

REAL MICRORNA KIT

Ref. RBMER28: (para 50 EXTRACCIONES)

(for 50 EXTRATION)

1.INTRODUCCIÓN

Este kit provee un método rápido y eficiente para la extracción y purificación de moléculas pequeñas de ARN (<200 nt) a partir de diferentes muestras como son, células animales cultivadas, pequeños tejidos animales, células bacterianas, levaduras y tejidos de plantas. Estos pequeños RNA incluyen moléculas reguladoras como **microARN (miARN)** y **el ARN de interferencia (ARNi)**.

La mayoría de kits comerciales de columnas no poseen la capacidad de recuperar las moléculas de ARN < 200 nucleótidos. Utilizando una aproximación que consiste en 2 filtraciones secuenciales con diferentes concentraciones de etanol, una fracción enriquecida en especies de ARN < 200 nucleótidos pueden obtenerse con el REAL MicroARN Kit.

Características:

- Aislamiento de microARN a partir de células cultivadas y tejidos.
- Protocolo rápido: 25 minutos.
- Aislamiento de microARN sin el uso de productos químicos nocivos como fenol o cloroformo.
- Aislamiento eficiente de pequeñas especies de ARN mediante un proceso de 2 columnas, lo que resulta en una contaminación mínima de ARN de mayor tamaño y ADNg.
- Volumen de elución: 30 µl.
- El ARN purificado puede utilizarse en una serie de aplicaciones posteriores, entre las que se incluyen: qPCR, PCR de transcripción inversa, Northern blotting, protección contra RNasas y ensayos de arrays de expresión.

1.INTRODUCTION

REAL MicroRNA Kit provides a rapid and efficient method for the isolation and purification of small RNA molecules (<200 nt) from cultured animal cells, small tissue samples, and bacterial cells. These small RNAs include regulatory RNA molecules such as **microRNA (miRNA)** and **short interfering RNA (siRNA)**.

Most commercial RNA purification kits do not recover RNA molecules smaller than < 200 nucleotides, using an approach consisting of two sequential filtrations with different ethanol concentrations, an RNA fraction highly enriched in RNA species < 200 nucleotides can be obtained with of REAL MicroRNA Kit.

Features:

- microRNA isolation from cultured cells and tissues.
- Fast protocol: 25 minutes.
- microRNA isolated without the use of harmful chemicals as phenol or chloroform.
- Efficient isolation of small RNA species using 2 column process, resulting in minimal contamination of larger RNA and gDNA.
- Elution volume: 30 µl.
- Purified RNA can be used in a number of downstream applications including: qPCR, reverse transcription PCR, Northern blotting, RNase protection and expression array assays.

2.COMPONENTES DEL KIT / KIT COMPONENTS

Componente REAL	Ref.	Envase. (50 Preps)	T°
RNA Lysis Solution	V01	20 ml	RT
Washing Solution 1	ER14	6 ml	RT
Washing Solution 2 *	ER6	10 ml	RT
Nuclease-Free Water	ER7	4 ml	RT
Columns RNA Large Removal	RSC02	50 unid.	RT
Spin RNA Columns	RSCV01	50 unid.	RT
Collection Tubes	R30	150 unid.	RT

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

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

Equipos y reactivos necesarios y no provistos

- Etanol 100%.
- Microcentrifuga
- Micropipetas
- Microtubos de 1.5 ml y 2.0 ml.
- Homogenizadores generales para homogenizar tejidos animales.
- Nitrógeno líquido.
- Ambiente libre de RNAsas.
- β -mercaptoetanol.
- PBS
- Tripsina
- Tampón TE: Tris-EDTA
- Tampón de Resuspensión : 50mM tris, pH 7.5, 10mM EDTA, 1M Sorbitol, 0.10% β -mercaptoetanol y 1 unidad/ μ l de Liticasa.

