

K 1502



ARN PuriPrep kit

Extracción y purificación rápida
de ARN a partir de:
cultivo de células • bacterias
• tejidos • sangre

USO EN INVESTIGACION
IN VITRO



ARN PuriPrep kit

Versión: 1.2
23/4/2024

ÍNDICE

Presentación.....	6
Importante.....	6
Componentes del kit.....	6
Condiciones de conservación.....	7
Garantía.....	7
Advertencia.....	8
Preparación de reactivos.....	8
Material de partida para la purificación de ARN.....	9
Protocolo a partir de muestras de células en cultivo.....	10
Protocolo a partir de muestras de tejidos.....	10
Protocolo a partir de bacterias.....	11
Protocolo a partir de sangre	12
Protocolo de purificación del ARN.....	13
Protocolos anexos.....	14
Pureza, Integridad y cuantificación del ARN.....	15
Solución de inconvenientes.....	17

PRESENTACIÓN

Highway® ARN PuriPrep kit permite la extracción y purificación rápida de ARN total a partir de muestras de cultivo de células, bacterias, tejidos y sangre. Algunas muestras requieren un tratamiento adicional específico previo a la lisis, que se describe en la sección correspondiente. La purificación de ARN puede realizarse a partir de las muestras frescas o almacenadas tanto en solución de preservación de ARN como en ARN-PrepZOL.

Todo el proceso demanda no más de 30-35 minutos y no requiere el empleo de fenol, cloroformo o pasos de precipitación. Remueve proteínas, ADN genómico y otras impurezas y se obtiene un ARN íntegro y puro, adecuado para su empleo en técnicas de biología molecular.

IMPORTANTE

Antes de dirigirse a la sección de Protocolos es importante leer las secciones Condiciones de Conservación, Garantía, Advertencias y Preparación de los reactivos.

COMPONENTES DEL KIT

<i>Highway® ARN PuriPrep kit</i>	
Catálogo	K1502-50
Cantidad de muestras	50
Minicolumnas con tubos colectores	100
Agua de elución (3 viales de 2 ml cada uno) (A0105)	6 ml
Buffer de lisis (BL) (B0706)	36 ml
Buffer lavado 1 (BLav 1) conc (B0707)	36 ml
Buffer lavado 2 (BLav 2) conc (B0708)	12 ml

Materiales que aportará el usuario

Microcentrífuga con rotor para viales de 1,5 y 2 ml, micropipetas de 50, 200 y 1000 μ l, microtubos de 1,5 o 2 ml, β -mercaptoetanol, etanol 100%, etanol 70% (para todos los protocolos).

Mortero y N2 liquido (para protocolo de tejidos).

Lisozima en buffer TE (para protocolo de bacterias).

Solución isotónica de lisis de eritrocitos (SILE) y tubos falcon 15 ml estériles libre de DNAsas y RNAsas para el protocolo de sangre.

DNasa I (RNasa free).

Productos relacionados

Producto <i>Highway</i> ®	Catálogo
Solución isotónica de lisis de eritrocitos (SILE) 250 ml	B0206
Lisozima	E1405
Buffer TE 1x	B0401
DNasa I (RNasa free)	K1212
Inhibidor RNasa	R0020

CONDICIONES DE CONSERVACIÓN

Los componentes de *Highway*® ARN PuriPrep kit buffers y minicolumnas, pueden conservarse a temperatura ambiente.

GARANTÍA

Highway® ARN PuriPrep kit debe emplearse siguiendo las especificaciones y aplicaciones indicadas en el manual de procedimientos provisto. El uso en aplicaciones no especificadas será responsabilidad del usuario quien deberá realizar la validación correspondiente.

Cualquier falla que se produjera en el uso del kit, habiendo respetado los protocolos del fabricante, queda cubierta por garantía de Inbio Highway. En ese caso se reemplazará el kit por otro semejante.

Por otra parte, el fabricante atenderá toda duda planteada por el cliente, en el empleo del kit o interpretación del Manual.

