



DANAGENE TISSUE/CELLS RNA KIT

Ref. 0801.1 100 extracciones

Ref. 0801.2 500 extracciones

1. INTRODUCCIÓN

Este kit está optimizado para ser un método rápido y eficiente para aislar **ARN total a partir de tejidos y células utilizando MicroSpin Columnas** sin el uso de reactivos tóxicos como el cloroformo o fenol.

El kit DANAGENE TISSUE / CELLS RNA integra una columna de eliminación de ADN genómico. Esta columna elimina rápida y eficientemente la mayor parte de ADN más genómico sin necesidad de digestión por DNasa.

En el primer paso, las células y los tejidos se lisan sin necesidad del uso de β -mercaptoetanol. La sal caotrópica incluida en el tampón de lisis inactiva inmediatamente las RNasas. El lisado se añade a la columna de eliminación de gDNA para clarificar el lisado y eliminar el gDNA contaminante. Después de la adición de la solución de unión al flujo, el ARN se une a la columna de ARN. Posteriormente, dos etapas de lavado eliminan sales, metabolitos y componentes celulares. El ARN de alta calidad se eluye con H₂O libre de ARNasa.

Características:

- **Eficiente y rápido aislamiento de ARN total.**
- **Filtración del lisado y eliminación del ADN genómico en una misma columna.**
- **Completa eliminación de contaminantes e inhibidores.**
- **Tamaño muestra: < 1x 10⁷ células en cultivo; 25 mg tejido animal o humano.**
- **Volumen de elución: 30 μ l.**
- **No se utiliza fenol/cloroformo, gradientes de CICs, ni precipitaciones de LiCl o etanol.**

2. COMPONENTES KIT

	100 extracciones	500 extracciones	Almacenamiento
Tampón de Lisis ARN	45 ml	2 x 100 ml	Temperatura ambiente
Tampón de Precipitación	4 ml	20 ml	Temperatura ambiente
Tampón de Lavado 1	10 ml	50 ml	Temperatura ambiente
Tampón de Lavado 2*	20 ml	4 x 20 ml	Temperatura ambiente
Agua libre nucleasas	8 ml	40 ml	Temperatura ambiente
Columnas gDNA removal	100 unidades	500 unidades	Temperatura ambiente
Columnas unión ARN	100 unidades	500 unidades	Temperatura ambiente
Tubos de Recogida	200 unidades	1000 unidades	Temperatura ambiente

(*) **Estas soluciones deben ser preparadas como se indica en la secciones de Preparaciones Preliminares del protocolo.**

El Tampón de lisis ARN y el Tampón Lavado 1 contienen guanidinio de isotiacianato que es un potente irritante, llevar guantes y gafas protectoras. Ambos tampones pueden formar componentes reactivos peligrosos cuando se combinan con lejía.

Equipos y reactivos necesarios y no provistos con el kit

- Etanol 100 %
- Microcentrifuga.
- Micropipetas
- Microtubos de 1.5 ml y 2.0 ml.
- Homogenizadores generales para homogenizar tejidos animales.
- Nitrógeno líquido.
- Ambiente libre de ARNasas.

3. PROTOCOLO

3.1 Preparaciones Preliminares

- Añadir **80 ml Etanol 100 %** (kit 100 extracciones) **al Tampón de Lavado 2** y unos **80 ml** a cada envase (kit 500 extracciones) indicado en la etiqueta. Mantener el envase bien cerrado para evitar la evaporación del etanol.

3.2 Recomendaciones generales

Toma de muestra e inhibición de las RNAsas

El ARN no está protegido hasta que el material de la muestra se congela instantáneamente o se rompe/lisa en presencia de agentes inhibidores o desnaturalizantes de las RNAsas.

Métodos de recolección de muestras:

- Utilice una muestra recién recolectada para su lisis inmediata y la purificación de ARN.
- Las muestras se pueden almacenar en el tampón de lisis después de la lisis a -70°C durante un año, a 4°C durante un máximo de 24 horas o hasta varias horas a temperatura ambiente. Las muestras congeladas en tampón de lisis deben descongelarse lentamente antes de comenzar con el aislamiento del ARN.
- Congelar la muestra en N_2 líquido inmediatamente después de la recolección y almacenar a 70°C . Esto se puede realizar con un mortero pulverizando la muestra en un estado congelado. Asegúrese de que la muestra no se descongela antes del contacto con el tampón de lisis.
- Las muestras pueden ser sumergidas y almacenadas en **DANAPROTECT SOLUTION o RNeasy**. Antes de usar tales muestras, retire el exceso de DANAPROTECT SOLUTION del tejido antes de usarlo.

