

BIOTOOLS

BIOTOOLS B&M LABS.S.A.

Manufactured by:

BIOTOOLS B&M Labs, S.A.
Valle de Tobalina - 52 - Nave 39
28021 Madrid
España

Tel. (34) 91 710 00 74
Fax (34) 91 505 31 18
e-mail: info@biotools.eu
www.biotools.eu

SPEEDTOOLS TOTAL RNA EXTRACTION KIT

***Diseñado para una rápida y eficiente purificación
de ARN a partir de células y tejidos***

Instrucciones de Uso (Ref. 21.210/1/2)

***ANTES DE USAR ESTE KIT LEA EN SU TOTALIDAD LAS INSTRUCCIONES DE USO
ESPECIALMENTE SI NO ESTÁ FAMILIARIZADO CON EL PROTOCOLO.***

1. EXPLICACIÓN DEL KIT

El **Speedtools Total RNA Extraction Kit** ha sido diseñado para una eficiente extracción y purificación de ARN total a partir de cultivos celulares y tejidos animales. La tecnología desarrollada en la línea Speedtools se basa en fenómenos de absorción reversible de ácidos nucleicos a una membrana de sílica especialmente tratada para este fin.

En un primer paso la muestra se incuba en el **buffer de lisis** que incluye en su composición enzimas líticas y una alta concentración de agentes caotrópicos que *inactivan las RNasas* presentes en el material biológico. Además, el buffer de lisis crea las *condiciones idóneas* para unión de los ácidos nucleicos a la membrana de la columna. El lisado obtenido es **clarificado** mediante su paso por una columna de filtración a fin de reducir su viscosidad y favorecer su paso a través de la **columna de unión** de ácidos nucleicos. El ADN presente en la muestra, que también se une a la membrana, se elimina mediante **tratamiento con DNasa** directamente en la columna. El ADN contaminante así como sales, metabolitos y macro-componentes celulares son eliminados **lavando la columna** con diferentes buffers de lavado. Al final del proceso el **ARN puro es eluido** de la columna utilizando agua libre de nucleasas.

Los buffers incluidos en el kit han sido especialmente formulados y optimizados para prevenir la degradación del ARN durante el proceso de extracción lo que permite realizar el proceso a **temperatura ambiente**. Sin embargo, una vez eluido el ARN debe de tratarse con el máximo cuidado ya que el ARN es muy sensible a cualquier traza de RNasas contaminantes presentes en el material de trabajo, huellas de impresión, polvo, etc. Mantenga el ARN congelado a **-20°C** para **periodos cortos** o a **-70°C** para **periodos largos** de almacenamiento.

2. REACTIVOS INCLUIDOS EN EL KIT

Reactivos	Ref. 21.210 (10 preps)	Ref. 21.211 (50 preps)	Ref. 21.212 (250 preps)
LYSIS BUFFER LR Buffer de lisis	10 mL	25 mL	5 x 25 mL
WASH BUFFER WR1 Buffer de Lavado WR1	15 mL	15 mL	5 x 15 mL
WASH BUFFER WR2 (concentrado) Buffer de Lavado WR2	6 mL	12 mL	5 x 12 mL
DESALTING BUFFER DBR Buffer de desalado de la membrana	10 mL	25 mL	5 x 25 mL
BUFFER FOR rDNase Buffer para rDNasa	7 mL	7 mL	5 x 7 mL
rDNase, free of RNases (liofilizada) DNasa libre de RNasas	1 vial (80U)	1 vial (200U)	5 x 1 vial (200U)
RNase-free H ₂ O Agua libre de RNasas	13 mL	13 mL	5 x 13 mL
FILTERING COLUMNS (anillo violeta) Columnas de filtración	10	50	5 x 50
RNA BINDING COLUMNS (anillo azul) Columnas de unión	10	50	5 x 50
Collection Tubes (2 mL)	30	150	5 x 150
Collection Tubes (1.5 mL)	10	50	5 x 50
PROTOCOLO	1	1	5

3. ESPECIFICACIONES DEL KIT

El Kit **Speedtools Total RNA Extraction** permite la obtención de ARN de alta pureza a partir de **cultivos** celulares, **tejidos** animales, **bacterias**, **levaduras** y **fluidos biológicos** libres de células. Un rendimiento adecuado se ha obtenido incluso con **muestras complejas** como tejidos de ratón (hígado y cerebro) y líneas celulares tumorales.

El Kit permite la obtención de ARN puro con un ratio A_{260}/A_{280} que generalmente excede el valor de **1.9** (medido en buffer TE pH 7.5). El ARN purificado a partir de muestras frescas de alta calidad (ej. células eucariotas o hígado de ratón fresco) se obtiene con un **índice de integridad RIN** ("RNA integrity number") **superior a 9**. Sin embargo, es importante considerar que el valor del RIN depende en gran medida de la calidad de la muestra de origen.

El contenido de ADN contaminante es mínimo debido a la inclusión de un paso de **digestión con rDNasa** en la columna. Para aplicaciones que requieran una alta sensibilidad se recomienda realizar el tratamiento con DNasa post-elución (ver Sección 8.H). La probabilidad de detectar ADN en la reacción de PCR aumenta en la medida que aumenta el número de copias de ADN y disminuye el tamaño del amplicón buscado.

El protocolo estándar permite obtener hasta **70 µg** de **ARN total** por columna partiendo de 5×10^6 células en cultivo o de 30 mg de tejido (ver Tabla 1).

El ARN purificado está listo para su uso en aplicaciones como: transcripción reversa, RT-PCR, *Nothern blot*, *arrays*, ensayos de protección de la RNasa, entre otros.

El ARN purificado puede utilizarse directamente como molde en reacciones de transcripción reversa y RT-PCR; para estas aplicaciones utilizar entre 1-10% del ARN eluido.

