



DANAGENE PLANT RNA KIT

REF.0802.1 100 EXTRACCIONES

REF.0802.2 500 EXTRACCIONES

1.INTRODUCCION

1.1 Descripción del producto

Este kit permite la obtención de **ARN total libre de ADN** a partir de diferentes tejidos y células de plantas y muestras de hongos utilizando para ello **columnas con una membrana de sílica**.

El procedimiento incluye una pulverización de la muestra con Ni líquido, seguido de una incubación en la solución de lisis que inactiva inmediatamente las RNasas y crea las condiciones de unión apropiadas para la absorción del ARN en la membrana de sílica. Junto con la solución de lisis se añade una **solución de PVP** (polivinilpirrolidona) que actúa uniendo contaminantes como polisacáridos y polifenoles que pueden interferir o degradar el ARN.

Las sales, metabolitos y componentes celulares son eliminados por 2 pasos de lavado. Finalmente, el ARN es eluido con agua libre de nucleasas.

DANAGENE PLANT RNA KIT contiene 2 diferentes soluciones de lisis, una basada en guanidín tiocianato, **Tampón de Lisis 1**, la más recomendada debido a su fuerte propiedad desnaturalizante y otra en guanidín HCl, **Tampón de Lisis 2** ya que en algunas plantas y mohos la presencia de determinados metabolitos conduce a una solidificación del lisado, no siendo posible su procesamiento, en tales casos se utiliza la solución de lisis con guanidín HCl (Tampón de Lisis 2)

Características:

- **Eficiente y rápido aislamiento de ARN total en 30 minutos.**
- **Incluye 2 alternativas como tampón de lisis.**
- **Completa eliminación de contaminantes e inhibidores.**
- **Tamaño muestra: hasta 100 mg (tejido planta fresco); hasta 25 mg (tejido planta seco)**
- **Volumen de elución: 30-60 µl.**
- **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 1	45 ml	2 x 100 ml	Temperatura ambiente
Tampón de Lisis 2	45 ml	2 x 100 ml	Temperatura ambiente
Tampón de Precipitación	4 ml	20 ml	Temperatura ambiente
Solución de PVP	4.5 ml	22 ml	4°C
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 lisis1 y el Tampón lavado 1 contienen guanidinio de isotiocianato y el Tampón de Lisis 2 contiene guanidinio HCl ambos son potentes irritantes, 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.
- Homogenizador eléctrico manual para homogenizar tejidos (tipo polytron).
- Nitrógeno líquido.
- β-mercaptoetanol.
- 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 desnaturizantes de las RNAsas.

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.

La técnica más comúnmente utilizada para la rotura de los tejidos de plantas es la trituración de la muestra a un polvo fino en presencia de N₂ líquido en un mortero. Asegúrese de que la muestra no se descongela durante o después de la trituración o el pesaje y agregue el polvo congelado a una alícuota apropiada del Tampón de Lisis, respectivamente y mezcle inmediatamente. El tejido roto debe ser homogeneizado o pasando ≥ 5 a través de una aguja de 0,9 mm.

3.3 Protocolo para purificación de ARN total a partir de tejido de plantas o hongos

Procesar muestras de **hasta 100 mg** de tejido fresco o congelado y pulverizarlo con nitrógeno líquido. Para tejido seco hasta muestras **de 25 mg**.

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.
- El uso de β -mercaptoetanol en la lisis es altamente recomendado para tejidos vegetales, particularmente en aquellos que se sabe que tienen un alto contenido en RNAsas. También se recomienda para aquellos usuarios que quieren aislar RNA para aplicaciones muy sensibles o enriquecimiento de microRNA. Alternativamente, la Solución de Lisis RNA puede ser utilizada tal y como es suministrada.
- Cuando se empieza a trabajar con un tejido nuevo, se recomienda utilizar ambas soluciones de lisis para ver cual es la que tiene mejor rendimiento.

1. Añadir **400 µl de Tampón de Lisis + 40 µl Solución de PVP + 4.0 µl de β-mercaptoetanol** 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.
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.

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

Dada la gran variedad de muestras que se pueden tratar para extraer ARN con este kit se hace difícil poder generalizar los posibles problemas y soluciones. Es por ello, que recomendamos que no duden en 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