Rotura/lisis y homogenización de la muestra

Una eficiente rotura/lisis y homogenización de la muestra es el más importante requerimiento para tener éxito en el proceso de aislamiento del ARN total. Ambos términos son 2 pasos distintos:

Rotura/Lisis: Se requiere una completa rotura de las paredes celulares y membranas plasmáticas de las células y orgánulos para liberar todo el ARN presente en la muestra. Una rotura insuficiente dará lugar a rendimientos bajos.

Homogenización: Es necesaria para reducir la viscosidad del lisado producido. Una incompleta homogenización resultará en una ineficiente unión del ARN a la membrana y por tanto un rendimiento bajo.

Algunos métodos de rotura simultáneamente homogenizan la muestra también (**homogenizadores eléctricos manual**) mientras que otros requieren un paso adicional de homogenización.

3.3 Protocolo para purificación de ARN a partir de tejido animal o humano

Procesar muestras de **hasta 25 mg** de tejido fresco o congelado y pulverizarlo con nitrógeno líquido.

IMPORTANTE: Es esencial para una eficiente preparación de ARN que todo el ARN que contiene la muestra sea liberado de las células por la homogenización con un homogeneizador mecánico (tipo Polytron), tener cuidado en mantener el rotor sumergido para evitar formar mucha espuma y elegir un homogeneizador con un rotor de 5-7 mm que pueda ser utilizado en microtubos.

Para los tejidos frescos y blandos utilizar el homogeneizador; para los tejidos frescos duros o ricos en RNAsas pulverizar con Ni líquido; para los tejidos congelados blandos o pequeñas piezas utilizar el homogeneizador; para todos los demás tejidos congelados pulverizar con Ni líquido.

La purificación de ARN a partir de músculo esquelético, corazón y piel puede tener dificultades debido a la abundancia de proteínas contráctiles, tejido conectivo y colágeno. Para eliminar estas proteínas que pueden interferir con la purificación, la muestra debe ser tratada con proteinasa K.

- 1.** Añadir **400 µl de Tampón de Lisis ARN** al tejido pulverizado con Ni líquido. Homogenizar con homogeneizador eléctrico manual o pasar el lisado 10 veces a través de una jeringa con una aguja 20-G (0.90 mm). Incubar durante 3 minutos a temperatura ambiente.
- 2.** Añadir **30 µl de Tampón de Precipitación**. Vortex e incubar 1 minuto.
- 3.** Centrifugar **3 minutos a máxima velocidad. Pasar el sobrenadante a una columna gDNA removal.**
- 4. Centrifugar 1 minuto a 8.000 rpm.** Transferir el filtrado a un nuevo tubo de centrifuga. *Este paso también elimina gran parte del ADN genómico contaminante, no siendo total para aquellas aplicaciones que requieren una eliminación total, para ello realizar un tratamiento con DNasa I en la columna o una vez eluido el ARN.*
- 5.** Añadir **350 µl de etanol 100% al lisado recogido en el punto 4.** Mezclar bien.
- 6.** Coger una **columna de unión ARN** más su tubo de recolección y añadir el lisado. Centrifugar a **8.000 -10.000 rpm durante 60 segundos.**
- 7.** Añadir **100 µl Tampón de Lavado 1.** Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.
- 8.** Añadir **700 µl Tampón de Lavado 2.** Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.
- 9. Centrifugar 3 minutos a máxima velocidad** para eliminar todo el etanol.
- 10.** Colocar la columna en un microtubo nuevo de 1.5 ml (no suministrado con el kit) para eluir el ARN total.
- 11.** Eluir el ARN en **30 µl de Agua libre de Nucleasas.** Incubar 2 minutos y centrifugar **a máxima velocidad durante 1 minuto.**
- 12.** Repetir el punto 11 utilizando otros **30 µl de Agua libre de Nucleasas.** Incubar 2 minutos y centrifugar **a máxima velocidad durante 1 minuto.** También se puede utilizar el eluido del punto 11 si se requiere una elevada concentración de ARN pero en este caso el rendimiento será de un 25 % menor que si se realiza una segunda elución.

