



## DANAGENE TISSUE/CELLS RNA KIT

Ref. 0801.1 100 preps

Ref. 0801.2 500 preps

### 1. INTRODUCTION

This kit provides a method for an efficient and fast **total RNA from tissues and cells using MiniSpin columns.**

The DANAGENE TISSUE/CELLS RNA Kit integrates a gDNA Removal Column. This Mini spin column removes quickly and efficiently the most genomic DNA without the need of DNase digestion.

In the first step cells and tissues are lysed without the need of  $\beta$ -mercapthoethanol. The chaotropic salt included in the lysis buffer immediately inactivates RNases. The lysate is added to the gDNA Removal Column to clarify the lysate and to remove contaminating gDNA. After addition of the binding solution to the flow-through, the RNA is bound to the RNA Column. Afterwards, two washing steps remove salts, metabolites, and macromolecular cellular components. High quality RNA is eluted with RNase-free H<sub>2</sub>O.

#### Features:

- **Fast procedure delivering high-quality total RNA in minutes.**
- **Convenient handling – lysate clearing and gDNA removal with one column in one step.**
- **Sample Material: < 1 x 10<sup>7</sup> cultured cells; 25 mg animal/human tissue.**
- **No phenol/chloroform extraction, no CsCl gradients, no LiCl or ethanol precipitation.**

## 2. KIT COMPONENTS

	100 extracciones	500 extracciones
RNA Lysis Buffer	45 ml	2 x 100 ml
RNA Precipitation Buffer	4 ml	20 ml
RNA Wash Buffer 1	10 ml	50 ml
RNA Was Buffer 2*	10 ml	10 ml
Nuclease-Free water	8 ml	40 ml
gDNA Removal Column	100 units	500 units
RNA Column	100 units	500 units
Collection Tubes	200 units	1000 units

(\*) These solutions must be prepared as indicated in the Preliminary Preparations section of the protocol.

*PRECAUTIONS: The RNA Lysis Buffer and RNA Wash solution 1 contains guanidium salts, and should be handled with care. Guanidinium salts form highly reactive compounds when combined bleach.*

### Equipment and additional reagents required

- 100 % Ethanol.
- Microcentrifuge.
- RNase-free 1.5 ml or 2.0 ml microfuge tubes.
- Mechanical homogenizer.
- Liquid Nitrogen , mostar and pestle.

## 3. PROTOCOL

### 3.1 Preliminary Preparations

- Add **40 ml Ethanol 100 %** (kit 100 preps) **to RNA Wash Buffer 2** and **200 ml** (kit 500 preps). Keep the container closed to avoid the ethanol evaporation.

### 3.2 General remarks

#### 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  $-70^{\circ}\text{C}$  durante un año, a  $4^{\circ}\text{C}$  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  $\text{N}_2$  líquido inmediatamente después de la recolección y almacenar a  $70^{\circ}\text{C}$ . 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 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 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  $\text{N}_2$  líquido; para los tejidos congelados blandos o pequeñas piezas utilizar el homogeneizador; para todos los demás tejidos congelados pulverizar con  $\text{N}_2$  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 (<math>1 \times 10^7</math>)

#### **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  $1 \times 10^7$ ) 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  $\mu$ l de Tampón de Lisis ARN** y resuspender las células con la micropipeta. Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
2. Añadir **30  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ l Tampón de Lavado 1.** Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.
8. Añadir **700  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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](mailto:info@danagen.es)