Tabla 1: Características Generales del Kit	
Material de partida	< 5×10^6 células en cultivo < 10^8 células de levadura < 10^9 células bacterianas < 30 mg tejido
Rendimiento medio	14 µg, de células HeLa 70 µg, de células bacterianas
Volumen de elución	40 - 120 µL
Capacidad de unión	200 µg
A_{260}/A_{280}	1.9-2.1
RIN (# de integridad del ARN)	> 9
Tiempo/ Preparación	30 min/6 preps.
Tipo de columna	mini

El Kit puede emplearse para preparar ARN a partir de diferentes muestras de origen. Para obtener resultados óptimos adapte el volumen del Buffer de lisis LR (paso 1 protocolo estándar) y de etanol (paso 4 protocolo estándar) según se indica en la **Tabla 2**. Si se utiliza 600 µL de Buffer LR y de etanol es necesario realizar dos pasos sucesivos de cargado y centrifugación.

Tabla 2: Volúmenes recomendados de buffer de lisis (Buffer LR) y etanol			
Muestra de origen	Cantidad	Buffer LR	Etanol
Cultivos celulares animales y humanos (e.g. células HeLa)	< 5 x 10 ⁶ células	350 µL	350 µL
Tejido animal o humano	< 20 mg 20 - 30 mg	350 µL 600 µL	350 µL 600 µL
Tejidos almacenados en RNAlater®	< 20 mg 20 - 30 mg	350 µL 600 µL	350 µL 600 µL
Muestras difíciles de lisar	< 5 x 10 ⁷ células	600 µL	600 µL

Dependiendo del tipo de muestra el rendimiento obtenido varía entre **5 µg -70 µg** (ver Tabla 3).

Tabla 3: Rendimiento medio del kit	
Muestra de origen	Rendimiento
8 x 10 ⁴ células HeLa	1.5 µg
4 x 10 ⁵ células HeLa	4 µg
1 x 10 ⁶ células HeLa	14 µg
2 x 10 ⁶ células HeLa	21 µg
2.5 x 10 ⁶ células HeLa	25 µg
5 x 10 ⁶ células HeLa	50 µg

4. PREPARACIÓN, MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LA MUESTRA

El ARN presente en la muestra no se encuentra protegido frente a su degradación si no se congela o se homogeniza en presencia de inhibidores de RNAsas o agentes desnaturizantes. Es muy importante que las muestras se congelen inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenen a -70°C si no se procesan de inmediato.

Las muestras congeladas sin Buffer LR son estables durante **6 meses**. Las muestras también pueden almacenarse en Buffer LR después de ser homogeneizadas; en este caso el período de almacenamiento se prolonga a **un año a -70°C**, 24 horas a 4°C o varias horas a temperatura ambiente. Si las muestras han sido congeladas en Buffer LR deben descongelarse lentamente antes de comenzar el protocolo de extracción de ARN.

Nota: Utilice guantes durante la preparación de la muestra y proceso de extracción del ARN y cámbielos con frecuencia.

El kit Speedtools Total RNA Extraction permite extraer RNA puro a partir de diferentes muestras biológicas como:

- ✓ **Células eucariotas en cultivo (células en suspensión):** Recolecte las células mediante centrifugación y añada el Buffer de Lisis LR al sedimento celular obtenido siguiendo el Paso 2 del *Protocolo Estándar*.
- ✓ **Lisis de células adherentes directamente en la placa de cultivo:** A fin de que la lisis sea efectiva, elimine completamente el medio de cultivo celular mediante aspiración e inmediatamente añada el Buffer LR a la placa de cultivo.
- ✓ **Tripsinización de células adherentes en cultivo:** Aspire el medio de cultivo y lave las células añadiendo un volumen equivalente de buffer PBS. Elimine el buffer de lavado y añada nuevo buffer PBS suplementado con 0.1 – 0.3% tripsina. Incube el tiempo necesario para que las células se separen de la superficie de la placa, una vez despegadas añada medio para inhibir la

tripsina residual, transfiera las células a un tubo y centrifugue 5 min a 300 x g. Elimine el sobrenadante y añada el Buffer LR sobre el sedimento celular.

- ✓ **Tejido animal:** Para que el proceso de extracción de ARN tenga una eficiencia máxima se deben eliminar los restos celulares y viscosidad de la muestra. Si el tejido animal es sólido deberá desintegrarse o pulverizarse mecánicamente. Dependiendo del método de desintegración empleado será necesario reducir la viscosidad mediante homogenización de la muestra. Para desintegrar o pulverizar el tejido sólido se puede utilizar un mortero y nitrógeno líquido. También se puede emplear homogeneizadores comerciales; en este caso sumerja el vástago en la mezcla para evitar la formación de espuma. Procure que la muestra no se descongele durante el proceso. Añada una alícuota del Buffer LR con β -mercaptoetanol a la muestra pulverizada y congelada. Homogenice el lisado resultante utilizando la columna de filtración provista por el Kit o pasándola un mínimo de cinco veces a través de una aguja de 0.9 mm. Si el tejido ha sido congelado la descongelación y desintegración del mismo debe realizarse en presencia del Buffer LR, a fin de prevenir la degradación por las RNasas presentes en la muestra.
- ✓ **Bacterias y levaduras:** La pared celular de las bacterias y levaduras es más robusta que las células animales y necesitan un tratamiento previo con lisozima o litalcasa/zimolasa, respectivamente (véase la sección 8C y 8D). Si la bacteria es extremadamente difícil de lisar como algunas bacterias Gram positivas pudiera ser necesario optimizar las condiciones de lisis o incluso modificar las condiciones de cultivo. Después del proceso de lisis homogenice el lisado utilizando la columna de filtración provista por el Kit o pasando el lisado más de cinco veces a través de una aguja 0.9 mm.

5. PROTOCOLOS DE ELUCIÓN DEL ARN

El paso de elución estándar de los diferentes protocolos descritos en el kit tiene un rendimiento de **70-90%**. Sin embargo, este paso puede modificarse para adaptarlo a las aplicaciones posteriores del ARN purificado

Rendimiento alto: A fin de incrementar el rendimiento del proceso de extracción, es posible realizar la elución en **dos pasos** utilizando en cada uno de los pasos el volumen de elución recomendado en el protocolo individual. Con esta modificación se podrá recuperar entre un **90-100%** del ARN unido a la membrana.

