

# REAL TISSUE/CELLS RNA KIT

Ref. **RBMER20:** (para **100 EXTRACCIONES**)  
 Ref. **RBMER21:** (para **150 EXTRACCIONES**)

(for **100 EXTRATION**)  
 (for **150 EXTRATION**)

## 1. INTRODUCCIÓN

Este kit está optimizado para ser un método rápido y eficiente para aislar **ARN total a partir de tejidos y células utilizando MicroSpin Columns** sin el uso de reactivos tóxicos como el cloroformo o fenol.

El kit REAL TISSUE / CELLS RNA integra una columna de eliminación de ADN genómico. Esta columna elimina rápida y eficientemente la mayor parte de ADN más genómico sin necesidad de digestión por DNasa.

En el primer paso, las células y los tejidos se lisan sin necesidad del uso de  $\beta$ -mercaptoetanol. La sal caotrópica incluida en el **RNA Lysis Solution** inactiva inmediatamente las RNasas. El lisado se añade a la **MicroSpin Columns** para clarificar el lisado y eliminar el gDNA contaminante. Después de la adición de la **Protein Precipitation Solution (RNA)** al flujo, el ARN se une a la **Spin RNA Columns**. Posteriormente, dos etapas de lavado eliminan sales, metabolitos y componentes celulares. El ARN de alta calidad se eluye con H<sub>2</sub>O libre de ARNasa.

### Características:

- Eficiente y rápido aislamiento de ARN total.
- Filtración del lisado y eliminación del ADN genómico en una misma columna.
- Completa eliminación de contaminantes e inhibidores.
- Tamaño muestra: < 1x 10<sup>7</sup> células en cultivo; 25 mg tejido animal o humano.
- Volumen de elución: 30  $\mu$ l.
- No se utiliza fenol/cloroformo, gradientes de CICs, ni precipitaciones de LiCl o etanol.

## 1. INTRODUCTION

This kit is optimized to be a fast and efficient method to isolate **total RNA from tissues and cells using MicroSpin Columns** without the use of toxic reagents such as chloroform or phenol.

The REAL TISSUE / CELLS RNA kit integrates a genomic DNA removal column. This column quickly and efficiently removes most genomic DNA without the need for DNase digestion.

In the first step, cells and tissues are lysed without the use of  $\beta$ -mercaptoethanol. The chaotropic salt included in the **RNA Lysis Solution** immediately inactivates RNases. The lysate is added to the **MicroSpin Columns** to clarify the lysate and remove contaminating gDNA. After addition of the **Protein Precipitation Solution (RNA)**, the RNA binds to the **Spin RNA Columns**. Subsequently, two wash steps remove salts, metabolites and cellular components. The high-quality RNA is eluted with RNAase-free H<sub>2</sub>O.

### Features:

- Efficient and rapid isolation of total RNA.
- Lysate filtration and genomic DNA removal on the same column.
- Complete removal of contaminants and inhibitors.
- Sample size: < 1x 10<sup>7</sup> cells in culture; 25 mg animal or human tissue.
- Elution volume: 30  $\mu$ l.
- No phenol/chloroform, CICs gradients, LiCl or ethanol precipitation.

## 2. COMPONENTES DEL KIT / KIT COMPONENTS

Componente REAL	Ref.	Envase (100 Preps)	Envase (150 Preps)	T°
Washing solution 2	EP09	20 ml	4x20 ml	RT
Washing solution 1	ER14	10 ml	50 ml	RT
Nuclease-Free Water	ER7	8 ml	40 ml	RT
MicroSpin columns	RSC05	100 unid.	500 unid.	RT
Spin RNA Columns	RSCV02	100 unid.	500 unid.	RT
RNA lysis solution	V01	45 ml	2x100 ml	RT
Protein precipitation solution (RNA)	V02	4 ml	20 ml	RT
Collection Tubes	R30	200 unid.	1000 unid.	RT

(\*). Estas soluciones deben prepararse como se indica en la sección Preparaciones preliminares del protocolo.

