



DANAGENE SALIVA RNA KIT

Ref.0809.1 50 extracciones

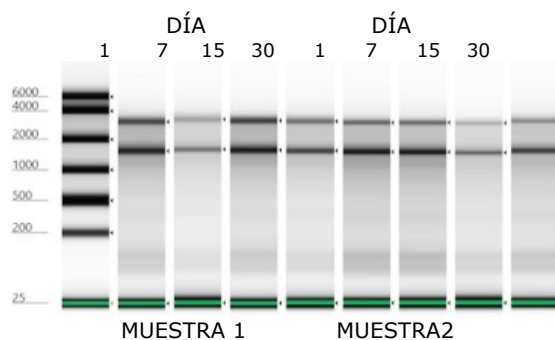
1. INTRODUCCIÓN

DANAGENE SALIVA RNA Kit ha sido diseñado para una **purificación rápida y eficiente de ARN total a partir de muestras de saliva conservadas en nuestro DANASALIVA RNA Sample Collection Kit.**

El proceso incluye una lisis celular con proteinasa K seguida de una precipitación de las proteínas y parte del ADN genómico. Posteriormente, mediante una precipitación con isopropanol, se obtiene el ARN total, que finalmente se rehidrata. Finalmente, para la eliminación del ADN genómico contaminante se utiliza un enfoque que consiste en dos filtraciones secuenciales con diferentes columnas MiroSpin.

Características:

- **Aislamiento de ARN total utilizando tampones combinado con eliminación del ADN genómico con columnas.**
- **Volumen de la muestra: 600 ul de muestra de saliva conservada.**
- **El ARN se aísla sin el uso de productos químicos nocivos como el fenol o el cloroformo.**
- **A260 / 280: > 1.8**
- **Volumen de elución: 50 ul**



ARN total purificado y analizado en el Agilent 4200 TapeStation System

2. COMPONENTES KIT

	50 extracciones	Almacenamiento
Tampón de Precipitación	12 ml	Temperatura ambiente
Tampón Resuspensión/Unión	22 ml	Temperatura ambiente
Tampón de Lavado*	10 ml	Temperatura ambiente
Agua libre de nucleasas	8 ml	Temperatura ambiente
Proteinasa K*	30 mg	-20°C
Columnas gDNA removal	50 unidades	Temperatura ambiente
Columna Unión ARN	50 unidades	Temperatura ambiente
Tubos de Recogida	100 unidades	Temperatura ambiente

(*) Estas soluciones deben ser preparadas como se indica en la secciones de Preparaciones Preliminares del protocolo.

2.1 Equipos y reactivos necesarios y no provistos

- Microcentrifuga.
- Microtubos de 1.5 ml y 2.0 ml.
- Etanol 100%.
- Isopropanol.
- Baño de agua, baño seco o bloque con calefacción (90°C).

3. PROTOCOLO

3.1 Preparaciones Preliminares

- Disolver la proteinasa K en **1.3 ml** en agua libre de nucleasas y conservar a -20°C . **Se recomienda realizar varias alícuotas** para evitar demasiados ciclos de descongelado-congelado. A esta temperatura es estable durante 1 año.
- **Añadir el Etanol 100 % al Tampón de Lavado** indicado en la etiqueta, unos **40 ml**. Mantener el envase bien cerrado para evitar la evaporación del etanol.

3.2 Protocolo de extracción de ARN total

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 ARN. Se puede volver a centrifugar brevemente para recoger las últimas gotas de etanol residual.

Eliminación ADN genómico contaminante

1. **Añadir 400 µl del Tampón de Resuspensión/Unión** .Resuspender completamente el pellet de ARN con micropipeta.
2. **Incubar a 55°C durante 15 minutos.**
3. **Transferir la muestra a una columna gDNA removal.** Colocar la spin column en un tubo de recogida.
4. **Centrifugar durante 1 minuto a 10.000 r.p.m.**
5. Añadir **400 µl de etanol 100% al sobrenadante recogido en el punto 4.** Mezclar bien.
6. Coger una **columna de unión ARN** más su tubo de recolección y añadir la mezcla del punto 5. 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.
7. Añadir **700 µl Tampón de Lavado.** Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.
8. **Centrifugar 3 minutos a máxima velocidad** para eliminar todo el etanol.
9. Colocar la columna en un microtubo nuevo de 1.5 ml (no suministrado con el kit) para eluir el ARN .
10. Eluir el ARN en **50 µl de Agua libre de Nucleasas.** Incubar 2 minutos y centrifugar **a máxima velocidad** durante **1 minuto**.

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