



DANAGENE microRNA KIT

Ref. 0805 50 extracciones

1. INTRODUCCIÓN

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 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.**

Características:

- **Eficiente extracción de moléculas pequeñas de ARN utilizando 2 columnas resultando en una mínima contaminación de moléculas mayores de ARN y ADN genómico.**
- **Protocolo rápido: 25 minutos.**
- **El microRNA es aislado sin la utilización de reactivos tóxicos como fenol o cloroformo.**
- **El microRNA aislado puede ser utilizado en varias aplicaciones posteriores**
- **Volumen de elución: 30 µl.**

2. COMPONENTES KIT

	50 extracciones	Almacenamiento
Tampón de Lisis ARN	20 ml	Temperatura ambiente
Tampón de Lavado 1	6 ml	Temperatura ambiente
Tampón de Lavado 2*	10 ml	Temperatura ambiente
Agua libre nucleasas	4 ml	Temperatura ambiente
Large RNA removal column	50 unidades	Temperatura ambiente
Columnas unión microARN	50 unidades	Temperatura ambiente
Tubos de Recogida	150 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 isotiocianato 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.
- β -mercaptoetanol.

3. PROTOCOLO

3.1 Preparaciones Preliminares

- Añadir **40 ml Etanol** 100 % al **Tampón de Lavado 2** indicado en la etiqueta. Mantener el envase bien cerrado para evitar la evaporación del etanol.
- **OPCIONAL:** El uso de β -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 . **Preparar una cantidad apropiada de Tampón de Lisis RNA añadiendo 10 μ l β -mercaptoetanol por 1 ml de Tampón de Lisis RNA.** Alternativamente, la Solución de Lisis RNA puede ser utilizada tal y como es suministrada.

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 -80°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. Asegurarse 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 RNAlater**. 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. 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 microARN a partir de tejido animal

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

1. 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.
2. Pasar la muestra a un microtubo libre de RNAsas (no suministrado) y 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 5 minutos a temperatura ambiente.**
3. Centrifugar **3 minutos a máxima velocidad.**
4. 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 a 10.000 rpm.**
8. **Retener el liquido 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.**
9. Añadir **700 µl de etanol 100% al lisado recogido en el punto 8.** Mezclar bien.
10. Pasar la mitad del lisado a una **Columna Unión microRNA** con su tubo de recolección. **Centrifugar a 10.000 rpm durante 30 segundos.**
11. Colocar la columna en un nuevo tubo de recolección. **Pasar la otra mitad y centrifugar a 10.000 rpm durante 30 segundos.**
12. Añadir **100 µl Tampón de Lavado 1.** Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.
13. Añadir **700 µl Tampón de Lavado 2.** Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.
14. **Centrifugar 3 minutos a máxima velocidad** para eliminar todo el etanol.
15. Colocar la columna en un microtubo nuevo de 1.5 ml (no suministrado con el kit) para eluir el microARN .
16. Elución con **25-30 µl Agua libre de nucleasas.** 2 minutos de incubación.

Es muy importante añadir el agua libre de nucleasas en el centro de la membrana para que se humedezca completamente.

17. **Centrifugar a 10.000 rpm velocidad durante 60 segundos.** Recoger los 25-30 μl y volver a depositar en el centro de la membrana. Esto hace aumentar el rendimiento.

18. **Incubar 2 minutos y centrifugar a máxima velocidad.** Ahora el microtubo contiene los microRNAs. Utilizar o almacenar a -20°C o -80°C .

3.4 Protocolo para purificación de microARN a partir de células en cultivo ($< 1 \times 10^7$)

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 $6000 \times g$ durante 1 minuto. Eliminar el sobrenadante y proceder con el punto 1.

1. Añadir **400 μl de Tampón de Lisis ARN.** Lisar las células utilizando la micropipeta arriba-abajo para disolver el pellet celular. Asegurarse que todo el pellet está disuelto antes de proceder con el siguiente paso.

2. Añadir **210 μl etanol 100%** al lisado. Mezclar por vortex durante 10 segundos.

3. Ensamblar una **Large RNA removal column** con un tubo de recogida que se suministra.

4. Añadir el lisado + etanol a la columna. **Centrifugar durante 1 minuto a 10.000 rpm.**

5. Retener el liquido 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.**

6. Añadir **700 μl de etanol 100% al lisado recogido en el punto 5.** Mezclar bien.

7. Pasar la mitad del lisado a una **Columna Unión microRNA** con su tubo de recolección. **Centrifugar a 10.000 rpm durante 30 segundos.**

8. Colocar la columna en un nuevo tubo de recolección. **Pasar la otra mitad y centrifugar a 10.000 rpm durante 30 segundos.**

9. Añadir **100 μl Tampón de Lavado 1.** Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.

10. Añadir **700 μl Tampón de Lavado 2.** Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.

11. Centrifugar 3 minutos a máxima velocidad para eliminar todo el etanol.

12. Colocar la columna en un microtubo nuevo de 1.5 ml (no suministrado con el kit) para eluir el microARN .

13. Elución con **25-30 µl Agua libre de nucleasas**. 2 minutos de incubación.

Es muy importante añadir el agua libre de nucleasas en el centro de la membrana para que se humedezca completamente.

14. **Centrifugar a 10.000 rpm velocidad durante 60 segundos. Recoger los 25-30 µl y volver a depositar en el centro de la membrana.** Esto hace aumentar el rendimiento.

15. **Incubar 2 minutos y centrifugar a máxima velocidad.** Ahora el microtubo contiene los microRNAs. Utilizar o almacenar a -20°C o -80°C.