**El RNA Lysis Solution y el Washing Solution 1 contienen guanidinio de isotiocianato que es un potente irritante, llevar guantes y gafas protectoras. Ambos tampones pueden formar componentes reactivos peligrosos cuando se combinan con lejía.**

(\*). These solutions must be prepared as indicated in the Preliminary Preparations section of the protocol.

**RNA Lysis Solution and Washing Solution 1 contain isothiazacyanate guanidinium which is a potent irritant, wear gloves and goggles. Both buffers can form hazardous reactive components when combined with bleach.**

### Equipos y reactivos necesarios y no provistos con el kit

- Etanol 100 %
- Microcentrifuga.
- Micropipetas
- Tubos de microcentrifuga de 1,5 ml o 2,0 ml sin RNasa.
- Homogenizadores generales para homogenizar tejidos animales.
- Nitrógeno líquido.
- Ambiente libre de ARNasas.

### Equipment and additional reagents required

- 100 % Ethanol.
- Microcentrifuge.
- Micropipettes
- RNase-free 1.5 ml or 2.0 ml microfuge tubes.
- General homogenisers for homogenising animal tissues.
- Liquid Nitrogen , mortar and pestle.
- RNAase-free environment.

## 3.PROTOCOLO GENERAL

## 3. GENERAL PROCEDURE

### 3.1 Preparaciones preliminares

- Añadir **80 ml Etanol 100 %** (kit 100 extracciones) al **Washing Solution 2** y unos **80 ml** a cada envase (kit 500 extracciones) indicado en la etiqueta. Mantener el envase bien cerrado para evitar la evaporación del etanol.

### 3.1 Preliminary Preparations

- Add **80 ml 100 % ethanol** (kit 100 extractions) to **Washing Solution 2** and about **80 ml** to each container (kit 500 extractions) indicated on the label. Keep the container tightly closed to avoid evaporation of the ethanol.

### 3.2 Recomendaciones generales

#### Toma de muestra e inhibición de las RNasas

El ARN no está protegido hasta que el material de la muestra se congela instantáneamente o se rompe/lisa en presencia de agentes inhibidores o desnaturalizantes de las RNasas.

Métodos de recolección de muestras:

- Utilice una muestra recién recolectada para su lisis inmediata y la purificación de ARN.
- Las muestras se pueden almacenar en el **RNA Lysis Solution** después de la lisis a -70 ° C durante un año, a 4 ° C durante un máximo de 24 horas o hasta varias horas a temperatura ambiente. Las muestras congeladas en **RNA Lysis Solution** deben descongelarse lentamente antes de comenzar con el aislamiento del ARN.
- Congelar la muestra en Ni líquido inmediatamente después de la recolección y almacenar a 70 ° C. Esto se puede realizar con un mortero pulverizando la muestra en un estado congelado. Asegurarse de que la muestra no se descongela antes del contacto con el tampón de lisis.
- Las muestras pueden ser sumergidas y almacenadas en **RNAlater**. Antes de usar tales muestras, retire el exceso de RNAlater del tejido antes de usarlo.

### 3.2 General recommendations

#### Sample collection and RNase inhibition

RNA is not protected until the sample material is flash frozen or cleaved/smoothed in the presence of RNase inhibiting or denaturing agents.

Sample collection methods:

- Use a freshly collected sample for immediate lysis and RNA purification.
- Samples can be stored in **RNA Lysis Solution** after lysis at -70°C for one year, at 4°C for up to 24 hours or up to several hours at room temperature. Samples frozen in **RNA Lysis Solution** should be thawed slowly before starting RNA isolation.
- Freeze the sample in liquid Ni immediately after collection and store at 70 °C. This can be done with a mortar and pestle. This can be done with a mortar and pestle by spraying the sample in a frozen state. Ensure that the sample does not thaw before contact with the lysis buffer.
- Samples can be immersed and stored in **RNAlater**. Before using such samples, remove excess RNAlater from the tissue before use.

#### Rotura/lisis y homogenización de la muestra

Una eficiente rotura/lisis y homogenización de la muestra es el más importante requerimiento para tener éxito en el proceso de aislamiento del ARN total. Ambos términos son 2 pasos distintos:

Rotura/Lisis: Se requiere una completa rotura de las paredes celulares y membranas plasmáticas de las células y orgánulos para liberar todo el ARN presente en la muestra. Una rotura insuficiente dará lugar a rendimientos bajos.

