

DANAGENE microRNA and Cell-free RNA MiniKit

Ref. 0806.1 50 extracciones

1. INTRODUCCIÓN

Este kit está optimizado para ser un método rápido y eficiente para aislar **microRNA y Cell-free RNA a partir de biopsia líquidas, incluyendo suero, plasma y otros biofluidos** sin el uso de reactivos tóxicos como el cloroformo o fenol.

Este kit permite aislar todos los ARN de tamaño inferior a 1.000 nt, mRNA, tRNA, microRNA y siRNA.

Características:

- **Eficiente aislamiento de microRNA y Cell-free RNA a partir de muestras de biofluidos sin el uso de fenol/cloroformo.**
- **Procedimiento simple y rápido utilizando MicroSpin columnas..**
- **Completa eliminación de contaminantes e inhibidores.**
- **Tamaño muestra: 300 µl (hasta 600 µl con múltiples cargas de la columna).**
- **Volumen de elución: 25-30 µl.**
- **Rendimiento: Depende del origen, calidad y conservación de la muestra.**

Aplicaciones:

- **Método efectivo para la detección de biomarcadores en cáncer y otras enfermedades.**
- **Aplicaciones posteriores típicas: PCR, PCR cuantitativa, Northern Blot, Hibridación de chips.**

2. COMPONENTES KIT

	50 extracciones	Almacenamiento
Tampón de Lisis	10 ml	Temperatura ambiente
Tampón Precipitación Proteínas	4 ml	Temperatura ambiente
Tampón Unión microRNA	2 x 50 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
Columna Unión microRNAs	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.

3. PROTOCOLO

3.1 Preparaciones Preliminares

- **El Tampón de Lisis, Tampón Unión microRNA y el Tampón de Lavado 1** contienen **tiocianato de guanidina** que es un agente irritante, por esta razón, recomendamos el uso de gafas y guantes para su manipulación.
- 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.

3.2 Recomendaciones generales

Tamaño muestra

El procedimiento estándar permite procesa muestras de **300 µl** de muestra. Si mayores volúmenes de muestra se requiere para aumentar la sensibilidad (hasta 600 µl), los volúmenes de los siguientes tampones deben ser incrementados proporcionalmente, Tampón de Lisis, Tampón Precipitación de Proteínas y Tampón de Unión microRNA.

Aunque se debe considerar que doblar el volumen inicial sólo producirá un incremento de 1-1.5 en el valor Ct en qRT-PCR, lo cual es bastante insignificante para la sensibilidad de la detección en comparación con las diferencias mucho mayores que se producen de muestra a muestra o entre diferentes miRNAs. Además, si la calidad de la muestra no es muy buena, se pueden co-purificar inhibidores de la RT-PCR que requerirá la dilución del eluido y con ello contrarrestar el aumento de los rendimientos.

Tipos de muestras

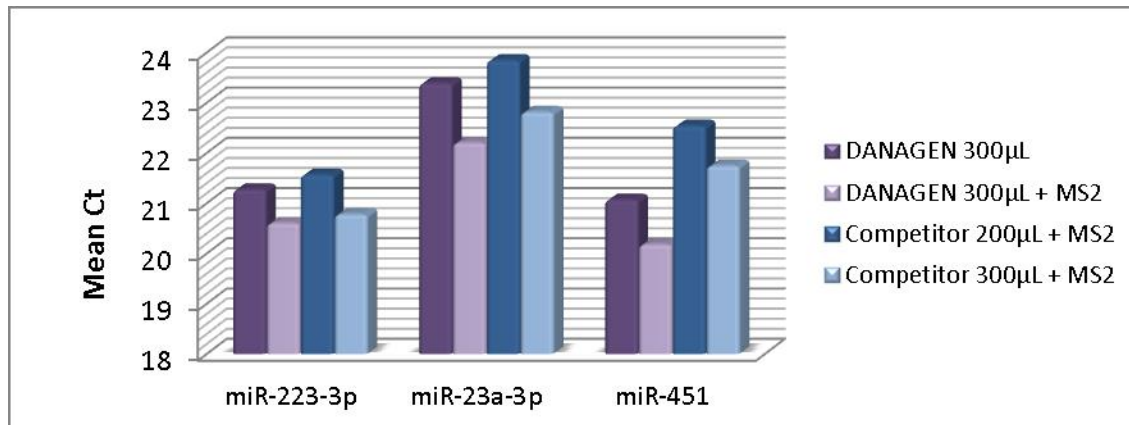
Plasma/suero: Evitar trabajar con muestras que se observe hemólisis. Después de la obtención del plasma o suero, es importante centrifugar la muestra para obtener un material inicial libre de células.

Orina: Se pueden obtener pocas cantidades y tipos de microRNAs en la orina, aunque en ciertos estados fisiológicos o enfermedades se puede observar un incremento en los niveles de microRNAs. Es importante centrifugar la muestra para obtener un material inicial libre de células previo a su almacenamiento mejor que previo al proceso de extracción.

Líquido cerebroespinal: Contiene unos niveles muy bajos de microRNAs y elevada presencia de inhibidores. No obstante, ciertos estados de enfermedades producen un incremento en los niveles de microRNAs. Es importante centrifugar la muestra para obtener un material inicial libre de células previo a su almacenamiento mejor que previo al proceso de extracción.

Adición de carrier

Para incrementar la unión de los microRNAs a la columna y la reproducibilidad en los resultados, **SE RECOMIENDA altamente el uso MS2 RNA**, ROCHE Ref.10165948001.



Diferentes microRNAs fueron cuantificados por PCR en tiempo real. La media del Ct de tres reacciones en cada condición se muestran en la figura. Para todos los miRNAs probados el valor de Ct fue menor con el kit de DANAGEN usando el mismo volumen de muestra. **Los valores de Ct usando el kit de DANAGEN mejoraron cuando se añadió MS2.**

3.3 Protocolo para la extracción de microRNAs y Cell-free RNA a partir de muestras de 300 µl

1. Pipetear en un microtubo **300 µl de muestra + 90 µl de Tampón de Lisis**. Mezclar por vortex 5 segundos .No incubar más de 3 minutos a temperatura ambiente. *Si utiliza el MS2 de Roche añadir 3.75 µl por cada 300 µl de muestra.*
2. Añadir **30 µl de Tampón Precipitación Proteínas**. Vortex 5 segundos. Incubar 1 minuto a temperatura ambiente.
3. Centrifugar durante **3 minutos a 11.000 x g** para obtener el pellet proteico.
4. **Traspasar el sobrenadante** a un nuevo microtubo.
5. Añadir **1000 µl Tampón Unión microRNA** .Mezclar bien.
6. Pasar la mitad del lisado a una **Columna Unión microRNAs** con su tubo de recolección. Incubar 2 minutos. **Centrifugar a 8.000 rpm durante 30 segundos.**
7. Colocar la columna en un nuevo tubo de recolección. **Pasar la otra mitad y centrifugar a 8.000 rpm durante 30 segundos.**
8. Añadir **100 µl Tampón de Lavado 1**. Centrifugar a 11.000 x g durante 1 minuto.
9. Añadir **700 µl Tampón de Lavado 2**. Centrifugar a 11.000 x g durante 1 minuto.
10. **Centrifugar 3 minutos a máxima velocidad** para eliminar todo el etanol.
11. 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.

12. **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.
13. **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