Equipment and reagents needed and not provided

- 100% ethanol.
- Microcentrifuge
- Micropipettes
- 1.5 ml and 2.0 ml microtubes.
- General homogenisers for homogenising animal tissues.
- Liquid nitrogen.
- RNAase-free environment.
- β -mercaptoethanol.
- PBS
- Trypsin
- Buffer TE: Tris-EDTA
- Buffer resuspension: 50mM Tris, pH 7.5, 10 mM EDTA, 1M Sorbitol, 0.10 % μ -mercaptoethanol and 1 unit / μ l of lyticase

3.PROTOCOLO GENERAL

3. GENERAL PROCEDURE

3.1 Preparaciones preliminares

- Añadir **40ml Etanol 100 %** al **Washing Solution 2** indicado en la etiqueta. Mantener el envase bien cerrado para evitar la evaporación del etanol.
- **OPCIONAL:** El uso de β -mercaptoetanol en la lisis es altamente recomendado para tejidos animales, particularmente en aquellos que se sabe que tienen un alto contenido en RNAsas (ejem. realpáncreas), al igual que en tejidos de plantas. También se recomienda para aquellos usuarios que quieren aislar RNA para aplicaciones muy sensibles. **Preparar una cantidad apropiada de RNA Lysis Solution añadiendo 10 μ l β -mercaptoetanol por 1ml de RNA Lysis Solution.** Alternativamente, la Solución de Lisis RNA puede ser utilizada tal y como es suministrada.

3.1 Preliminary preparations

- Add **40ml of Ethanol 100 %** to the **Washing Solution 2**. Keep the container closed to avoid the ethanol evaporation.
- **OPTIONAL:** The use of β -mercaptoethanol in lysis is highly recommended for most animal tissues, particularly those known to have a high RNAse content (ex.pancreas), as well as for most plant tissues. It is also recommended for users who wish to isolate RNA for sensitive downstream applications. **Add 10 μ l of β -mercaptoethanol** (provided by the user) to each 1 ml of **RNA Lysis Solution** required. Alternatively, the **RNA Lysis Solution** can be used as provided.

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 / lisado en presencia de inhibidores o agentes desnaturizantes de las RNAsas.

La estabilización inmediata del patrón de expresión del ADN es un requisito previo para un análisis preciso de la expresión génica.

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 -80°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 N_2 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 **RNA Lysis Solution**.
- Las muestras pueden ser sumergidas y almacenadas en **RNAlater**.

3.2 General important recommendations

Sample collection and RNase inhibition

The RNA is not protected until the sample material freezes instantaneously or breaks / lyses in the presence of inhibitors or denaturing agents of the RNases.

Immediate stabilization of the DNA expression pattern is a prerequisite for accurate gene-expression analysis.

Methods for sample collection

- Use a freshly collected sample for immediate lysis and RNA purification.
- Samples can be stored in the **RNA Lysis Solution** after lysis at -80°C for one year, at 4°C for up to 24 hours or up to several hours at room temperature. Frozen samples in **RNA Lysis Solution** should be thawed slowly before starting RNA isolation.
- Freeze the sample in liquid N_2 immediately after collection and store at 80°C . This can be done with a mortar and pestle by spraying the sample in a frozen state. Make sure that the sample does not thaw before contact with the **RNA Lysis Solution**.
- Samples can be submerged and stored in or **RNAlater**.

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. 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.

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 microARN a partir de tejido animal

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

- Colocar el tejido en un mortero que contenga una cantidad apropiada de nitrógeno líquido para cubrir la muestra. Pulverizar el tejido utilizando una mano de mortero. Permitir que el nitrógeno líquido se evapore, sin que el tejido se descongele.
- Pasar la muestra a un microtubo libre de RNAsas (no suministrado) y Añadir 400µl de **RNA 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 5 minutos a temperatura ambiente.**
- Centrifugar **3 minutos a máxima velocidad.**
- Pasar el sobrenadante a un microtubo libre RNAsas nuevo (no suministrado). **IMPORTANTE: Anotar la cantidad de sobrenadante/lisado.**
- Añadir **etanol 100%** siguiendo esta regla, **55µl de etanol 100% es añadido por cada 100 µl de sobrenadante/lisado.** Mezclar por vortex durante 10 segundos.
- Ensamblar una **Columns RNA Large Removal** con un **Collection tubes** que se suministra.
- Añadir el lisado + etanol a la columna. **Centrifugar durante 1 minuto a 10.000 rpm.**
- Retener el líquido que ha pasado a través de la columna y que se encuentra en el Collection tubes**, el cual contiene las **especies pequeñas de ARN.**
- Añadir **700µl de etanol 100%** al lisado recogido en el **punto 8.** Mezclar bien.
- Pasar la mitad del lisado a una **Spin RNA Columns** con su **Collection tubes.** **Centrifugar a 10.000 rpm durante 30 segundos.**
- Colocar la columna en un nuevo **Collection tubes.** **Pasar la otra mitad y centrifugar a 10.000 rpm durante 30 segundos.**
- Añadir **100 µl Washing Solution 1.** Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.
- Añadir **700µl Washing Solution 2.** Centrifugar a máxima velocidad (11.000 rpm) durante 1 minuto.
- Centrifugar 3 minutos a máxima velocidad (11.000 rpm) para eliminar todo el etanol.