Rendimiento y concentración elevada: En caso de que se requiera incrementar el rendimiento sin reducir la concentración del ARN purificado, se recomienda realizar **dos pasos** de elución. La segunda elución se utilizará reeluyendo el primer eluato.

Para evitar la degradación del ARN una vez eluido por la columna consérvelo en hielo. Si el ARN obtenido se va a conservar por un periodo de tiempo corto congele a -20°C, para periodos de almacenamiento largos congele a -70 °C.

6. PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LOS REACTIVOS

Nota: Los buffers LR, WR1 y DBR contienen tiocianato de guanidina. Utilice en todo momento guantes y gafas de protección.

A su recepción almacene el vial de **rDNase**, free of RNasas a **4°C**.

El resto de reactivos incluidos en el kit deben almacenarse a **temperatura ambiente** (18-25°C). Si los reactivos se conservan a bajas temperaturas pueden producirse precipitados de sales.

Si los diferentes componentes del kit se conservan en las condiciones indicadas, el kit será estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta exterior.

Antes de comenzar cualquier ensayo con el Kit **SPEEDTOOLS TOTAL RNA EXTRACTION KIT** prepare las siguientes soluciones:

I. rDNase, free of RNases:

- ✓ **Formato 10 preps:** Añada al vial liofilizado de rDNase **230 µL** del **agua** libre de RNAsas incluida en el kit e incube 1 min a temperatura ambiente.
- ✓ **Formato 50 preps:** Añada al vial liofilizado de rDNase **540 µL** del **agua** libre de RNAsas incluida en el kit e incube 1 min a temperatura ambiente.

Para solubilizar la solución de rDNase agite suavemente el vial no mezcle vigorosamente pues la **rDNase es sensible a la agitación mecánica**. Distribuya en alícuotas el contenido del vial y conserve las alícuotas a **-20°C**. La solución de rDNase es estable a **-20°C** durante al menos **6 meses**. No utilice alícuotas con más de tres ciclos de congelación/descongelación.

II. Buffer de lavado WR2:

- ✓ **Formato 10 preps:** Añada **24 mL de etanol 96-100 %** al vial de Buffer WR2 concentrado. Marque el recipiente para indicar que el etanol ha sido añadido.
- ✓ **Formato 50 preps:** Añada **48 mL de etanol 96-100 %** al vial de Buffer WR2 concentrado. Marque el recipiente para indicar que el etanol ha sido añadido.

El buffer de lavado diluido es estable a **temperatura ambiente** (18-25°C) durante al menos **12 meses**.

7. REACTIVOS Y EQUIPOS REQUERIDOS NO INCLUIDOS EN EL KIT





- Etanol 70%
- Etanol 96-100%
- Agente reductor (β -mercaptoetanol, DTT o TCEP)
- Centrifuga para microtubos de 1.5 y 2 mL
- Microtubos de 1.5 y 2 mL
- Pipetas y puntas de pipetas estériles libres de RNAsas
- Equipo para desintegración y homogenización de muestras
- Incubadora o baño de agua
- Reactivos específicos para algunos protocolos

8. INSTRUCCIONES DE USO

A. PROTOCOLO ESTÁNDAR. Purificación de ARN total a partir de cultivos celulares y tejidos

Antes de comenzar la preparación:

- Corroborar que la rDNase y el Buffer WR2 han sido preparados según Sección 6.



PASO	DESCRIPCIÓN		
1	<p>PREPARACION DE LA MUESTRA</p> <p>Tejido Desintegre/pulverice hasta 30 mg de tejido (ver Sección 4)</p> <p>Células en cultivo Recolecte hasta 5×10^6 células eucariotas por centrifugación e incorpore el Buffer de lisis directamente sobre el sedimento celular (ver Sección 4).</p>		PREPARAR LA MUESTRA
2	<p>LISIS CELULAR</p> <p>Añada 350 µL Buffer LR y 3.5 µL β-mercaptoetanol al sedimento celular o al tejido homogenizado y mezcle vigorosamente.</p> <p><i>Para seleccionar la cantidad de Buffer LR véase la Tabla 2.</i></p> <p><i>Nota: El β-mercaptoetanol puede ser sustituido por otros agentes reductores como DTT o TCEP a una concentración final de 10-20 mM.</i></p>		350 µL BUFFER LR + 3.5 µL β-mercapto etanol
3	<p>FILTRACIÓN DEL LISADO</p> <p>Coloque una columna de filtrado (anillo violeta) en un tubo colector de 2 mL. Cargue el lisado obtenido y centrifugue 1 min a 11,000 x g. Este paso clarifica y reduce la viscosidad del lisado.</p> <p><i>Alternativamente, la viscosidad del lisado puede reducirse pasándolo 5 veces por una aguja de 0.9 mm (20 gauge) con ayuda de una jeringa.</i></p> <p><i>En caso de que se visualice un sedimento transfiera el sobrenadante a un tubo de 1.5 L limpio evitando arrastrar el precipitado.</i></p> <p><i>Nota: Si se procesa un número elevado de células ($> 1 \times 10^6$) o de tejido (> 10 mg), antes de filtrar el lisado deberá homogeneizarlo utilizando una aguja de 0.9 mm (20 gauge) y una jeringa.</i></p>		Cargar lisado en la columna de filtrado (anillo violeta) 1 min, 11,000 × g
4	<p>ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES PARA UNIÓN DEL ARN A LA COLUMNA</p> <p>Descarte la columna de filtrado y añada 350 µL etanol 70% al lisado clarificado. Mezcle pipeteando arriba y abajo (5 veces).</p> <p><i>Alternativamente transfiera el filtrado a un tubo de 1.5 mL limpio y añada 350 µL etanol 70%. Mezcle con la ayuda del vortex (2 x 5 sec).</i></p> <p>Al añadir etanol al filtrado se puede formar un precipitado, este precipitado no afecta el proceso de extracción y purificación. El precipitado dejará de ser visible al mezclar bien el lisado etanolizado. <u>No centrifugue el lisado con el etanol.</u></p>		+ 350 µL Etanol 70% Mix

