



REAL TOTAL RNA SPIN BLOOD KIT

Ref. RBMER12 50 Preps.

1. INTRODUCCIÓN

Este kit permite la obtención de **ARN total libre de ADN** directamente de **sangre total** sin un previo aislamiento de los linfocitos utilizando para ello una **Solución de Lisis Estabilizadora y columnas con membranas de sílica**.

Cuando se recolecta sangre para una posterior extracción de ARN, muchas veces se requiere un almacenamiento previo a la extracción ya que dicha extracción se ha de realizar en otro lugar diferente. Además si sumamos que el aislamiento de ARN a partir de sangre es problemático debido a que el ARN es extremadamente sensible a la degradación por parte de las ribonucleasas, de las cuales los eritrocitos son una rica fuente, se hace necesario un sistema para estabilizar el ARN en sangre total.

Para ello utilizamos una **Solución de Lisis Estabilizadora** que simultáneamente lisa las células, inactiva las RNasas y estabiliza el ARN preservando su integridad. **De esta forma las muestras pueden ser transportadas y conservadas durante 2 días a 4°C o durante 15 días a -20°C.**

Se pueden procesar 50 muestras de 300 µl de sangre total recogida según los procedimientos standard en tubos que contengan anticoagulantes, se recomienda el uso de EDTA como anticoagulante, también se puede utilizar ACD, no se recomienda el uso de heparina ya que se ha visto que produce una baja eficiencia en RT-PCR.

El rendimiento de ARN total a partir de 300 µl de sangre total es típicamente unos 0.2–0.3µg, cantidad suficiente para realizar unos 10 experimentos de RT-PCR.

1. INTRODUCTION

*This kit allows the obtaining of **DNA-free total RNA** directly from **whole blood** without previous lymphocytes isolation and using for such purpose a **Stabilizing Lysis Solution and silica membrane columns**.*

When blood is collected for a later RNA extraction, it is usually necessary to storage previous to the extraction, as such extraction must be done in a different place. If we add to this the fact that the storage of RNA from blood is difficult due to the extremely high RNA sensibility to degradation by ribonucleases, which erythrocytes are rich in, it becomes necessary to have a system to stabilize the RNA in total blood.

*For that reason we use a **Stabilizing Lysis Solution** that simultaneously lysis the cells, inactivates the RNases and stabilizes the RNA preserving its integrity. **This way, the samples can be transported and stored for 2 days at 4°C or for 15 days at -20°C.***

You can process 50 samples of 300 µl of whole blood collected according to the standard methods in tubes containing anticoagulants, the use of EDTA is recommended as anticoagulant. You can also use ACD, we don't recommend the use of heparin as it produces a low efficiency in RT-PCR.

The total RNA yield from 300 µl of total blood is usually around 0.2–0.3µg, enough quantity to do about 10 RT-PCR experiments.

Sistema de producción certificado bajo norma ISO

Production system certified under ISO



2. COMPONENTES DEL KIT

KIT COMPONENTS

	Ref.	Ref. RBMER11 50 preps	T ^a
Solución de Lisis Estabilizadora <i>Stabilizing Lysis Solution</i>	ERC1	25 ml	RT
Solución STOP DNasa <i>DNase STOP Solution</i>	ERC2	15 ml	RT
Solución de Lavado Concentrada <i>Concentrated Wash Solution</i>	ERC3	12.5 ml	RT
Tampón de Desalado de la Membrana <i>Membrane Desalting Buffer</i>	ERCM	25 ml	RT
Tampón de Reacción de la DNasa <i>DNase Reaction Buffer</i>	ERCD	7 ml	RT
Dnasa libre de RNasa (liofilizada) RNase-free DNase (lyophilized)	--	1 vial	4°C
Agua Libre de Nucleasas <i>Nuclease-free Water</i>	ERCH	15 ml	RT
Columnas de Unión ARN + Tubos Recolección <i>RNA Binding Columns + Collection Tubes</i>	ERC11	50 unid.	RT
Columnas de Filtración <i>Filtration Columns</i>	ERC12	50 unid.	RT
Tubos de Recolección <i>Collection Tubes</i>	ERC13	150 unid.	RT
Tubos de 1.5 ml <i>1.5 ml Tubes</i>	ERC14	50 unid.	RT