ADVERTENCIAS

Algunos de los reactivos contienen sustancias caotrópicas, en caso de salpicaduras lavar con abundante agua y jabón. No son compatibles con reactivos desinfectantes que contienen cloro. Producto para investigación de uso *In Vitro*.

Se deben usar guantes en todo momento al manipular muestras y componentes del kit. Se recomiendan cambios frecuentes de guantes. Las superficies de trabajo deben estar limpias.

Las centrifugaciones deben realizarse a temperatura ambiente (15-30°C) y los buffers de lisis y de lavados deben estar también a esa temperatura. El proceso debe ser realizado lo más rápido posible para evitar degradación del ARN.

Se deben utilizar materiales plásticos estériles descartables libres de DNAsas y RNAsas para manipular el ARN.

Si los experimentos posteriores exigen requisitos estrictos de pureza del ARN, se puede agregar un paso final de digestión con DNasa I (RNasa free). La DNasa I (RNasa free) no se suministra en este kit, consulte los reactivos opcionales en Productos relacionados. Referirse a la sección protocolos anexos.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

BL: Añadir 10 µl de β-ME por 1 ml de **buffer de lisis**, en el momento de usar.

Buffer de lavado 1 (BLav 1): Se entrega **concentrado**. Requiere la adición de etanol (100%) en las cantidades indicadas a continuación:

Tipo de kit	BLav 1 conc. (ml)	Etanol (ml)	Vol. final (ml)
50	36	9	45

Homogeneizar antes de usar. Marcar en la etiqueta la adición de etanol (X).

Buffer de lavado 2 (BLav 2)

Se entrega **concentrado**. Requiere la adición de etanol (100%) en las cantidades indicadas a continuación:

Tipo de kit	BLav 2 conc. (ml)	Etanol (ml)	Vol. final (ml)
50	12	48	60

Homogeneizar antes de usar. Marcar en la etiqueta la adición de etanol (X).

MATERIAL DE PARTIDA PARA LA PURIFICACIÓN DE ARN

Para obtener mejores resultados, utilizar muestras frescas. El rendimiento de ARN será menor cuanto mayor sea el tiempo de conservación de la muestra. Para el caso de tejidos que no se procesen inmediatamente, congelar las muestras y guardarlas a -70 °C para uso futuro. Las muestras almacenadas en reactivos de estabilización de ARN son compatibles con este procedimiento de purificación (ver protocolos anexos).

Se recomienda no exceder la cantidad de material de partida. De lo contrario, la lisis será incompleta y los contaminantes celulares pueden interferir con la unión del ARN a la membrana de la minicolumna, lo que resulta en un menor rendimiento y pureza.

La disrupción y homogeneización eficiente del material de partida es esencial para el aislamiento del ARN intracelular. Una lisis incompleta da como resultado rendimientos significativamente menores.

PROTOCOLO A PARTIR DE MUESTRAS DE CELULAS EN CULTIVO

CONSIDERACIONES PREVIAS

Utilizar un máximo de 3×10^6 células por purificación. Es posible que sea necesario ajustar el número según el tipo de células.

PROTOCOLO

1. Estimar el número de células en el cultivo.
2. Centrifugar el volumen de cultivo apropiado en un microtubo estéril a $500 \times g$ durante 5 minutos y retirar con cuidado todo el sobrenadante del medio.
3. Resuspender las células sedimentadas en 600 μ l de buffer de lisis.
4. Pipetear el lisado hacia arriba y hacia abajo varias veces para homogeneizar.
5. Proceder según la sección Purificación del ARN.

PROTOCOLO A PARTIR DE MUESTRAS DE TEJIDOS

CONSIDERACIONES PREVIAS

En general, la masa de tejido a lisar y homogeneizar debe ser ≤ 30 mg, pero puede ajustarse para ciertos tejidos.