#### Sample breakage/lysis and homogenisation

Efficient sample breakage/lysis and homogenisation is the most important requirement for a successful total RNA isolation process. Both terms are two distinct steps:

Breakage/Lysis: Complete breakage of the cell walls and plasma membranes of cells and organelles is required to release all RNA present in the sample. Insufficient breakage will result in low yields.

Homogenización: Es necesaria para reducir la viscosidad del lisado producido. Una incompleta homogenización resultará en una ineficiente unión del ARN a la membrana y por tanto un rendimiento bajo.

Algunos métodos de rotura simultáneamente homogenizan la muestra también (**homogenizadores eléctricos manual**) mientras que otros requieren un paso adicional de homogenización.

### **3.3 Protocolo para purificación de ARN a partir de tejido animal o humano**

Procesar muestras de **hasta 25 mg** de tejido fresco o congelado y pulverizarlo con Ni líquido.

**IMPORTANTE:** Es esencial para una eficiente preparación de ARN que todo el ARN que contiene la muestra sea liberado de las células por la homogenización con un homogeneizador mecánico (tipo Polytron), tener cuidado en mantener el rotor sumergido para evitar formar mucha espuma y elegir un homogeneizador con un rotor de 5-7 mm que pueda ser utilizado en microtubos.

Para los tejidos frescos y blandos utilizar el homogeneizador; para los tejidos frescos duros o ricos en RNasas pulverizar con Ni líquido; para los tejidos congelados blandos o pequeñas piezas utilizar el homogeneizador; para todos los demás tejidos congelados pulverizar con Ni líquido.

La purificación de ARN a partir de músculo esquelético, corazón y piel puede tener dificultades debido a la abundancia de proteínas contráctiles, tejido conectivo y colágeno. Para eliminar estas proteínas que pueden interferir con la purificación, la muestra debe ser tratada con proteinasa K.

1. Añadir **400 µl de ARN Lysis Solution** al tejido pulverizado con Ni líquido. Homogenizar con homogeneizador eléctrico manual o pasar el lisado 10 veces a través de una jeringa con una aguja 20-G (0.90 mm). Incubar durante 3 minutos a temperatura ambiente.
2. Añadir **30 µl de Protein Precipitation Solution (RNA)**. Vortex e incubar 1 minuto.
3. Centrifugar **3 minutos a máxima velocidad. Pasar el sobrenadante a una MicroSpin Columns.**
4. **Centrifugar 1 minuto a 8.000 rpm.** Transferir el filtrado a un nuevo tubo de centrifuga. *Este paso también elimina gran parte del ADN genómico contaminante, no siendo total para aquellas aplicaciones que requieren una eliminación total, para ello realizar un tratamiento con DNasa I en la columna o una vez eluido el ARN.*
5. Añadir **350 µl de etanol 100% al lisado recogido en el punto 4.** Mezclar bien.
6. Coger una **Spin RNA Columns** más su **Collection Tubes** y añadir el lisado. Centrifugar a **8.000 -10.000 rpm** durante **60 segundos.**
7. Añadir **100 µl Washing Solution 1.** Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.
8. Añadir **700 µl Washing Solution 2.** Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.
9. **Centrifugar 3 minutos a máxima velocidad** para eliminar todo el etanol.
10. Colocar la columna en un microtubo nuevo de 1.5 ml (no suministrado con el kit) para eluir el ARN total.

Homogenisation: This is necessary to reduce the viscosity of the lysate produced. Incomplete homogenisation will result in inefficient binding of RNA to the membrane and therefore low yields.

Some breakage methods simultaneously homogenise the sample as well (**manual electric homogenisers**) while others require an additional homogenisation step.

### **3.3 Protocol for RNA purification from animal or human tissue**

Process samples of up to **25 mg** of fresh or frozen tissue and spray with liquid Ni.

