# *KIT DE EXTRACCIÓN DE ARN* RNEAT

PURK-RN2-050

## Introducción

El Kit de Extracción de ARN proporciona un método sencillo para aislar ARN total a partir de una amplia variedad de tipos y cantidades de muestras. En general, las muestras se lisan y luego se homogeneizan en presencia de isotiocianato de guanidinio, una sal caotrópica capaz de proteger el ARN de las RNasas endógenas. Tras la homogeneización, se añade etanol a la muestra. La muestra se procesa a través de una columna de espín que contiene una membrana de sílice a la que se une el ARN. Cualquier impureza se elimina eficazmente mediante un lavado posterior. El ARN total purificado se eluye en agua libre de RNasas y es adecuado para su uso en diversas aplicaciones posteriores.

## Contenido del kit

| Componentes | 50 rxn |
|---|---|
| Solución RL | 60 ml |
| Tampón de lavado RPI | 18 ml |
| Tampón de lavado RW | 12 ml |
| Agua tratada con DEPC | 10 ml |
| Columna de espín libre de RNasa | 50 unidades |
| Tubo de microcentrífuga libre de RNasa | 50 unidades |

Materiales suministrados por los usuarios:

- Cloroformo
- Etanol (96-100%)

## Almacenamiento

Conservar la solución RL a 2-8 ºC, protegida de la luz. Los demás reactivos se almacenan a temperatura ambiente (15-25°C). El transporte debe realizarse a temperatura ambiente. El contenido del kit es estable hasta 12 meses si se almacena correctamente.

## Limitación del uso del producto

Este producto se desarrolla y vende exclusivamente con fines de investigación. El producto no está destinado a diagnósticos ni desarrollo de fármacos, ni es adecuado para su administración en humanos o animales.

## Características

- Rendimiento estable
- Rendimiento fiable del ARN total purificado de alta calidad en aplicaciones posteriores

## Notas importantes

Antes de usar el kit por primera vez, diluye los tampones de lavado RPI y RW con etanol (96-100%):

| Solución | Tampón de lavado RPI | Tampón de lavado RW |
|---|---|---|
| Volumen inicial | 18 ml | 12 ml |
| Etanol | 12 ml | 48 ml |
| Volumen total | 30 ml | 60 ml |

Mezcla bien y marca las etiquetas de la botella donde se añade etanol.

**Precauciones para prevenir la contaminación por RNasa**

Las RNasas pueden introducirse accidentalmente en la preparación de ARN en cualquier momento del procedimiento de aislamiento debido a una manipulación inadecuada. Dado que la actividad de las RNasas es difícil de inhibir, es fundamental evitar su introducción. Al trabajar con ARN, deben seguirse las siguientes recomendaciones:

- Asegurarse de que no se introduzcan RNasas en las soluciones estériles del kit.
- Utilizar únicamente puntas de pipeta y tubos de microcentrífuga estériles, desechables y libres de RNasas.
- Utilizar guantes desechables durante la manipulación de reactivos y muestras de ARN para evitar la contaminación por RNasas presentes en la superficie de la piel. Cambiar los guantes con frecuencia, especialmente a medida que se avanza desde los extractos iniciales hasta el material más purificado.
- Aplicar siempre técnicas asépticas adecuadas de microbiología durante la manipulación de ARN.

Volumen recomendado de Solución RL:

| | |
|---|---|
| Células adherentes (10 $cm^2$) | 1 ml |
| Células en suspensión ($10^7$ células) | 1-2 ml |
| Leucocitos (100 µ l) | 2 ml |
| Tejido convencional (50-100 mg) | 1 ml |
| Tejido especial: hígado, bazo, hueso o cartílago (50-100 mg) | 2 ml |
| Tejido vegetal (15-100 mg) | 1 ml |

## Protocolo

1. Preparación de la muestra
   - **Tejidos**

     Los tejidos de origen animal o vegetal, frescos o congelados a –70 °C hasta su utilización, pueden procesarse mediante congelación con nitrógeno líquido y trituración hasta obtener un polvo utilizando un mortero y una mano de mortero. Homogeneizar las muestras de tejido con 1 ml de solución RL por cada 50–100 mg de tejido. También puede utilizarse un homogeneizador de tejidos o un homogeneizador de rotor-estator.
   - **Células adherentes**

     Lisar las células directamente en una placa de cultivo añadiendo 1 ml de solución RL y pasando el lisado celular varias veces con una pipeta. La cantidad de solución RL requerida depende de la superficie de la placa de cultivo (1 ml por cada 10 $cm^2$), y no del número de células presentes.
   - **Celdas de suspensión**

     Recoger las células y sedimentarlas mediante centrifugación. Utilizar 1 ml de solución RL por cada 5–$10\times10^6$ células animales, vegetales o de levadura, o por cada $1\times10^7$ células bacterianas. Lisar las células pipeteando repetidamente arriba y abajo. No lave las células antes de añadir la solución RL para evitar cualquier degradación del ARNm. La alteración de algunas células de levaduras y bacterias puede requerir un homogeneizador.
2. Incuba a temperatura ambiente (15-30ºC) durante 5 minutos.
3. Paso opcional: Centrifugar a 12.000 rpm durante 5 minutos a 4ºC, transferir el sobrenadante a un nuevo tubo microcentrífuga libre de RNasa. Este paso puede eliminar proteínas, lípidos, polisacáridos, fibras musculares o vegetales.
4. Añade 200 µl de cloroformo (1/5 de volumen de solución RL), mezcla por agitación con vórtex durante 15 segundos e incuba a temperatura ambiente durante 3 minutos.
5. Centrifugue la muestra a 12.000 rpm durante 10 minutos a 4ºC. Transfiera la fase superior incolora a un nuevo tubo libre de RNasa.

   *Después de la centrifugación, la mezcla se separa en 3 capas: fase orgánica amarilla, una interfase y una fase acuosa superior incolora que contiene el ARN.
6. Añade un volumen de etanol (96-100%) equivalente a 0,5 veces el volumen de la muestra y mezclar bien. Puede formarse precipitado visible tras añadir etanol. Transfiera la mezcla a una columna de espín libre de RNasa, centrifuga a 12.000 rpm durante 30 segundos a 4ºC y desecha el líquido filtrado.
7. Añada 500 µl de tampón de lavado RPI (comprobar previamente que se haya añadido el etanol), centrifugue a 12.000 rpm durante 30 segundos a 4ºC y desecha el líquido filtrado.

8. Añada 500 µl de tampón de lavado RW (comprobar previamente que se haya añadido el etanol), e incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto. Centrifugar a 12.000 rpm durante 30 segundos a 4 °C. Desechar el líquido filtrado. Repetir este paso.
9. Centrifugar a 12.000 rpm durante 2 minutos para eliminar el etanol residual.
   *Opcional: deje la columna abierta durante unos minutos para que seque al aire.
10. Coloque la columna de espín en un tubo de microcentrífuga libre de RNasa y añada con una pipeta entre 30-100 µl de agua tratada con DEPC directamente sobre la membrana. Incube a temperatura ambiente durante 2 minutos y luego centrifuge a 12.000 rpm durante 2 minutos para eluir el ARN. El tubo contiene el ARN purificado. Almacenar ARN a -70 ºC.