3. PROTOCOLO GENERAL

GENERAL PROCEDURE

3.1 Preparaciones preliminares

- **Reconstituir la DNasa I libre de RNasa liofilizada, añadir 540 µl de agua libre de nucleasas al vial** e incubar 1 minuto a temperatura ambiente, mezclar hasta disolver la DNasa I. Dispensar en alícuotas y conservar a -20°C. No descongelar/congelar más de 3 veces las alícuotas.
- **Añadir 50 ml de alcohol 100 % a la solución de lavado concentrada, marcar la fecha.**
- **ATENCIÓN:** La Solución de Lisis Estabilizadora, la solución STOP DNasa I y el Tampón de Desalado Membrana contiene guanidina tiocianato. Utilizar guantes y gafas como protección. En caso de contacto lavarse con agua abundantemente.

3.1 Preliminary Preparations

- **Reconstitute the lyophilized RNase-free DNaseI, add 540 µl of nuclease-free water to the vial** and incubate 1 minute at room temperature, mix until the DNase I is dissolved. Dispense into aliquots and store at -20°C. Do not thaw/freeze the aliquots more than 3 times
- **Add 50 ml of 100 % Alcohol to the concentrated wash solution, mark the date.**
- **ATTENTION:** The Stabilizing Lysis Solution, the DNaseI STOP solution and the Membrane Desalting Buffer contains guanidine thiocyanate. Use gloves and glasses for protection. In case of contact wash with water.



3.2 Protocolo de extracción de ARN a partir de 300 µl de sangre total

1. Recoger **300 µl de sangre total** de acuerdo con los procedimientos Standard en tubos que contengan anticoagulante, mezclar la muestra suavemente. Inmediatamente pasar la muestra a un microtubo que contenga **500 µl de Solución de Lisis Estabilizadora**. De esta forma las muestras pueden ser transportadas y conservadas durante 2 días a 4°C o durante 15 días a -20°C. Si se desea procesar la muestra.
2. Reducir la viscosidad y limpiar el lisado por filtración a través de **una columna de filtración**. Colocar la columna de filtración en un tubo de recolección, aplicar el lisado y **centrifugar 1 minuto a 11.000 x g**. Transferir el filtrado a un nuevo tubo de centrifuga. **No agitar el pellet** de desechos celulares que se puede observar en el fondo del tubo de recolección después de la centrifugación. Si sucede volver a centrifugar este tubo de recolección y recoger el filtrado.
3. Añadir **700 µl de Etanol 70 %** al filtrado resultante del paso 2 y mezclar por vortex o pipeteo. Después de añadirse el etanol se puede observar un precipitado que no afectará al proceso, asegurarse de cargar todo el precipitado en la columna.
4. Coger una **columna de unión ARN** más su tubo de recolección y añadir **750 µl del lisado**. Centrifugar a **8.000 x g (10.000 rpm)** durante **30 segundos**. Repetir el proceso exactamente igual con **los restantes 750 µl de lisado**. Colocar la columna en un nuevo tubo de recolección.
5. Añadir **350 µl de Tampón de Desalado Membrana** y centrifugar a **máxima velocidad (11.000 x g)** durante **1 minuto** para secar la membrana. La eliminación de las sales producirá una digestión de la DNasa I mucho más efectiva. Evitar el contacto del final de la columna con el líquido a desechar.
6. Preparar la **mezcla de reacción de la DNasa I** en un microtubo estéril, para cada extracción, añadir **10 µl de DNasa I** reconstituida y **90 µl de Tampón de Reacción DNasa I**. Mezclar.
7. Aplicar **95 µl de la mezcla de reacción de la DNasa** directamente en el centro de la membrana de sílica de la columna. Incubar a **temperatura ambiente** durante **15 minutos**.
8. Añadir **200 µl Solución STOP/DNasaI** a la columna. Centrifugar a **8.000 x g** durante **30 segundos**. Colocar la columna en un nuevo tubo de recolección. Este tampón inactivará la DNasaI.
9. Añadir **600 µl de Solución de Lavado** a la columna. Centrifugar a **8.000 x g** durante **30 segundos**. Desechar el líquido y colocar de nuevo la columna en el tubo de recolección.
10. Añadir **250 µl de Solución de Lavado** a la columna. Centrifugar **2 minutos a máxima velocidad (11.000 x g)** para secar completamente la membrana. Colocar la columna en un microtubo de 1.5 ml (suministrado). Si por alguna razón, el líquido toca la columna después de la centrifugación, repetir el proceso.
11. Añadir **30 µl de Agua libre de Nucleasas** (suministrada) en la columna, asegurándose de que queda toda bien empapada. **Incubar 1 minuto a temperatura ambiente**. Centrifugar a **máxima velocidad (11.000 x g)** durante **1 minuto**
12. Añadir de nuevo otros **30 µl de Agua libre de Nucleasas** en la misma columna, manteniendo también el tubo de recolección y centrifugar a **máxima velocidad (11.000 x g)** durante **1 minuto**. En total se obtendrán unos **60 µl de ARN**