**IMPORTANT:** It is essential for efficient RNA preparation that all RNA contained in the sample is released from the cells by homogenisation with a mechanical homogeniser (Polytron type), take care to keep the rotor submerged to avoid excessive foaming and choose a homogeniser with a 5-7 mm rotor that can be used in microtubes.

For fresh and soft tissues use the homogeniser; for fresh hard or RNase-rich tissues spray with liquid Ni; for frozen soft tissues or small pieces use the homogeniser; for all other frozen tissues spray with liquid Ni.

Purification of RNA from skeletal muscle, heart and skin can be difficult due to the abundance of contractile proteins, connective tissue and collagen. To remove these proteins that can interfere with purification, the sample should be treated with proteinase K.

1. Add **400 µl of ARN Lysis Solution** to the tissue sprayed with liquid Ni. Homogenise with a manual electric homogeniser or pass the lysate 10 times through a syringe with a 20-G needle (0.90 mm). Incubate for 3 minutes at room temperature.
2. Add **30 µl Protein Precipitation Solution (RNA)**. Vortex and incubate for 1 minute.
3. Centrifuge **3 minutes at maximum speed. Transfer the supernatant to a MicroSpin Columns.**
4. **Centrifuge for 1 minute at 8000 rpm.** Transfer the filtrate to a new centrifuge tube. This step also removes a large part of the contaminating genomic DNA, not being total for those applications that require a total elimination, for which a DNase I treatment must be carried out on the column or once the RNA has been eluted.
5. Add **350 µl of 100% ethanol to the lysate collected in step 4.**
6. Take an **Spin RNA Columns** plus its **Collection Tubes** and add the lysate. Centrifuge at **8,000-10,000 rpm** for **60 seconds.**
7. Add **100 µl Washing Solution 1.** Centrifuge at maximum speed for 1 minute.
8. Add **700 µl Washing Solution 2.** Centrifuge at maximum speed for 1 minute.
9. **Centrifuge at maximum speed for 3 minutes** to remove all ethanol.
10. Place the column in a new 1.5 ml microtube (not supplied with the kit) to elute the total RNA.

11. Eluir el ARN en **30 µl de Nuclease-Free Water**. Incubar 2 minutos y centrifugar a **máxima velocidad** durante **1 minuto**.
12. Repetir el punto 11 utilizando otros **30 µl de Nuclease-Free Water**. Incubar 2 minutos y centrifugar a **máxima velocidad** durante **1 minuto**. También se puede utilizar el eluido del punto 11 si se requiere una elevada concentración de ARN pero en este caso el rendimiento será de un 25 % menor que si se realiza una segunda elución.

### **3.4 Protocolo para purificación de ARN a partir de células en cultivo (<math>1 \times 10^7</math>)**

#### **Células cultivadas adheridas en una placa**

Eliminar el medio de cultivo y lavar las células con PBS. Aspirar el PBS y añadir 0.10-0.30 % de tripsina en PBS e incubar hasta que las células se separen de la superficie de la placa. Entonces, añadir medio de cultivo y traspasar las células a un tubo apropiado y centrifugar para obtener el pellet celular. Eliminar el sobrenadante y proceder con el punto 1.

#### **Células cultivadas en suspensión**

Transferir las células en cultivo (hasta  $1 \times 10^7$ ) a un microtubo estéril de 1.5 ml. Centrifugar a 6000 x g durante 1 minuto. Eliminar el sobrenadante y proceder con el punto 1.

1. Añadir **400 µl de RNA Lysis Solution** y resuspender las células con la micropipeta. Incubar durante 15-20 minutos a temperatura ambiente.
2. Añadir **30 µl de Protein Precipitation Solution (RNA)**. Vortex e incubar 1 minuto.
3. Centrifugar **3 minutos a máxima velocidad. Pasar el sobrenadante a una MicroSpin Columns.**
4. **Centrifugar 1 minuto a 8.000 rpm.** Transferir el filtrado a un nuevo tubo de centrifuga. *Este paso también elimina gran parte del ADN genómico contaminante, no siendo total para aquellas aplicaciones que requieren una eliminación total, para ello realizar un tratamiento con DNasa I en la columna o una vez eluido el ARN.*
5. Añadir **350 µl de etanol 100% al lisado recogido en el punto 4.** Mezclar bien.
6. Coger una **Spin RNA Columns** más su tubo de recolección y añadir el lisado. Centrifugar a **8.000 - 10.000 rpm durante 60 segundos.**
7. Añadir **100 µl Washing Solution 1.** Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.
8. Añadir **700 µl Washing Solution 2.** Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.
9. **Centrifugar 3 minutos a máxima velocidad** para eliminar todo el etanol.
10. Colocar la columna en un microtubo nuevo de 1.5 ml (no suministrado con el kit) para eluir el ARN total.