<p>5</p>	<p>UNIÓN DEL ARN A LA COLUMNA</p> <p>Tome una columna de unión de ARN (anillo azul) y colóquela en un tubo colector de 2 mL. Pipetee arriba y abajo 2-3 veces la mezcla del lisado y cárguela en la columna.</p> <p>Centrifugue 30 sec a 11,000 x g. Descarte el tubo colector con el filtrado y coloque la columna en un nuevo tubo colector de 2 mL.</p> <p><i>La capacidad máxima de la RNA Binding Column es 750 µL. Si dispone de un volumen de muestra mayor repita el procedimiento.</i></p>		<p>Cargue la mezcla en la columna de unión (anillo azul)</p> <p>30 sec, 11,000xg</p>
<p>6</p>	<p>DESALADO DE LA MEMBRANA DE SILICA</p> <p>Añada 350 µL Buffer DBR y centrifugue 1 min a 11,000 x g para secar la membrana.</p> <p><i>Para que la digestión con rDNasa sea eficiente es necesario eliminar las sales atrapadas en la membrana. Si por algún motivo el extremo de la columna entra en contacto con el eluido a desechar, descarte el mismo y centrifugue la columna nuevamente 30 seg a 11,000 x g.</i></p>		<p>+ 350 µL BUFFER DBR</p> <p>1 min, 11,000 x g</p>
<p>7</p>	<p>DIGESTION DEL ADN "IN SITU"</p> <p>Prepare la Mezcla de Reacción de la rDNasa: en un vial estéril de 1.5 mL: añada 10 µL de rDNase resuspendida y 90 µL Buffer para rDNase. Mezcle aplicando golpes secos.</p> <p>Aplique 95 µL Mezcla de Reacción del DNasa directamente en el centro de la membrana de sílica. Incube 15 min a temperatura ambiente.</p>		<p>+ 95 µL Mezcla de Reacción de la DNasa</p> <p>TA 15 min</p>
<p>8</p>	<p>LAVADO Y SECADO DE LA MEMBRANA</p> <p>1^{er} Lavado</p> <p>Añada 200 µL Buffer WR1 a la columna. Centrifugue 30 seg a 11,000 x g. Descarte el filtrado y coloque la columna nuevamente en el tubo colector</p> <p><i>El Buffer WR1 inactiva la rDNasa.</i></p> <p>2^{do} Lavado</p> <p>Añada 600 µL Buffer WR2 a la columna. Centrifugue 30 seg a 11,000 x g. Descarte el filtrado y coloque la columna nuevamente en el tubo colector.</p> <p>3^{er} Lavado</p> <p>Añada 250 µL Buffer WR2 a la columna. Centrifugue 2 min a 11,000 x g para eliminar los restos de buffer en la membrana. Descarte el filtrado y coloque la columna en un tubo nuevo de 1.5 mL.</p>		<p>+ 200 µL BUFFER WR1 30 sec, 11,000 x g</p> <p>+ 600 µL BUFFER WR2 30 sec, 11,000 x g</p> <p>+ 250 µL BUFFER WR2 2 min, 11,000 x g</p>
<p>9</p>	<p>ELUCIÓN DE ARN PURO</p> <p>Añada 60 µL RNase-free H₂O directamente en la membrana de sílica. Centrifugue 1 min a 11,000 x g.</p> <p>El eluido contiene el ARN total puro procedente de la muestra.</p> <p><i>Si se desea obtener el ARN a una concentración superior, puede realizarse la elución del mismo en 40 µL RNase-free H₂O. Es importante considerar que al utilizar menor volumen de elución, el rendimiento también será menor.</i></p> <p>Para procedimientos de elución alternativos ver Sección 5.</p>		<p>+ 60 µL RNase-free H₂O</p> <p>1 min, 11,000 x g</p>

B. Purificación de ARN total a partir de fluidos biológicos (ej. suero, medio de cultivo)

Antes de comenzar la preparación:

- Corroborar que la rDNase y el Buffer WR2 han sido preparados según Sección 6.

PASO	DESCRIPCIÓN		
1	<p>LISIS DE LA MUESTRA</p> <p><i>En este tipo de muestras no es necesario el paso de homogeneización previa.</i></p> <p>Añada 350 µL Buffer LR + 3.5 µL β-mercaptoetanol a 100 µL de muestra y mezcle exhaustivamente con vortex.</p> <p><i>Para seleccionar la cantidad de Buffer LR véase la Tabla 2.</i></p> <p><i>Nota: El β-mercaptoetanol puede ser sustituido por otros agentes reductores como DTT o TCEP a una concentración final de 10-20 mM.</i></p>		<p>100 µL Muestra + 350 µL BUFFER LR + 3.5 µL β-mercaptoetanol Vortex</p>
2	<p>ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES PARA UNIÓN DEL ARN A LA COLUMNA</p> <p><i>La filtración del lisado no es necesaria en este protocolo</i></p> <p>Añada 350 µL etanol 70% al lisado y mezcle con vortex.</p>		<p>+ 350 µL Etanol 70% Vortex</p>
	<p>Proceda con el Paso 5 del <i>Protocolo Estándar</i>.</p>		

C. Purificación de ARN total a partir de cultivos bacterianos (hasta 10⁹ células bacterianas)

Antes de comenzar la preparación:


- Corroborar que la rDNase y el Buffer WR2 han sido preparados según Sección 6.
- Preparar solución de lisozima (no proporcionada con el kit).
- Preparar una incubadora o baño de agua a 37 °C.