Disruption and homogenization of starting materials for RNA isolation

Efficient disruption and homogenization of the starting material is an absolute requirement for all total RNA isolation procedures. Disruption and homogenization are two distinct steps.

Disruption: Complete disruption of cells walls and plasma membranes of cells and organelles is absolutely required to release all the RNA contained in the sample. Different samples requires different methods to achieve complete disruption. Incomplete disruption results in significantly reduced yields.

Homogenization: Is necessary to reduce the viscosity of the cells lysates produced by disruption. Homogenization shears the high-molecular-weight genomic DNA and other high-molecular-weight cellular components to create a homogeneous lysate. Incomplete homogenization results in efficient binding of RNA and therefore reduced yields.

Some disruption methods simultaneously homogenize the sample (**rotor-stator-homogenizer**) while others require an additional homogenization step

3.3 Protocol for microRNA purification from human or animal tissues

Process samples of up to **25mg** of fresh or frozen tissue. Grind the sample to a fine powder in the presence of liquid Nitrogen with a pestle and mortar.

- Transfer the tissue into a mortar that contains an appropriate amount of liquid nitrogen to cover the sample. Grind the tissue thoroughly using a pestle. Allow the liquid nitrogen to evaporate, without allowing the tissue to thaw.
- Transfer the sample to an RNase-free tube (not provided) and add 400µl de **RNA Lysis Solution.** Homogenize by passing the lysate 5-10 times through a 20-G (0.90 mm) gauge needle attached to a syringe or an electrical homogenizer. **Incubate at room temperature for 5 minutes.**
- Centrifuge for **3 minutes a maximum speed.**
- Transfer de supernatant to another RNase-free microcentrifuge tube (not provided). **IMPORTANT: Note the volume of the supernatant/lysate.**
- Add a volume of **100% ethanol** that is equivalent to **(55µl of 100 % ethanol is added to every 100µl of supernatant/lysate).** Mix by vortex for 10 seconds.
- Assemble a **Columns RNA Large Removal** with one the provided **Collection tubes.**
- Apply the clarified lysate with ethanol into the columns. **Centrifuge at 10.000 rpm for 1 minute.**
- Retain the liquid that has passed through the column and that is in the Collection tubes**, which contains the **small RNA species.**
- Add **700µl de etanol 100% to the lysate.** Mix well.
- Pass half of the lysate to a **Spin RNA Columns** with its **Collection tubes.** **Centrifuge at 10.000 rpm for 30 seconds.**
- Place the column in a new **Collection tube.** **Pass the other half and centrifuge at 10,000 rpm for 30 seconds.**
- Add **100µl of RNA Washing Solution 1.** Centrifuge at maximum speed for 1 minute.
- Add **700µl of RNA Washing Solution 2.** Centrifuge at maximum speed for 1 minute.
- Centrifuge for 3 minutes at maximum speed (11.000 rpm) to completely dry the membrane.

15. Colocar la columna en un microtubo nuevo de 1.5 ml (no suministrado con el kit) para eluir el MicroARN
16. Elución con **25-30µl Nuclease-Free Water** en el depósito de la columna Spin. Dispensar el tampón directamente sobre la membrana de sílice. Incubar a temperatura ambiente durante 2 minutos.
Es muy importante añadir el agua libre de nucleasas en el centro de la membrana para que se humedezca completamente.
17. **Centrifugar a 10.000 rpm velocidad durante 60 segundos.** Recoger los 25-30µl y volver a depositar en el centro de la membrana. Esto hace aumentar el rendimiento.
18. **Incubar 2 minutos y centrifugar a máxima velocidad.** Ahora el microtubo contiene los MicroRNAs. Utilizar o almacenar a -20°C o -80°C.