11. Elute the RNA in **30 µl Nuclease-Free Water**. Incubate for 2 minutes and centrifuge **at maximum speed** for **1 minute**.
12. Repeat step 11 using another **30 µl of Nuclease-Free Water**. Incubate 2 minutes and centrifuge **at maximum speed** for **1 minute**. The eluate from step 11 can also be used if a high concentration of RNA is required but in this case the yield will be 25 % lower than if a second elution is performed.

### **3.4 Protocol for RNA purification from cultured cells (<math>1 \times 10^7</math>)**

#### **Adherent cultured cells in a dish**

Remove the culture medium and wash the cells with PBS. Aspirate PBS and add 0.10-0.30 % trypsin in PBS and incubate until cells detach from the plate surface. Then add culture medium and transfer the cells to an appropriate tube and centrifuge to obtain the cell pellet. Remove supernatant and proceed to step 1.

#### **Suspension cultured cells**

Transfer cultured cells (up to  $1 \times 10^7$ ) to a sterile 1.5 ml microtube. Centrifuge at 6000 x g for 1 minute. Discard the supernatant and proceed to step 1.

1. Add **400 µl of RNA Lysis Solution** and resuspend the cells with the micropipette. Incubate for 15-20 minutes at room temperature.
2. Add **30 µl Protein Precipitation Solution (RNA)**. Vortex and incubate for 1 minute.
3. Centrifuge 3 minutes at maximum speed. Transfer the supernatant to a **MicroSpin Columns**.
4. **Centrifuge 1 minute at 8000 rpm.** Transfer the filtrate to a new centrifuge tube. This step also removes a large part of the contaminating genomic DNA, not being total for those applications that require a total elimination, for this, carry out a treatment with DNase I in the column or once the RNA has been eluted.
5. Add **350 µl of 100% ethanol to the lysate collected in step 4.**
6. Take an **Spin RNA Columns** plus its collection tube and add the lysate. Centrifuge at **8,000 - 10,000 rpm for 60 seconds.**
7. Add **100 µl Washing Solution 1.** Centrifuge at maximum speed for 1 minute.
8. Add **700 µl Washing Solution 2.** Centrifuge at maximum speed for 1 minute.
9. **Centrifuge at maximum speed for 3 minutes** to remove all ethanol.
10. Place the column in a new 1.5 ml microtube (not supplied with the kit) to elute the total RNA.

11. Eluir el ARN en **30 µl de Nuclease-Free Water**. Incubar 2 minutos y centrifugar **a máxima velocidad** durante **1 minuto**.
12. Repetir el punto 11 utilizando otros **30 µl de Nuclease-Free Water**. Incubar 2 minutos y centrifugar **a máxima velocidad** durante **1 minuto**. También se puede utilizar el eluido del punto 11 si se requiere una elevada concentración de ARN pero en este caso el rendimiento será de un 25 % menor que si se realiza una segunda elución.

11. Elute the RNA in **30 µl Nuclease-Free Water**. Incubate for 2 minutes and centrifuge **at maximum speed** for **1 minute**.
12. Repeat step 11 using a further **30 µl of Nuclease-Free Water**. Incubate for 2 minutes and **centrifuge at maximum speed** for **1 minute**. The eluate from step 11 can also be used if a high concentration of RNA is required but in this case the yield will be 25 % lower than if a second elution is performed.