PASO	DESCRIPCIÓN		
1	<p>PREPARACION DE LA MUESTRA</p> <ul style="list-style-type: none"> • Para bacterias Gram negativas resuspenda el pellet bacteriano en 100 µL buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8) suplementado con lisozima 1 mg/mL. Mezcle vigorosamente con ayuda del vortex e incube a 37°C durante 10 min. • Para bacterias Gram-positivas resuspenda el pellet bacteriano en 100 µL buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8) suplementado con lisozima 2 mg/mL. Mezcle vigorosamente con ayuda del vortex e incube a 37°C durante 10 min. <p><i>Dependiendo de la especie bacteriana puede ser necesario optimizar el tiempo de incubación y la concentración de lisozima a utilizar.</i></p> <p>Nota: Como la concentración de equivalentes genómicos por célula es mayor en bacterias que en células eucariotas puede ser necesario reducir la cantidad de material de partida.</p>		<p>PELLET BACTERIANO + 100 µL BUFFER TE (con lisozima)</p> <p>37°C, 10 min</p>
2	<p>LISIS CELULAR</p> <p>Añada 350 µL Buffer LR y 3.5 µL β-mercaptoetanol a la suspensión celular y agitar con el vortex de forma vigorosa.</p> <p>Para seleccionar la cantidad de Buffer LR véase la Tabla 2.</p> <p>Nota: El β-mercaptoetanol puede ser sustituido por otros agentes reductores como DTT o TCEP a una concentración final de 10-20 mM.</p>		<p>350 µL BUFFER LR + 3.5 µL β-mercaptoetanol</p>
3	<p>FILTRACIÓN DEL LISADO</p> <p>Coloque la columna de filtración (anillo violeta) en un tubo colector de 2 mL, cargue el lisado y centrifugue 1 min a 11,000 x g. El objetivo de este paso es clarificar el lisado y disminuir su viscosidad.</p> <p><i>Alternativamente, la viscosidad del lisado puede reducirse pasándolo 5 veces por una aguja de 0.9 mm (20 gauge) con ayuda de una jeringa.</i></p> <p><i>En caso de que se visualice un sedimento transfiera el sobrenadante a un tubo de 1.5 L limpio evitando arrastrar el precipitado.</i></p>		<p>Cargar lisado en la columna de filtración (anillo violeta)</p> <p>1 min, 11,000 x g</p>
4	<p>ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES PARA UNIÓN DEL ARN A LA COLUMNA</p> <p>Descarte la columna de filtrado y añada 350 µL etanol 70% al lisado y mezcle con vortex.</p>		<p>+ 350 µL Etanol 70%</p> <p>Mix</p>
	Proceda con el Paso 5 del Protocolo Estándar.		

D. Purificación de ARN total a partir de levaduras (hasta 5×10^7 células)

Antes de comenzar la preparación:

- Corroborar que la rDNase y el Buffer WR2 han sido preparados según Sección 6.
- Preparar soluciones de sorbitol y liticasa (o zimolasa) para homogeneización enzimática; o bien bolas de vidrio y agitador para homogeneización mecánica.
- Preparar una incubadora o baño de agua a 30 °C

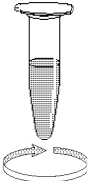
PASO	DESCRIPCIÓN		
1	<p>PREPARACIÓN DE LA MUESTRA</p> <p>Para la homogeneización de células de levadura es posible aplicar digestión enzimática u homogeneización mecánica.</p> <p>La homogeneización por digestión enzimática sólo se recomienda para cultivos celulares recién recolectados (muestras frescas), en tanto que la homogeneización mecánica puede ser aplicada a precipitados celulares conservados a -70 °C por varios meses.</p> <p><i>Nota: Como la concentración de equivalentes genómicos por célula es mayor en levaduras que en otros cultivos celulares o tejidos puede ser necesario reducir la cantidad de material de partida.</i></p> <p>A. Homogeneización por digestión enzimática</p> <p>Centrifugar 2-5 mL de cultivo de levadura (5,000 x g; 10 min). Resuspender el precipitado en buffer sorbitol/liticasa recientemente preparado (50-100 U de liticasa o zimolasa en sorbitol 1M/ EDTA 100 mM) e incubar a 30°C por 30 min.</p> <p>Precipitar los esferoplastos resultantes por centrifugación (1,000 x g; 10 min) y descartar cuidadosamente el sobrenadante.</p> <p><i>Dependiendo de la levadura puede ser necesario optimizar el tiempo de incubación y la concentración de liticasa/zimosada a utilizar en el proceso.</i></p> <p><i>Continuar con el Paso 2 (Lisis celular).</i></p> <p>B. Homogeneización por ruptura mecánica</p> <p>Centrifugar 2-5 mL de cultivo de levadura (5,000 x g; 10 min). Lavar el precipitado celular con agua enfriada en hielo. Resuspender el precipitado celular en una mezcla de 350 µL Lysis Buffer LR y 3.5 µL β-mercaptoetanol.</p> <p>Añadir las bolas de vidrio (ej. 300 mg de bolas de 425-600 µm) y agitar las muestras en un molino a 30 Hz durante 15 min.</p> <p><i>Continuar con el Paso 3 (Filtración del Lisado).</i></p>		<p>PELLET CELULAR + Buffer Sobitol/ Liticasa</p> <p>30°C, 30 min</p> <p>10 min 1,000xg</p> <p>PELLET CELULAR + 350 µL BUFFER LR + 3.5 µL β –mercapto-etanol + bolas de vidrio agitación</p>
2	<p>LISIS CELULAR</p> <p>Añada 350 µL Buffer LR y 3.5 µL β-mercaptoetanol a la suspensión celular. Vortex de forma vigorosa.</p> <p><i>Para seleccionar la cantidad de Buffer LR véase la Tabla 2.</i></p> <p><i>Nota: El β-mercaptoetanol puede ser sustituido por otros agentes reductores como DTT o TCEP a una concentración final de 10-20 mM.</i></p>		<p>350 µL BUFFER LR + 3.5 µL β –mercapto-etanol</p>

<p>3</p>	<p>FILTRACIÓN DEL LISADO</p> <p>Coloque una columna de filtración (anillo violeta) en un tubo colector de 2 mL, aplique el lisado y centrifugue 1 min a 11,000 x g. El objetivo de este paso es clarificar el lisado y disminuir su viscosidad.</p> <p><i>Alternativamente, la viscosidad del lisado puede reducirse pasándolo 5 veces por una aguja de 0.9 mm (20 gauge) con ayuda de una jeringa.</i></p> <p><i>En caso de que se visualice un sedimento transfiera el sobrenadante a un tubo de 1.5 L limpio evitando arrastrar el precipitado.</i></p>		<p>Cargar lisado en la columna de filtración (anillo violeta)</p> <p>1 min, 11,000 xg</p>
<p>Proceda con el Paso 4 del Protocolo Estándar.</p>			

E. Purificación de ARN total a partir de tejido embebido en parafina

Antes de comenzar la preparación:

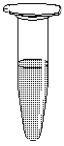

- Corroborar que la rDNase y el Buffer WR2 han sido preparados según Sección 6.
- Corroborar la disponibilidad de xileno.

