno líquido y transferidos inmediatamente a -70°C. Cuando aislemos microARN de tejidos congelados asegúrese que no desciende mucho su temperatura durante el pesaje y la pulverización con una mano de mortero para asegurarse que la integridad del microARN no se compromete.

1. Colocar el tejido o células en un mortero que contenga un cantidad apropiada de nitrógeno líquido para cubrir la muestra. Pulverizar el tejido utilizando una mano de mortero. Permitir que el nitrógeno líquido se evapore.
2. Pasar la muestra a un microtubo libre de RNAsas (no suministrado) y añadir **400 µl de Tampón de Lisis RNA**. Homogenizar con un homogenizador eléctrico de mano.
3. Centrifugar durante 2 minutos para pellet algún desecho celular que pueda quedar. Pasar el sobrenadante a un microtubo libre RNAsas nuevo (no suministrado). **IMPORTANTE: Anotar la cantidad de sobrenadante/lisado.**
4. Añadir 1 volumen de **etanol 100%** que es equivalente a (**55 µl de etanol 100% es añadido por cada 100 µl de sobrenadante/lisado**). Mezclar por vortex durante 10 segundos.
5. Ensamblar una **Large RNA removal column** con un tubo de recogida que se suministra.
6. Añadir el lisado + etanol a la columna. **Centrifugar durante 1 minuto.**
7. **Retener el líquido que ha pasado a través de la columna y que se encuentra en el tubo de recogida**, el cual contiene las **especies pequeñas de ARN**. *Si se desea extraer el ARN de mayor tamaño, conservar la columna y proceder con el protocolo del APENDICE A. Sino eliminar la columna.*
8. **Pasar el líquido retenido a un** microtubo nuevo de 1.5 ml (no suministrado con el kit). **IMPORTANTE: Anotar el volumen de líquido retenido (140 µl de etanol 100% es añadido por cada 100 µl de líquido retenido)**. Mezclar por vortex durante 10 segundos. Después de la adición del etanol se podrá apreciar un precipitado, **asegurarse** de que todo el precipitado se añade a la microRNA column.
9. Ensamblar **una microRNA column** con un tubo de recogida que se suministra.
10. Aplicar el líquido retenido + etanol a la **microRNA column**. **Centrifugar durante 1 minuto**. Eliminar el tubo y ensamblar la columna con un nuevo tubo de recogida
11. Repetir el punto 10 si hay más líquido por pasar.
12. Añadir **400 µl de Tampón de Lavado RNA** a la columna y centrifugar durante 1 minuto. Asegurarse que todo el tampón de lavado ha pasado a través de la columna, sino fuera así centrifugar otro minuto adicional.
13. Eliminar el líquido y ensamblar la columna con el tubo de recogida. Añadir **400 µl de Tampón de Lavado RNA** a la columna y centrifugar durante 1 minuto.
14. Realizar un tercer lavado. Añadir **400 µl de Tampón de Lavado RNA** a la columna y centrifugar durante 1 minuto. Eliminar el líquido del tubo de recogida y centrifugar durante 2 minutos adicionales para eliminar todo el etanol residual. Eliminar el tubo de recogida.

15. Colocar la columna en un microtubo nuevo de 1.5 ml ( no suministrado con el kit) para eluir el ARN total.
16. Añadir **25-50 µl de Tampón de Elución RNA** a la columna.
17. Centrifugar durante 2 minutos a **200x g (aprox. 2.000 rpm)**, seguido de 1 minuto a **14.000 x g (aprox. 14.000 rpm)**. Ver la cantidad de eluido de la columna, sino se han eluido los 50 µl centrifugar por 1 minuto adicional a 14.000 x g (aprox. 14.000 rpm).
18. El ARN purificado puede ser conservado a -20°C durante algunos días. Se recomienda que las muestras se conserven a -70°C para almacenamientos largos.

## **APENDICE A**

1. Colocar la columna con el tubo de recogida y añadir **400 µl de Tampón de Lavado RNA** a la columna y centrifugar durante 1 minuto. Asegurarse que todo el tampón de lavado ha pasado a través de la columna , sino fuera así centrifugar otro minuto adicional.
2. Eliminar el líquido y ensamblar la columna con el tubo de recogida. Añadir **400 µl de Tampón de Lavado RNA** a la columna y centrifugar durante 1 minuto.
3. Realizar un tercer lavado. Añadir **400 µl de Tampón de Lavado RNA** a la columna y centrifugar durante 1 minuto. Eliminar el líquido del tubo de recogida y centrifugar durante 2 minutos adicionales para eliminar todo el etanol residual. Eliminar el tubo de recogida.
4. Colocar la columna en un microtubo nuevo de 1.5 ml ( no suministrado con el kit) para eluir el ARN total.
5. Añadir **25-50 µl de Tampón de Elución RNA** a la columna.
6. Centrifugar durante 2 minutos a **200x g (aprox. 2.000 rpm)**, seguido de 1 minuto a **14.000 x g (aprox. 14.000 rpm)**. Ver la cantidad de eluido de la columna, sino se han eluido los 50 µl centrifugar por 1 minuto adicional a 14.000 x g (aprox. 14.000 rpm).
7. El ARN purificado puede ser conservado a -20°C durante algunos días. Se recomienda que las muestras se conserven a -70°C para almacenamientos largos.

## **3. GUIA DE PROBLEMAS Y SOLUCIONES**

Recomendamos ponerse en contacto con el servicio técnico de DanaGen-BioTed para cualquier consulta adicional respecto a los protocolos de trabajo o problemas que puedan surgir durante el trabajo.

[info@danagen.es](mailto:info@danagen.es)