3.5 Protocolo de extracción de microARN a partir de bacterias.

Nota: Se recomienda no utilizar más de 1×10^9 células /ml, el crecimiento bacteriano puede ser medido por un espectrofotómetro, como regla general, un cultivo de E.coli de 1×10^9 células /ml tiene una DO₆₀₀ 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 **(aprox. 14.000 rpm) durante 1 minuto.**
2. Eliminar el sobrenadante y resuspender utilizando la micropipeta adecuada 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 **210 µl etanol 100%** al 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 a 10.00 rpm.**
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.**
8. Añadir **700 µl de etanol 100% al lisado recogido en el punto 7.** Mezclar bien.
9. Pasar la mitad del lisado a una **Columna Unión microRNA** con su tubo de recolección. **Centrifugar a 10.000 rpm durante 30 segundos.**
10. Colocar la columna en un nuevo tubo de recolección. **Pasar la otra mitad y centrifugar a 10.000 rpm durante 30 segundos.**
11. Añadir **100 µl Tampón de Lavado 1.** Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.

12. Añadir **700 µl Tampón de Lavado 2**. Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.

13. Centrifugar 3 minutos a máxima velocidad para eliminar todo el etanol.

14. Colocar la columna en un microtubo nuevo de 1.5 ml (no suministrado con el kit) para eluir el microARN .

15. Elución con **25-30 µl Agua libre de nucleasas**. 2 minutos de incubación.

Es muy importante añadir el agua libre de nucleasas en el centro de la membrana para que se humedezca completamente.

16. **Centrifugar a 10.000 rpm velocidad durante 60 segundos. Recoger los 25-30 µl y volver a depositar en el centro de la membrana.** Esto hace aumentar el rendimiento.

17. **Incubar 2 minutos y centrifugar a máxima velocidad.** Ahora el microtubo contiene los microRNAs. Utilizar o almacenar a -20°C o -80°C.

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 % β-mercaptoetanol y 1 unidad / ml 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 (**aprox. 14.000 rpm**) durante **1 minuto**.

2. Eliminar el sobrenadante y resuspender utilizando la micropipeta adecuada el pellet en **100 µl del Tampón de Resuspensión con la cantidad apropiada de liticasa**. Incubar a 37°C durante 10 minutos.

3. Añadir **300 µl de Tampón de Lisis RNA** y vortex durante 15 segundos.

4. Añadir **210 µl etanol 100%** al 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 a 10.00 rpm**.

7. Retener el liquido 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**.

8. Añadir **700 µl de etanol 100%** al lisado recogido en el punto 7. Mezclar bien.

9. Pasar la mitad del lisado a una **Columna Unión microRNA** con su tubo de recolección. **Centrifugar a 10.000 rpm durante 30 segundos**.

10. Colocar la columna en un nuevo tubo de recolección. **Pasar la otra mitad y centrifugar a 10.000 rpm durante 30 segundos.**
11. Añadir **100 µl Tampón de Lavado 1**. Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.
12. Añadir **700 µl Tampón de Lavado 2**. Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.
- 13. Centrifugar 3 minutos a máxima velocidad** para eliminar todo el etanol.
14. Colocar la columna en un microtubo nuevo de 1.5 ml (no suministrado con el kit) para eluir el microARN .
15. Elución con **25-30 µl Agua libre de nucleasas**. 2 minutos de incubación.

Es muy importante añadir el agua libre de nucleasas en el centro de la membrana para que se humedezca completamente.

16. **Centrifugar a 10.000 rpm velocidad durante 60 segundos. Recoger los 25-30 µl y volver a depositar en el centro de la membrana.** Esto hace aumentar el rendimiento.
17. **Incubar 2 minutos y centrifugar a máxima velocidad.** Ahora el microtubo contiene los microRNAs. Utilizar o almacenar a -20°C o -80°C.

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

Nota: Se recomienda no utilizar más de 30 mg de tejido o 5×10^6 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 aislamos 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 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.
2. Pasar la muestra a un microtubo libre de RNAsas (no suministrado) y 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 5 minutos a temperatura ambiente.**
3. Centrifugar **3 minutos a máxima velocidad.**
4. 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 a 10.000 rpm.**
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.**
9. Añadir **700 µl de etanol 100% al lisado recogido en el punto 8.** Mezclar bien.
10. Pasar la mitad del lisado a una **Columna Unión microRNA** con su tubo de recolección. **Centrifugar a 10.000 rpm durante 30 segundos.**
11. Colocar la columna en un nuevo tubo de recolección. **Pasar la otra mitad y centrifugar a 10.000 rpm durante 30 segundos.**
12. Añadir **100 µl Tampón de Lavado 1.** Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.
13. Añadir **700 µl Tampón de Lavado 2.** Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.
14. **Centrifugar 3 minutos a máxima velocidad** para eliminar todo el etanol.
15. Colocar la columna en un microtubo nuevo de 1.5 ml (no suministrado con el kit) para eluir el microARN .
16. Elución con **25-30 µl Agua libre de nucleasas.** 2 minutos de incubación.

Es muy importante añadir el agua libre de nucleasas en el centro de la membrana para que se humedezca completamente.

17. **Centrifugar a 10.000 rpm velocidad durante 60 segundos.** Recoger los 25-30 µl y volver a depositar en el centro de la membrana. Esto hace aumentar el rendimiento.
18. **Incubar 2 minutos y centrifugar a máxima velocidad.** Ahora el microtubo contiene los microRNAs. Utilizar o almacenar a -20°C o -80°C.

4. 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