PASO	DESCRIPCIÓN		
<p>1</p>	<p>PREPARACIÓN DE LA MUESTRA-ELIMINACION DE LA PARAFINA</p> <p>Tome 10 mg del tejido triturado en un tubo de 1.5 mL.</p> <p>Añada 300 µL Xileno e incube 5 min a temperatura ambiente con agitación continua.</p> <p>Centrifugue 3 min a velocidad máx (13,000 x g) para sedimentar el tejido. Descarte el xileno.</p> <p>Repita el proceso dos veces (3 lavados totales con xileno).</p> <p>Añada 300 µL de etanol 96% e incube 5 min con agitación constante a temperatura ambiente.</p> <p>Centrifugue 3 min a velocidad máx (13,000 x g) para sedimentar el tejido. Descarte el etanol.</p> <p>Repita el proceso (2 lavados totales con etanol 96%)</p>		<p>10 mg tejido triturado + 3 Lavados con 300 µL de xileno <i>3 min, v max</i></p> <p>2 Lavados con 300 µL de Etanol 96% <i>3 min, v max</i></p>
<p>Proceda con el Paso 1 del Protocolo Estándar.</p>			

F. Purificación de ARN (*clean-up*) de mezclas de reacción

Antes de comenzar la preparación:

- Corroborar que el Buffer WR2 ha sido preparado según Sección 6.

STEP	DESCRIPTION		
1	<p>PREPARACIÓN DE LA MUESTRA</p> <p>A) Para volúmenes de mezclas de reacción < 100 µL añada RNase-free H₂O hasta 100 µL.</p> <p>B) Para volúmenes de mezcla de reacción variables y entre 100-200 µL, unifique el volumen final de las diferentes muestras con RNase-free H₂O (ej. hasta 200 µL).</p>		Prepare la muestra
2	<p>PREPARACIÓN DE LA PREMIX BUFFER DE LISIS-UNIÓN</p> <p>Preparar el Premix: 1 VOL Buffer LR + 1 VOL Etanol 96-100%.</p> <p>Por cada 100 µL de mezcla de reacción añada 300 µL de Buffer de lisis LR y 300 µL etanol 96-100%.</p> <p><i>Si se procesan varias muestras se recomienda preparar la totalidad del Premix Buffer.</i></p>		Prepare el Premix Buffer Y Mezcle con mezcla de reacción
3	<p>ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES PARA UNIÓN DEL ARN A LA COLUMNA</p> <p><i>La filtración del lisado no es necesaria en este protocolo</i></p> <p>1 VOL mezcla de reacción + 6 VOL de Buffer Premix (ej. para 100 µL de mezcla de reacción, 600 µL de Buffer Premix). Mezclar con vortex.</p> <p><i>El volumen máximo de carga de la columna es 750 µL. Repita el paso de carga si utiliza volúmenes de lisado superiores a 750 µL.</i></p> <p><i>Al añadir etanol o Buffer Premix a la mezcla de reacción puede formarse un precipitado; este precipitado no afecta el proceso de extracción y purificación. Antes del paso de carga a la columna de unión asegúrese de agitar bien la mezcla.</i></p>		1 VOL Mezcla de Reacción + 6 VOL Buffer Premix Mezclar
	Proceda con los Pasos 5, 8, y 9 del Protocolo Estándar. Los Pasos 6 y 7 pueden ser omitidos en este protocolo.		

G. Purificación de ARN total a partir de muestras tratadas con RNA/ater®

Antes de comenzar la preparación:

- Corroborar que la rDNase y el Buffer WR2 han sido preparados según Sección 6.

PASO	DESCRIPCIÓN		
1	<p>PREPARACIÓN DE LA MUESTRA</p> <p>Descarte la solución RNA/ater® y corte una sección de tejido de tamaño apropiado.</p>		Prepare la muestra
2	<p>LISIS CELULAR</p> <p>Añada 350 µL Buffer LR y 3.5 µL β-mercaptoetanol. Desintegre la muestra con ayuda de un homogeneizador.</p>		350 µL BUFFER LR + 3.5 µL β-mercapto- ethanol
	Proceda con el Paso 3 del Protocolo Estándar.		

H. Digestión con rDNasa en Solución

El protocolo estándar incluye un paso de **digestión con rDNase directamente en la columna** de unión; con este protocolo el contenido de ADN contaminante presente en la muestra purificada es mínimo e indetectable en la mayoría de aplicaciones que utilizan el ARN purificado. No obstante, en aplicaciones que requieran una alta sensibilidad se recomienda realizar la **digestión del ADN contaminante en solución (post-elución del ARN)** a fin de garantizar la remoción completa del ácido nucleico contaminante. Después de la digestión con DNasa, el ARN se debe de re-purificar para eliminar sales, restos de enzima y el ADN digerido. Controle durante el proceso la posible existencia de RNasas que degraden el ARN (Protocolo F).

La digestión con DNasa en solución es la recomendada cuando el RNA purificado se requiera para reacciones de RT-PCR que presentan las siguientes características:

- ✓ Cuando el cebador seleccionado no diferencia entre ADNc (derivado de ARN) y ADN genómico contaminante.
- ✓ Para dianas con alto número de copias.
- ✓ Cuando el gen diana presenta un nivel de expresión muy bajo.
- ✓ Cuando el amplicón seleccionado posea un tamaño <200 bp.