Guía de cantidades de partida de tejido:

Tipo de tejido de ratón	Cantidad recomendada (mg)
Hígado	30
Bazo	10
Riñón	20
Pulmón	30
Corazón	10

PROTOCOLO

1. Cortar el tejido en pequeños trozos y moler utilizando un mortero que contenga nitrógeno líquido, hasta obtener un polvo fino. No permitir que el tejido se descongele, agregando nitrógeno mientras dure el proceso de disrupción.
2. Pesar la cantidad recomendada de polvo del tejido en un microtubo estéril de 1,5 ml.
3. Agregar 600 µl de buffer de lisis al microtubo que contiene el polvo de tejido.
4. Pipetear hacia arriba y hacia abajo varias veces hasta homogeneizar.
5. Proceder según la sección Purificación del ARN.

PROTOCOLO A PARTIR DE BACTERIAS

CONSIDERACIONES PREVIAS

Reconstituir la lisozima: 1mg/ml en buffer TE estéril (Estos reactivos deben ser proporcionados por el usuario).

Se recomienda que no se utilicen más de 3×10^9 células bacterianas (DO_{600} : 1 es aproximadamente equivalente a 1×10^9 células bacterianas/ml cultivo).

PROTOCOLO

1. Centrifugar la cantidad necesaria de cultivo de bacterias a 12.000 x g durante 2 minutos y retirar con cuidado todo el sobrenadante.
2. Resuspender el pellet bacteriano en 100 µl buffer TE con lisozima 1 mg/ml.

3. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Agregar 600 μ l de buffer de lisis.
5. Pipetear el lisado hacia arriba y hacia abajo varias veces para homogeneizar.
6. Proceder según la sección Purificación del ARN.

PROCOLO A PARTIR DE SANGRE

CONSIDERACIONES PREVIAS

Utilizar sangre entera fresca conservada con EDTA (hasta 700 μ l).

Los eritrocitos se lisan con solución isotónica de lisis de eritrocitos (SILE), no provisto con el kit.

Verificar el tamaño de tubo necesario para seguir el protocolo.

PROCOLO

1. Mezclar 1 volumen de sangre entera (700 μ l) con 5 volúmenes de SILE (3,5 ml) en un tubo tipo Falcon de 15 ml.
2. Incubar 3 minutos a temperatura ambiente
3. Centrifugar a 6500 x g durante 1 minuto y descartar el sobrenadante.
4. Lavar el pellet de leucocitos con 2 volúmenes de SILE (1,4 ml).
5. Centrifugar a 6500 x g durante 1 minuto y descartar el sobrenadante.
6. Agregar 600 μ l de buffer de lisis al pellet celular.
7. Pipetear el lisado hacia arriba y hacia abajo varias veces para homogeneizar.
8. Proceder según la sección Purificación del ARN.

PROCOLO PURIFICACION DEL ARN

1. Transferir la muestra lisada (máximo 700 μ l) a una minicolumna colocada en un tubo colector de 2 ml. Cerrar la tapa con cuidado y centrifugar durante 2 min a $\geq 12.000 \times g$. Conservar el filtrado y descartar la minicolumna.
2. Añadir 1 volumen de etanol 70% al filtrado y mezclar bien pipeteando. Importante: No centrifugar (pueden aparecer precipitados)
3. Transferir hasta 700 μ l de la muestra, incluido el precipitado que pueda haberse formado, a una nueva minicolumna de centrifugación colocada en un tubo colector de 2 ml (suministrado). Cerrar la tapa con cuidado y centrifugar durante 1 minuto a $\geq 12.000 \times g$. Descartar el filtrado. Si el volumen de muestra lisada superara los 700 μ l centrifugar las alícuotas sucesivas en la misma minicolumna. Descartar el filtrado después de cada centrifugación.
4. Agregar 700 μ l de buffer de lavado 1 (BLav1) a la minicolumna. Cerrar la tapa con cuidado y centrifugar durante 1 minuto a $\geq 12.000 \times g$. Descartar el filtrado del tubo colector.
5. Agregar 500 μ l de buffer de lavado 2 (BLav2) a la columna. Cerrar la tapa con cuidado y centrifugar durante 1 minuto a $\geq 12.000 \times g$. Descartar el filtrado del tubo colector.
6. Agregar 500 μ l de buffer de lavado 2 (BLav2) a la minicolumna. Cerrar la tapa con cuidado y centrifugar durante 2 minutos a $\geq 12.000 \times g$.
7. Colocar la minicolumna en un microtubo estéril de 1,5 ml (no suministrado) y desechar el tubo colector junto con el filtrado. Cerrar la tapa con cuidado y centrifugar a máxima velocidad durante 2 minutos. La centrifugación seca la membrana de la columna, asegurando que no

