



DANAGENE BACTERIA RNA KIT

Ref.0804.1 100 extracciones

Ref.0804.2 500 extracciones

1. INTRODUCCIÓN

DANAGENE BACTERIA RNA Kit este kit permite la obtención de **ARN total** a partir de diferentes cultivos de bacterias y levaduras, sin la utilización de reactivos tóxicos.

El procedimiento incluye una lisis celular seguido de una precipitación de las proteínas y parte del ADN genómico. Luego mediante una precipitación con isopropanol se obtiene el ARN total que finalmente es rehidratado.

Las bacterias Gram (-) no presentan ningún problema, en cambio, las bacterias Gram (+) y levaduras son más difíciles de lisar, es por ello necesario, la preincubación con enzimas líticos (no suministrados con el kit). En el caso de bacterias Gram (+) se utiliza lisozima, y en el caso de las levaduras, zimolasa o liticasa.

Características:

- **Método rápido y fácil para una purificación de ARN total a partir de bacterias.**
- **Método seguro, ya que NO se utilizan reactivos TÓXICOS.**
- **El ARN se aísla sin el uso de productos químicos nocivos como el fenol o el cloroformo.**
- **Se pueden procesar 100 muestras de cultivos de bacterias de 1 ml.**

2. COMPONENTES KIT

	100 extracciones	500 extracciones	Stock
Solución de Lisis	60 ml	300 ml	Tªambiente
Solución Precipitación de proteínas	30 ml	150 ml	Tªambiente
Solución de Hidratación	10 ml	50 ml	Tªambiente

2.1 Equipos y reactivos necesarios y no provistos

- Microcentrifuga.
- Microtubos de 1.5 ml y 2.0 ml.
- Etanol 70%.
- Isopropanol.
- Lisozima/ Liticasa o zimolasa.
- Baño de agua, baño seco o bloque con calefacción (90°C).

3. PROTOCOLO

3.1 Consideraciones Preliminares

Las RNAsas se encuentran tanto en procariotas como en eucariotas, y prácticamente en todos los tipos celulares. La principal fuente de RNAsas son los microorganismos (bacterias, hongos y sus esporas) y sus derivados (enzimas de restricción, polimerasas, etc).Por tanto, se encuentran por todas partes en un laboratorio de Biología Molecular.

PRECAUCIONES:

1. Utilizar guantes para prevenir la contaminación de las RNAsa presentes en las manos.
2. Cambiar frecuentemente de guantes.
3. Disponer de un juego de pipetas para trabajar exclusivamente con ARN.
4. Utilizar tubos y pipetas que estén garantizados libres de RNAsas.
5. Utilizar reactivos y compuestos químicos libres de RNAsas.
6. Utilizar una zona exclusiva en el laboratorio donde trabajar con ARN.

3.2 Protocolo de extracción de ARN total a partir de cultivos bacterianos de 1ml de Gram(-) o Gram(+)

Las bacterias Gram(+) son más difíciles de lisar es por ello que se recomienda la incubación con enzimas líticos. Para ciertas especies de Staphylococcus una mezcla de lisozima (10 mg/ ml) y lisostafina (10 mg / ml) es necesaria.

1. Añadir 1ml de un cultivo "overnight" a un tubo de 1.5 ml.
2. Centrifugar a 14.000 x g durante 30 segundos. Eliminar el sobrenadante. **Para bacterias Gram(+) proceder con el punto 3. Para bacterias Gram(-) ir directamente al punto 6.**
3. Resuspender las células en 540 µl de agua libre de nucleasas o EDTA 50 mM.
4. Añadir 60 µl de Lisozima (10 mg/ml). El propósito de este tratamiento es debilitar la pared celular para hacer más eficiente la lisis celular.
5. Incubar la muestra a 37°C durante 60 minutos. Invertir la muestra periódicamente durante la incubación. Centrifugar a 14.000 x g durante 2 minutos. Eliminar el sobrenadante.
6. Añadir 600 µl de **Solución de Lisis** al pellet celular y pipetear para resuspender y lisar las células.
7. Incubar la muestra a 65°C durante 5 minutos. Enfriar la muestra a temperatura ambiente.
8. Añadir 300 µl de **Solución Precipitación de Proteínas**. Invertir el tubo unas 8-10 veces y incubar en hielo durante 5 minutos.
9. Centrifugar a 14.000 x g durante 5 minutos. Se observará que el precipitado proteico forma un pellet.
10. Pasar el sobrenadante que contiene el ARN a un tubo que contenga a 600 µl de **Isopropanol**. Mezclar por inversión varias veces.
11. Centrifugar a 14.000 x g durante 3 minutos.
12. Eliminar el sobrenadante. Añadir 600 µl de **Etanol 70 %** e invertir varias veces para lavar el pellet de ARN.

13. Centrifugar a 14.000 x g durante 2 minutos. Cuidadosamente eliminar todo el etanol. Vigilar no perder el pellet.
14. Invertir el tubo y dejar secar en papel absorbente durante 10 minutos.
15. Añadir 100 µl de **Solución de Hidratación**. Pipetear para resuspender el pellet.
16. Permitir rehidratarse el ARN al menos durante 30 minutos en hielo. Pipetear para resuspender el pellet.
17. Conservar las muestras a -70°C.

Si el ARN extraído será utilizado en RT-PCR, para eliminar el ADN contaminante utilizar nuestro DANAGENE DNA Removal Kit

3.3 Protocolo de extracción de ARN total a partir de cultivos de levaduras de 1ml

1. Añadir 1ml de un cultivo "overnight" a un tubo de 1.5 ml.
2. Centrifugar a 14.000 x g durante 2 minutos. Eliminar el sobrenadante .
3. Resuspender las células en 592 µl de agua libre de nucleasas o 50 EDTA 50 mM.
4. Añadir 8 µl de Liticasa o Zimolasa (20 mg/ml). El propósito de este tratamiento es debilitar la pared celular para hacer más eficiente la lisis celular.
5. Incubar la muestra a 37°C durante 60 minutos. Invertir la muestra periódicamente durante la incubación. Centrifugar a 14.000 x g durante 2 minutos. Eliminar el sobrenadante.
6. Añadir 600 µl de **Solución de Lisis** al pellet celular y pipetear para resuspender y lisar las células.
7. Incubar la muestra a 65°C durante 5 minutos. Enfriar la muestra a temperatura ambiente.
8. Añadir 300 µl de **Solución Precipitación de Proteínas**. Invertir el tubo unas 8-10 veces y incubar en hielo durante 5 minutos.
9. Centrifugar a 14.000 x g durante 5 minutos. Se observará que el precipitado proteico forma un pellet.
10. Pasar el sobrenadante que contiene el ARN a un tubo que contenga a 600 µl de **Isopropanol**. Mezclar por inversión varias veces.
11. Centrifugar a 14.000 x g durante 3 minutos.
12. Eliminar el sobrenadante. Añadir 600 µl de **Etanol 70 %** e invertir varias veces para lavar el pellet de ARN.
13. Centrifugar a 14.000 x g durante 2 minutos. Cuidadosamente eliminar todo el etanol. Vigilar no perder el pellet.
14. Invertir el tubo y dejar secar en papel absorbente durante 15 minutos.
15. Añadir 100 µl de **Solución de Hidratación**. Pipetear para resuspender el pellet.
16. Permitir rehidratarse el ARN al menos durante 30 minutos en hielo. Pipetear para resuspender el pellet.
17. Conservar las muestras a -70°C.

Si el ARN extraído será utilizado en RT-PCR, para eliminar el ADN contaminante utilizar nuestro DANAGENE DNA Removal Kit

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