3.3 Protocol for RNA extraction from 300 µl of whole blood

1. Collect **300 µl of whole blood** according to the Standard methods in tubes containing anticoagulants, and mix the sample carefully. **Immediately**, put the sample into a microtube containing **500 µl Stabilizing Lysis Solution**. This way the samples can be transported and stored for 2 days at 4°C or for 15 days at – 20°C. Process the sample if desired.
2. Reduce viscosity and clean the lysate by filtration through a **filtration column**. Place the filtration column in a collection tube, apply the lysate and **centrifuge 1 minute at 11.000 x g**. Transfer the filtrate into a new centrifuge tube. **Don't shake the pellet** from cell debris, which can be observed at the bottom of the collection tube.. If this happens centrifuge once again this tube and collect the filtrated.
3. Add **700 µl of 70% Ethanol** to the filtrated obtained in step 2 and mix with vortex or pipette. After adding the ethanol you can see a precipitate that won't affect the process. Be sure to load all the precipitate on the column.
4. Take a **RNA Binding Column** plus collection tube and add **750 µl of the lysate**. Centrifuge at **8.000 x g (10.000 r.p.m.) for 30 seconds**. Repeat the process exactly the same with the **750 µl of the lysate remaining**. Place the column in a new collection tube.
5. Add **350 µl of the Membrane Desalting Buffer** and centrifuge at **maximum speed (11.000 x g) for 1 minute** to dry the membrane. The salt removal will produce a **DNase I digestion** much more effective. If the column outlet has come into contact with the flow-through for any reason, discard the flow-through and centrifuge again for 30 seconds at 11.000 x g.
6. Prepare the **DNase I Reaction mixture** in a sterile microtube, for each extraction, add **10 µl of reconstituted DNase I** to **90 µl of DNase I Reaction Buffer**. Mix.
7. Apply **95 µl of DNase Reaction mixture** directly onto the centre of the silica membrane of the column. Incubate at **room temperature for 15 minutes**.
8. Add **200 µl of STOP/DNase I Solution** to the RNA binding column. Centrifuge at **8.000 x g for 30 seconds**. Place the tube in a new collection tube. This buffer will inactivate the DNase I.
9. Add **600 µl of Wash Solution** to the column. Centrifuge at **8.000 x g for 30 seconds**. Remove the liquid and place the column back in the collection tube.
10. Add **250 µl of Washing Solution** to the column. Centrifuge for **2 minutes at maximum speed (11.000 x g)** to completely dry the membrane. Place the column in a 1.5 ml (supplied) microtube. If for any reason, the liquid touches the column after the centrifugation, repeat the process.
11. Elute the RNA in **30 µl of Nuclease-free Water** (supplied) be sure that all the membrane is well soaked. **Incubate for 1 minute at room temperature**. Centrifuge at **maximum speed (11.000 x g) for 1 minute**.
12. Add again **30 µl of Nuclease-free Water** to the same column, with the same collection tube. Centrifuge at **maximum speed (11.000 x g) for 1 minute** Finally it will be obtained **60 µl of RNA**..