#### 4. APENDICE

##### DNasa digestión en solución

El paso de la muestra lisada a través de una **MicroSpin Columns** de acuerdo con el protocolo estándar es muy eficaz en la unión del ADN, dando lugar a un mínimo de ADN residual en el ARN purificado. El ADN residual no será detectable en la mayoría de las aplicaciones posteriores. A pesar de ello, todavía hay ciertas aplicaciones que requieren contenidos aún más bajos de ADN residual. Sin embargo, la eliminación del ADN a un nivel completamente indetectable es complicado y la eficiencia de la columna de eliminación de Gdna a veces no es suficiente para aplicaciones posteriores que requieren un contenido residual más bajo de ADN. Esto puede ocurrir especialmente en casos donde se procesa una gran cantidad de muestra o una muestra que contiene mucho ADN. La cantidad de ADN residual detectado depende del tipo de muestra, la cantidad y su contenido de ADN y la sensibilidad de detección del método utilizado para analizar el ADN residual.

La digestión del ADN en solución puede destruir eficientemente el ADN contaminante. Sin embargo, normalmente se requiere un control estricto de RNasas y posterior repurificación del ARN (con el fin de eliminar tampón, sales, ADNasa y ADN digerido).

Recomendamos el uso de nuestro **REAL DNA Removal Kit** que proporciona un método para eliminar el ADN genómico contaminante en preparaciones de ARN utilizando 2 filtraciones secuenciales con diferentes columnas. Se debe tener en cuenta que este método reduce la cantidad de ARN, es por ello que es importante decidir si es necesario la eliminación completa del posible ADN contaminante para la realización de nuestra aplicación posterior.

#### APPENDIX

##### DNase digestion in solution

Passing the lysed sample through a **MicroSpin Columns** according to the standard protocol is very efficient in binding DNA, resulting in minimal residual DNA in the purified RNA. Residual DNA will not be detectable in most downstream applications. Despite this, there are still certain applications that require even lower residual DNA contents. However, the removal of DNA to a completely undetectable level is complicated and the efficiency of the Gdna removal column is sometimes not sufficient for downstream applications that require a lower residual DNA content. This can occur especially in cases where a large amount of sample or a sample containing a lot of DNA is processed. The amount of residual DNA detected depends on the type of sample, the amount and its DNA content and the detection sensitivity of the method used to analyse the residual DNA.

Digestion of DNA in solution can efficiently destroy contaminating DNA. However, strict control of RNases and subsequent repurification of RNA (in order to remove buffer, salts, DNAase and digested DNA) is usually required.

We recommend the use of our **REAL DNA Removal Kit** which provides a method to remove contaminating genomic DNA in RNA preparations using 2 sequential filtrations with different columns. It should be noted that this method reduces the amount of RNA, which is why it is important to decide whether complete removal of possible contaminating DNA is necessary for the realisation of our subsequent application.

#### 4. ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

- Todos los componentes son estables durante 12 meses desde la fecha de la compra siendo almacenados como se indica.

#### STORAGE AND STABILITY

- All components are stable for 12 months from date of purchase when stored as directed

#### 5. GUIA DE PROBLEMAS Y POSIBLES SOLUCIONES / TROUBLESHOOTING

Para cualquier duda o consulta adicional sobre el protocolo pónganse en contacto con el servicio técnico de DURVIZ s.l. en [durviz@durviz.com](mailto:durviz@durviz.com).

For any further questions or doubts about the protocol, please contact DURVIZ s.l. technical service at [durviz@durviz.com](mailto:durviz@durviz.com).

## 6.SIMBOLOS / SYMBOLS

	Número de catálogo / <i>Catalogue number</i>		Fabricante / <i>Manufacturer</i>
	Limitación de temperatura / <i>Temperature limitation</i>		Uso exclusivo en investigación / <i>Research use only</i>
	Fecha de caducidad / <i>Expiration date</i>		Corrosivo / <i>Corrosive</i>
	Lote / <i>Lot</i>		Nocivo para el medio ambiente / <i>Harmful to the environment</i>
	Contiene suficiente para n pruebas / <i>Contains enough for n tests</i>		Irritante, sensibilizante y nocivo / <i>Irritant, sensitizing and harmful</i>



B65699985