se arrastre etanol durante la elución del ARN. El etanol residual puede interferir con las reacciones posteriores.

8. Colocar la minicolumna en un microtubo estéril nuevo de 1,5 ml (no suministrado). Agregar de 30 a 50 μ l de agua de elución, libre de RNasa sobre la membrana de la minicolumna, sin tocarla con el tip. Cerrar la tapa suavemente y centrifugar durante 1 min a $\geq 12.000 \times g$ para eluir el ARN.

- **La muestra de ARN purificada debe ser almacenada a -70°C .** Evitar ciclos de descongelamiento.

PROTOS COLOS ANEXOS

Tratamiento del ARN purificado con DNasa I (RNasa free)

Para reducir cualquier vestigio de ADN genómico, se puede tratar el ARN eluido con DNasa I (RNasa free, K1212) en una reacción separada. El tratamiento con DNasa puede ser necesario para ciertas aplicaciones de ARN que son sensibles a cantidades muy pequeñas de ADN (ej: RT-qPCR).

1. Agregar en un tubo estéril libre de nucleasas:

Inhibidor de RNasa (R0020)	1 μ l
Buffer de DNasa 10X (B0600)	2 μ l
DNasa I (RNasa free E1408)	2 μ l
RNA a tratar	15 μ l

2. Incubar 30 minutos a 37°C .
3. Agregar 2 μ l de solución stop (B0601).
4. Incubar 10 minutos a 65°C .
5. Conservar a -70°C hasta su posterior uso.

Purificación a partir de muestras almacenadas en reactivos de estabilización de ARN

Células:

Centrifugar las células conservadas en reactivos de estabilización de ARN a 5000 x g durante 5 minutos y retirar el sobrenadante antes de la purificación de ARN. Alternativamente, diluir la solución de conservación de ARN agregando un volumen igual de PBS frío y centrifugar a 500 x g durante 10 minutos.

Proceder según el punto 3 del protocolo a partir de muestras de células en cultivo.

Tejidos:

Retirar el tejido de la solución de almacenamiento utilizando pinzas estériles. Eliminar cualquier exceso reactivo.

Proceder inmediatamente según el protocolo de purificación de ARN a partir de muestras de tejidos.

Purificación de ARN a partir muestras extraídas con ARN-PrepZOL:

Transferir la fase acuosa de una muestra extraída con ARN-PrepZOL a un tubo libre de RNasas (no incluido).

Agregar un volumen igual de etanol 70% (no incluido) y mezclar bien.

Proceder según el punto 3 del protocolo purificación del ARN.

PUREZA, CUANTIFICACIÓN E INTEGRIDAD DEL ARN

La concentración y pureza del ARN se puede determinar midiendo la absorbancia a 260 nm y 280 nm en un espectrofotómetro. Una absorbancia de 1 unidad a 260 nm corresponde a 40 µg de ARN por ml. La relación entre los valores de absorbancia a 260 y 280 nm proporciona una estimación de la pureza del ARN y debe ser cercano a 2,0. El rendimiento de ARN total depende del material de partida y la cantidad utilizada, así como de la eficiencia de la lisis y homogenización de la muestra.