4. GUIA DE PROBLEMAS Y POSIBLES SOLUCIONES TROUBLESHOOTING

- | | |
|---|--|
| <ol style="list-style-type: none">1. ARN degradado o no se obtiene ARN<ol style="list-style-type: none">1.1. Intentar crear una zona de trabajo con un ambiente libre de RNasas, se puede utilizar para limpiar las superficies y material el RNasa Remove (Ref.RD056). Cambiar de guantes frecuentemente. Se recomienda el uso de tubos estériles y que estén cerrados siempre que se pueda durante el proceso2. Baja calidad o poca cantidad del ARN obtenido<ol style="list-style-type: none">2.1. Reactivos no reconstituidos adecuadamente. Añadir la cantidad indicada de agua libre de nucleasas al vial de la DNasaI y etanol a la Solución de lavado concentrada. | <ol style="list-style-type: none">1. Degraded RNA or not RNA obtaining<ol style="list-style-type: none">1.1. Try to create an RNase-free area inside your lab. You can use RNase Remove (Ref.RD056) for cleaning the material and surfaces. Change gloves frequently. It is recommended to use sterile tubes and to keep them close when possible during the process.2. Low quality or low quantity of RNA obtained<ol style="list-style-type: none">2.1. Reagents not correctly reconstituted. Add the indicated quantity of nuclease-free water to the DNase I vial ad Ethanol to the concentrated wash Solution.2.2. The samples and the reagents have not been completely mixed. |
|---|--|



- 2.2. La muestra y reactivos no han sido mezclados completamente
 - 2.3. No se ha añadido etanol después de la lisis. La unión del ARN a la membrana de sílica es sólo efectiva en presencia de alcohol
 - 2.4. Conservar todos los componentes del kit como se indica. El almacenamiento a bajas temperaturas puede producir precipitación de sales
 - 2.5. Mantener los envases bien cerrados para prevenir la evaporación o contaminación
 - 2.6. La muestra no ha sido conservada apropiadamente. Siempre que se pueda utilizar material fresco, sino es posible, congelar la muestra en Ni líquido y mantenerlas a -70°C hasta añadir la Solución de Lisis.
 - 2.7. Insuficiente homogenización del material inicial, siempre pulverizar las muestras en presencia de Ni Líquido. Utilizar las columnas de filtración.
- 3. Sobrecarga de la membrana**
- 3.1. Se ha utilizado demasiado material inicial. Una sobrecarga de la columna puede llevar a un bajo rendimiento. Reducir la cantidad de muestra o utilizar una mayor cantidad de Solución de Lisis.
- 4. Contaminación con ADN genómico**
- 4.1. DNasa I no activa. Reconstituir y almacenar la DNasa I según las instrucciones proporcionadas.
 - 4.2. Pipetear la solución de la DNasa I directamente en el centro de la membrana de sílica.
 - 4.3. Reducir la cantidad de material inicial utilizado.
- 5. Bajo rendimiento del ARN en las siguientes aplicaciones o experimentos**
- 5.1. La solución de lavado que contiene etanol no ha sido eliminada completamente. Asegurarse que el final de la columna no contacta con el líquido después del 2º lavado.
 - 5.2. Comprobar que la solución de lavado ha sido equilibrada a temperatura ambiente antes de usar. Lavar a bajas temperaturas produce un descenso en la eficiencia de eliminar las sales.

- 2.3. *The ethanol has not been added after the lysis. The RNA will only bind to the silica membrane under the presence of alcohol*
 - 2.4. *Store the kit components as indicated in the protocol. Low temperature storages can cause salts precipitation*
 - 2.5. *Keep the containers correctly closed to prevent evaporation*
 - 2.6. *The sample hasn't been correctly preserved. Use, if possible, fresh material. If it is not possible, freeze the sample in liquid Nitrogen and store them at -70°C until you add the Lysis Solution*
 - 2.7. *The initial material hasn't been enough homogenized. Always spray the samples in presence of liquid Nitrogen. Use the filtration columns.*
- 3. Overloaded membrane**
- 3.1. *Too much initial material has been used. An overloaded membrane can lead to a low yield. Reduce the sample quantity or use a bigger quantity of Lysis Solution.*
- 4. Contamination with Genomic DNA**
- 4.1. *Not active DNase I. Reconstitute and store the DNase I according to the supplied instructions.*
 - 4.2. *Pipette the DNase I solution directly on the centre of the silica membrane.*
 - 4.3. *Reduce the sample starting quantity.*
- 5. Low RNA yield in following applications or experiments**
- 5.1. *The Wash solution that contains ethanol has not been completely removed. Be sure that the end of the column does not touch the liquid after 2nd wash.*
 - 5.2. *Check that the Wash solution has been balanced at room temperature before use. Washing at low temperatures produces a decrease on the salt removal efficiency.*