Antes de comenzar la preparación:

- Corroborar que la rDNase y el Buffer WR2 han sido preparados según Sección 6.
- Preparar una incubadora o baño de agua a 37 °C

PASO	DESCRIPCIÓN
1	<p>DIGESTION DEL ADN (Reaction Set-up)</p> <p>Añada a los 60 µL de ARN eluido 6 µL Buffer para rDNase + 0.6 µL rDNase reconstituida.</p> <p>Mezclar exhaustivamente y centrifugar aproximadamente 1 seg a 1,000 x g para recoger la totalidad de la mezcla en el fondo del tubo.</p>
2	<p>INCUBACIÓN</p> <p>Incube a 37°C durante 10 min.</p>
3	<p>REPURIFICACIÓN DEL ARN</p> <p>Repurifique el ARN con el protocolo apropiado de ARN <i>Clean-up (Protocolo 8F)</i> o mediante precipitación con etanol.</p> <p>Precipitación con etanol: <i>Añadir 1 VOL muestra + 0.1 VOL de acetato sódico 3 M (pH 5.2) y 2.5 VOL de etanol 96-100%. Mezcle bien e incube a -20°C varios minutos si la concentración de ARN es elevada, o varias horas para concentraciones pequeñas de ARN. Centrifugue 10 min a velocidad máxima. Lave el pellet de ARN con etanol 70%. Elimine los restos de etanol y resuspenda el ARN en H₂O libre de ARNasas.</i></p>

9. EXTRACCIÓN SIMULTÁNEA DE ARN Y ADN (RNA/DNA Buffer Tool Set)

El **RNA/DNA Buffer Tool Set** consiste en un set de buffers (Ref. 21.213 no incluido en el Kit) para la purificación simultánea de ARN y ADN a partir de una única muestra.

Los bufferes incluidos (buffer de lavado de ADN y buffer de elución de ADN) han sido especialmente formulados para su uso en conjunto con el Speedtools Total RNA Extraction Kit, permitiendo una eficiente elución secuencial de ADN y ARN a partir de la misma columna de unión de ARN incluida en el Kit.

Una vez que los ácidos nucleicos procedentes de la muestra se encuentran unidos a la columna de sílica y posterior al lavado de la misma con los buffers de lavado, el **ADN se eluirá de la membrana con un buffer de elución para ADN de baja fuerza iónica** en tanto que el ARN permanecerá unido. A continuación los restos de ADN presentes en la columna se digerirán con una **rDNasa** como en el Paso 7 del Protocolo Estándar. Para eliminar los fragmentos de ADN digeridos así como sales, buffer y enzima se lava la columna con los bufferes de lavado incluidos en el Kit, finalmente el **ARN es eluido en agua libre de RNasas**.

10. RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Problemas	Posibles causas y sugerencias
ARN degradado /no se obtiene ARN	<p>Contaminación con RNasas</p> <ul style="list-style-type: none"> Trabaje en una zona libre de RNasas. Utilice guantes durante todo el proceso y cámbielos frecuentemente. Utilice material fungible desechable y libre de nucleasas. Mantenga los tubos cerrados siempre que sea posible. El material de vidrio debe de esterilizarse en el horno durante 2 horas a 250°C.
Baja calidad del ARN obtenido o bajo rendimiento	<p>Reactivos no reconstituidos correctamente o no han sido aplicados</p> <ul style="list-style-type: none"> Los reactivos no han sido reconstituidos correctamente. Añada el volumen indicado de RNase-free H₂O al vial rDNase, y etanol 96 % al Buffer WR2 (concentrado). Mezcle y almacene los reactivos siguiendo las instrucciones de la Sección 6. La muestra y los reactivos no han sido bien mezclados. Ayúdese del vortex si es necesario. No se ha añadido etanol después del paso de lisis. La unión de ARN a la columna solo es efectiva en presencia de etanol. <p>Almacenamiento del Kit</p> <ul style="list-style-type: none"> Reconstituya y almacene el vial liofilizado de rDNase de acuerdo a las instrucciones de la Sección 5. Almacene el resto de componentes del kit a temperatura ambiente. Las bajas temperaturas puede causar precipitación de sales en ciertos buffers. Mantenga los envases y viales bien cerrados para evitar evaporación y contaminaciones. <p>Influencia del pH y fuerza iónica del buffer en A₂₆₀ así como en el ratio A_{280/260}</p> <ul style="list-style-type: none"> Para medir absorbancia utilice como diluyente Tris 5 mM (pH 8.5). <p>Material de partida</p> <ul style="list-style-type: none"> La muestra no ha sido almacenada correctamente. De ser posible trabaje con muestras frescas, de lo contrario congele la muestra en nitrógeno líquido y manténgala a -70°C, no deje descongelar la muestra sin añadir el Buffer LR. Realice la desintegración del tejido en presencia de nitrógeno líquido. Insuficiente desintegración y/o homogenización de la muestra. Asegúrese que la muestra se homogeniza en su totalidad utilizando las columnas de filtración provistas por el Kit.
Ratio A260 / A230 baja	<p>Restos de tiocianato de guanidinium en la muestra</p> <ul style="list-style-type: none"> Depositar cuidadosamente el lisado en la RNA Binding Column y evitar la contaminación de la parte superior de la columna <p>Asegurarse de eliminar los residuos del Buffer WR1 con el Buffer WR2. Para garantizar una eliminación completa, aplicar Buffer WR2 a la parte interior de la columna.</p>
Obtención de la columna / ARN de baja calidad o mal rendimiento	<p>Material de partida</p> <ul style="list-style-type: none"> Se ha utilizado demasiado material de partida. Si se carga en exceso la columna se reduce su rendimiento. Reduzca el contenido de material de partida o utilice mayor volumen de Buffer LR. Insuficiente desintegración y/o homogenización de la muestra. Asegúrese que la muestra está desintegrada y homogenizada para ello utilice las columnas de filtración.

