



3.2 Protocolo de extracción simultánea de ARN total y ADN genómico a partir de muestras de saliva conservada

Extracción ARN total

1. Agitar bien el tubo que contiene 1 ml de saliva conservado en el DANASALIVA RNA Sample Collection Kit. **Es importante** que se vea una solución homogénea.
2. En un microtubo con **25 ul de Proteinasa K** añadir **600 ul de la saliva conservada. Incubar a 55°C durante 45 minutos.**
3. Incubar a **90°C durante 15 minutos.**
4. Colocar los microtubos a 4°C durante 10 minutos.
5. Añadir **200 µl Tampón de Precipitación. Vortex.**
6. **Centrifugar a 14.000 rpm durante 5 minutos.**
7. Pasar el sobrenadante que contiene el ARN a un tubo que contenga a 600 µl de **Isopropanol**. Mezclar por inversión varias veces.
8. **Centrifugar a 14.000 rpm durante 3 minutos.** El ARN será visible como un pellet blanco.
9. Eliminar el sobrenadante. Añadir 600 ul de **Etanol 70%** para lavar el ARN.
10. **Centrifugar a 14.000 rpm durante 1 minuto.** Cuidadosamente eliminar el sobrenadante sin tocar el pellet de ADN/ARN. Se puede volver a centrifugar brevemente para recoger las últimas gotas de etanol residual.

Eliminación ADN genómico contaminante

1. **Hidratar** y resuspender el pellet ADN/ARN con **100 µl de Agua libre de Nucleasas**
2. **Incubar a 55°C durante 15 minutos.**
3. **Añadir 400 µl del Tampón de Unión + 50 µl de etanol 100%.**
4. **Transferir la muestra a una columna gDNA removal.** Colocar la spin columna en un tubo de recogida.
5. **Centrifugar durante 1 minuto a 10.000 r.p.m.**
6. Añadir **400 µl de etanol 100% al sobrenadante recogido en el punto 5.** Mezclar bien. **Guardar la columna gDNA removal.**

7. Coger una **columna de unión ARN** más su tubo de recolección y añadir la mezcla del punto 6. Centrifugar a **8.000 -10.000 rpm** durante **60 segundos**. Pasar la muestra en 2 veces ya que el volumen supera la capacidad de la columna.
8. Añadir **700 µl Tampón de Lavado**. 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 .
11. Eluir el ARN en **30-50 µl de Agua libre de Nucleasas**. Incubar 2 minutos y centrifugar **a máxima velocidad** durante **1 minuto**.

Extracción ADN genómico

1. Coger **la columna gDNA removal** y pasar **700 µl etanol 80%**.
2. Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.
3. **Centrifugar 3 minutos a máxima velocidad** para eliminar todo el etanol.
4. Colocar la columna en un microtubo nuevo de 1.5 ml (no suministrado con el kit) para eluir el ADN genómico.
5. Eluir el ADN en **50 µl de Agua libre de Nucleasas**. Incubar 2 minutos y centrifugar **a máxima velocidad** durante **1 minuto**.