Tipo de muestra	Rendimiento µg
Células (1*10x6 Calu-3)	5-10
Bacterias (E. coli DH5alpha 3*10x9)	50
Tejido ratón	Rendimiento µg/ mg tejido
Hígado	0,8
Bazo	2,8
Riñón	1,7
Pulmón	0,7
Corazón	ND

El rendimiento con tejido de corazón de ratón no pudo determinarse mediante espectrofotómetro debido a la escasa cantidad presente en dichas muestras, pero el ARN aislado dio como resultado una señal de RT-PCR específica.

El ARN purificado debería quedar libre de impurezas que interfieren en una RT-PCR de acuerdo con los procedimientos de control de calidad. La ausencia de ADN contaminante se comprueba mediante una PCR directa, sin reacción de transcripción reversa previa (utilizando de 50 a 100 ng de ARN como molde no se debería obtener ningún producto de amplificación). Para reducir cualquier vestigio de ADN genómico se podrá tratar su muestra de ARN eluído con DNasa I (RNasa free) (ver catálogo productos relacionados y protocolos anexos).

La integridad del ARN total purificado con el kit puede ser comprobado mediante electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante. Las especies ribosómicas relevantes aparecen como bandas definidas en el gel teñido. La banda de ARN ribosomal 28S debe observarse más intensa que la banda de ARN ribosomal 18S tanto para células como para tejido de ratón. Lo mismo ocurre para bacterias con la banda del ARN ribosomal 23S y 16S.

SOLUCIÓN DE INCONVENIENTES

Inconveniente	Posibles Causas y Soluciones
<p>Bajo rendimiento en el ARN eluído</p>	<p>Lisis u homogeneización incompleta de la muestra. Verificar que se haya agregado β-mercaptoetanol a la solución de lisis y asegurar la disrupción y homogeneización total de la muestra.</p> <p>Distintos tejidos y células tienen diferentes contenidos de ARN y por lo tanto el rendimiento puede variar considerablemente.</p> <p>Verificar la cantidad de etanol agregada al filtrado antes de unirse a la segunda minicolumna.</p>
<p>ARN degradado</p>	<p>Puede ocurrir degradación del ARN si la muestra no se congela instantáneamente o no se protege con un reactivo de preservación.</p> <p>Se recomienda que las muestras de ARN sean conservadas a -70°C. Para el almacenamiento a corto plazo, las muestras de ARN pueden conservarse a -20°C.</p> <p>Se pueden introducir RNasas durante el uso del kit. Seguir las advertencias y utilizar materiales adecuados cuando se trabaja con ARN. Para mantener la integridad del ARN, es importante que el procedimiento se realice rápidamente</p>

<p>Baja Pureza (relación 260/280 y 260/230)</p>	<p>Contaminación por etanol y/o sales. Después de los pasos de centrifugación, retirar con cuidado la minicolumna del tubo de recolección para evitar arrastrar la solución. Alternativamente, secar el tubo de recolección vacío con toalla de papel.</p> <p>Verificar que el lisado y los buffers de lavado hayan pasado completamente a través de la minicolumna. Esto puede requerir centrifugar a una velocidad mayor y/o más tiempo.</p> <p>Verificar el correcto agregado de etanol a los buffers de lavado 1 y 2.</p>
<p>Contaminación con ADN</p>	<p>Reducir la cantidad de material de partida para garantizar que la minicolumna no está sobrecargada.</p> <p>Para eliminar la contaminación del ADN genómico se puede realizar una digestión con DNasa I en la muestra de ARN después de la elución. Se recomienda utilizar el kit DNasa I (RNasa-Free) <i>Highway</i>®</p>

INBIO HIGHWAY S.A.

Serrano 1414 - (7000) - Tandil - Argentina

Tel: +54 (249) 442 0193

Dir. Tec. Bioq. A. Carolina Prokopiuk

contacto@inbiohw.com.ar

www.inbiohw.com.ar



PRODUCIDO
EN ARGENTINA

ES UN PRODUCTO DE