3.4 Protocolo para purificación de ARN a partir de células en cultivo (1×10^7)

Células cultivadas adheridas en una placa

Eliminar el medio de cultivo y lavar las células con PBS. Aspirar el PBS y añadir 0.10-0.30 % de tripsina en PBS e incubar hasta que las células se separen de la superficie de la placa. Entonces, añadir medio de cultivo y traspasar las células a un tubo apropiado y centrifugar para obtener el pellet celular. Eliminar el sobrenadante y proceder con el punto 1.

Células cultivadas en suspensión

Transferir las células en cultivo (hasta 1×10^7) a un microtubo estéril de 1.5 ml. Centrifugar a 6000 x g durante 1 minuto. Eliminar el sobrenadante y proceder con el punto 1.

1. Añadir **400 μ l de Tampón de Lisis ARN** y resuspender las células con la micropipeta. Incubar durante 15-20 minutos a temperatura ambiente.
2. Añadir **30 μ l de Tampón de Precipitación**. Vortex e incubar 1 minuto.
3. Centrifugar **3 minutos a máxima velocidad. Pasar el sobrenadante a una columna gDNA removal.**
4. **Centrifugar 1 minuto a 8.000 rpm.** Transferir el filtrado a un nuevo tubo de centrifuga. *Este paso también elimina gran parte del ADN genómico contaminante, no siendo total para aquellas aplicaciones que requieren una eliminación total, para ello realizar un tratamiento con DNasa I en la columna o una vez eluido el ARN.*
5. Añadir **350 μ l de etanol 100% al lisado recogido en el punto 4.** Mezclar bien.
6. Coger una **columna de unión ARN** más su tubo de recolección y añadir el lisado. Centrifugar a **8.000 -10.000 rpm durante 60 segundos.**
7. Añadir **100 μ l Tampón de Lavado 1.** Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.
8. Añadir **700 μ l Tampón de Lavado 2.** Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.
9. **Centrifugar 3 minutos a máxima velocidad** para eliminar todo el etanol.
10. Colocar la columna en un microtubo nuevo de 1.5 ml (no suministrado con el kit) para eluir el ARN total.
11. Eluir el ARN en **30 μ l de Agua libre de Nucleasas.** Incubar 2 minutos y centrifugar **a máxima velocidad durante 1 minuto.**
12. Repetir el punto 11 utilizando otros **30 μ l de Agua libre de Nucleasas.** Incubar 2 minutos y centrifugar **a máxima velocidad durante 1 minuto.** También se puede utilizar el eluido del punto 11 si se requiere una elevada concentración de ARN pero en este caso el rendimiento será de un 25 % menor que si se realiza una segunda elución.

4. APÉNDICE

DNasa digestión en solución

El paso de la muestra lisada a través de una columna gDNA removal de acuerdo con el protocolo estándar es muy eficaz en la unión del ADN , dando lugar a un mínimo de ADN residual en el ARN purificado. El ADN residual no será detectable en la mayoría de las aplicaciones posteriores. A pesar de ello, todavía hay ciertas aplicaciones que requieren contenidos aún más bajos de ADN residual. Sin embargo, la eliminación del ADN a un nivel completamente indetectable es complicado y la eficiencia de la columna de eliminación de gDNA a veces no es suficiente para aplicaciones posteriores que requieren un contenido residual más bajo de ADN. Esto puede ocurrir especialmente en casos donde se procesa una gran cantidad de muestra o una muestra que contiene mucho ADN. La cantidad de ADN residual detectado depende del tipo de muestra, la cantidad y su contenido de ADN y la sensibilidad de detección del método utilizado para analizar el ADN residual.

La digestión del ADN en solución puede destruir eficientemente el ADN contaminante. Sin embargo, normalmente se requiere un control estricto de RNasas y posterior repurificación del ARN (con el fin de eliminar tampón, sales, ADNasa y ADN digerido).

Recomendamos el uso de nuestro **DANAGENE DNA Removal Kit** (ref.0807) que proporciona un método para eliminar el ADN genómico contaminante en preparaciones de ARN utilizando 2 filtraciones secuenciales con diferentes columnas. Se debe tener en cuenta que este método reduce la cantidad de ARN, es por ello que es importante decidir si es necesario la eliminación completa del posible ADN contaminante para la realización de nuestra aplicación posterior.

5. GUIA DE PROBLEMAS Y SOLUCIONES

Para cualquier duda o consulta adicional sobre el protocolo pónganse en contacto con el servicio técnico de DANAGEN-BIOTED S.L info@danagen.es