Problemas	Causas posibles y sugerencias
Contaminación del ARN con ADN genómico	<p>rDNase no es activa</p> <ul style="list-style-type: none"> Reconstituya y almacene el vial liofilizado de rDNase según se indica en la Sección 6. <p>La mezcla de reacción de la DNase no ha sido bien aplicada</p> <ul style="list-style-type: none"> Aplique la mezcla de reacción de la rDNase directamente en el centro de la membrana de sílica. <p>Se ha utilizado demasiado material de partida</p> <ul style="list-style-type: none"> Reduzca la cantidad de células o tejido utilizado. <p>Sistema de detección de ADN demasiado sensible</p> <ul style="list-style-type: none"> La cantidad de ADN contaminante se reduce de forma significativa mediante la digestión en columna de la rDNasa. Sin embargo no se puede garantizar que el ARN obtenido es 100% libre de ADN. En ensayos muy sensibles se pudiera detectar ADN; en este caso se aconseja realizar la digestión con rDNasa en solución (post-elución-Protocolo 8.H.). Siempre que pueda diseñe dianas de un tamaño >500 bp, así como <i>intron spanning</i> primers.
El ARN purificado no funciona bien en las aplicaciones testadas	<p>Presencia de etanol y sal</p> <ul style="list-style-type: none"> No deje que el exterior de la columna (su extremo final) entre en contacto con el buffer de lavado WR2. Centrifugue a la velocidad y tiempo correspondiente para así eliminar los restos de etanol del buffer WR2. Antes de uso equilibre el Buffer WR2 a temperatura ambiente. Los lavados a baja temperatura reducen la eficiencia del Buffer WR2. <p>Almacenamiento del ARN purificado</p> <p>Una vez eluido el ARN de la columna trabaje en hielo, para evitar degradación del ARN por RNasas. Se recomienda conservar el ARN purificado a -20°C por periodos de almacenaje cortos y a -70°C por periodos largos.</p>

11. INFORMACIÓN SOBRE PEDIDOS

SPEEDTOOLS KIT	10 PREPS	50 PREPS	250 PREPS
SPEEDTOOLS DNA EXTRACTION KIT	Ref. 21.130	Ref. 21.131	Ref. 21.132
SPEEDTOOLS TISSUE DNA EXTRACTION KIT	Ref. 21.135	Ref. 21.136	Ref. 21.137
SPEEDTOOLS RNA VIRUS EXTRACTION KIT	Ref. 21.140	Ref. 21.141	Ref. 21.142
SPEEDTOOLS FOOD DNA EXTRACTION KIT	Ref. 21.175	Ref. 21.176	Ref. 21.177
SPEEDTOOLS PLANT DNA EXTRACTION KIT	Ref. 21.170	Ref. 21.171	Ref. 21.172
SPEEDTOOLS TOTAL RNA EXTRACTION KIT	Ref. 21.210	Ref. 21.211	Ref. 21.212
SPEEDTOOLS PCR CLEAN-UP KIT	Ref. 21.200	Ref. 21.201	Ref. 21.202
SPEEDTOOLS PLASMID DNA PURIFICATION KIT	Ref. 21.220	Ref. 21.221	Ref. 21.222

12. LIMITACIONES Y GARANTÍA

1. Producto para uso exclusivo en investigación en análisis *in vitro*.
2. El kit no ha sido diseñado para identificar un determinado microorganismo o para uso clínico (diagnóstico, terapia u otros usos no específicamente contemplados).
3. Es responsabilidad del usuario verificar la validez de uso del kit para una aplicación específica, pues el kit no ha sido validado para un determinado microorganismo o tipo de células.
4. La documentación incluida en el kit especifica su uso, deben seguirse fielmente las instrucciones con el fin de obtener ARN de alta calidad.
5. BIOTOOLS garantiza la conformidad del kit con las especificaciones del producto.
6. La obligación de BIOTOOLS y los derechos del comprador bajo esta garantía están limitados: bien al reemplazo por parte de BIOTOOLS de cualquier producto que sea deficiente en fabricación, y que deberá ser retornado a BIOTOOLS (portes pagados), o a opción de BIOTOOLS, devolución del precio de adquisición.
7. BIOTOOLS no se responsabilizará de daños o defectos debidos al transporte. Las reclamaciones por mercancía dañada han de dirigirse al transportista. El seguro de transporte de mercancías es responsabilidad del cliente.
8. BIOTOOLS no tendrá responsabilidad sobre ningún daño directo, indirecto, consecuencia o incidente resultante del uso, mal uso, resultado del uso o de la incapacidad de uso del kit. Tampoco se responsabiliza de los defectos en productos o componentes no manufacturados por BIOTOOLS, o daños consecuencia de esos productos o componentes exógenos a BIOTOOLS.
9. Ninguna otra garantía de ningún tipo, directa o indirecta, expresa o implícita, incluyendo sin limitación, garantías implícitas de capacidad de comercialización, o adecuación para un propósito determinado, son dadas por BIOTOOLS.
10. La garantía de este boletín, así como las especificaciones y descripciones de este kit que aparecen en el catálogo son los únicos documentos válidos de la garantía del producto. Comunicados escritos u orales por los comerciales, distribuidores o técnicos de BIOTOOLS, excepto declaraciones escritas firmadas por un directivo autorizado de BIOTOOLS, carecen de valor alguno y no forman parte de la garantía del contrato de venta.
11. Las indicaciones/aplicaciones del producto están sujetas a cambios por lo cual se recomienda contactar con nuestro servicio técnico para obtener información actualizada de los productos de BIOTOOLS. También puede contactar su comercial o distribuidor local para una información general.
12. Las aplicaciones mencionadas en el boletín o demás documentos de BIOTOOLS tienen un carácter meramente informativo. BIOTOOLS no garantiza que todas las aplicaciones hayan sido testadas en sus laboratorios. Para más información contacte nuestro Departamento Técnico (info@biotools.eu).

Fabricado por:

BIOTOOLS, Biotechnological & Medical Laboratories, S.A. han sido evaluados y certificados en cuanto al cumplimiento de los requisitos de ISO 9001:2000 para las siguientes actividades: investigación y desarrollo de productos de biotecnología, fabricación de productos de biotecnología y fabricación de productos para diagnóstico *in vitro* (IVDs). Valle de Tobalina – 52 – Nave 39, 28021 Madrid – España

© 2008 BIOTOOLS, Biotechnological & Medical Laboratories, S.A. Todos los derechos reservados.