3.4 Protocolo para purificación de microARN a partir de células en cultivo (< 1 x 10⁷)

Células animales cultivadas adheridas en una placa

Eliminar el medio de cultivo y lavar las células con PBS. Aspirar el medio de cultivo celular y añadir una cantidad igual de PBS para lavar las células. Aspirar el PBS y añadir 0.10-0.30 % de tripsina en PBS e incubar durante un tiempo adecuado hasta que las células se separen de la superficie de la placa. Tras el desprendimiento de las células, 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 animales cultivadas en suspensión

Transferir las células en cultivo (hasta 1 x 10⁷) a un microtubo estéril de 1.5 ml. Recoger las células por centrifugación a 6000 rpm durante 1 minuto. Eliminar el sobrenadante y proceder con el punto 1.

1. Añadir **400 µl de RNA Lysis Solution**. Lisar las células utilizando la micropipeta arriba-abajo para disolver el pellet celular. Asegurarse que todo el pellet está disuelto antes de proceder con el siguiente paso.
2. Añadir **210µl etanol 100%** al lisado. Mezclar por vortex durante 10 segundos.
3. Ensamblar una **Columns RNA Large Removal** con un **Collection tubes** que se suministra.
4. Añadir el lisado + etanol a la columna. **Centrifugar durante 1 minuto a 10.000 rpm.**
5. **Retener el líquido que ha pasado a través de la columna y que se encuentra en el Collection tubes, el cual contiene las especies pequeñas de ARN.**
6. Añadir **700µl de etanol 100%** al lisado recogido en el punto 5. Mezclar bien.
7. Pasar la mitad del lisado a una **Spin RNA Columns** con su **Collection tubes**. **Centrifugar a 10.000 rpm durante 30 segundos.**
8. Colocar la columna en un nuevo **Collection tubes**. Pasar la otra mitad y centrifugar a 10.000 rpm durante 30 segundos.
9. Añadir **100µl Washing Solution 1**. Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.
10. Añadir **700µl Washing Solution 2**. Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.
11. **Centrifugar durante 3 minutos a máxima velocidad (11.000 rpm) para secar completamente la membrana.**
12. Colocar la columna en un microtubo nuevo de 1.5 ml (no suministrado con el kit) evitar centrifugar las **Spin RNA Columns**.

15. Place the column in a 1.5 ml (not supplied) Microtube.
16. **Add 25-30µl Nuclease-Free Water** into reservoir of Spin column. Dispense buffer directly onto the silica membrane. **Incubate at room temperature for 2 min.**
It is very important to add the elution buffer in the centre of the membrane to be completely wet.
17. **Centrifuge at 10.000 rpm for 60 seconds.** Collect 25-30µl and redeposit in the centre of the membrane. This increases yield.
18. **Incubate for 2 minutes and centrifuge at maximum speed.** The microtube now contains the MicroRNAs. Use or store at -20°C or -80°C.

3.4 Protocol for microARN purification from cultured cells (< 1 x 10⁷)

Adherent Cultured Animal Cells

Remove the culture medium and wash the cells with PBS. Aspirate cell-culture medium and add an equal amount of PBS in order to wash the cells. Aspirate PBS. Add 0.1-0.3% trypsin PBS and incubate for an appropriate time to detach the cells the dish surface. After cell detachment, add cell culture medium, transfer cells to an appropriate tube and pellet by centrifugation. Remove supernatant and continue with the point 1.

Suspension Cultured Animal Cells

Transfer cells (up to 1 x 10⁷) to a 1.5 ml microcentrifuge tube. Harvest cells by centrifugation (6000 rpm), remove the supernatant and continue with the point 1.

1. Add **400µl of RNA Lysis Solution**. Lyse the cells using up-down the micropipette to dissolve the cell pellet. Make sure that all pellets are dissolved before proceeding with the next step.
2. Add **210µl ethanol 100%** to the lysate. Mix by vortex for 10 seconds.
3. Assemble a **Columns RNA Large Removal** with one the provided **Collection tubes**.
4. Apply the clarified lysate with ethanol into the columns. **Centrifuge at 10.000 rpm for 1 minute.**
5. **Retain the liquid that has passed through the column and that is in the collection tube, which contains the small RNA species.**
6. Add **700µl de etanol 100%** to the lysate. Mix well.
7. Pass half of the lysate to a **Spin RNA Columns** with its **Collection tubes**. **Centrifuge at 10.000 rpm for 30 seconds.**
8. Place the column in a new **Collection tube**. **Pass the other half and centrifuge at 10,000 rpm for 30 seconds.**
9. Add **100µl of RNA Washing Solution 1**. Centrifuge at maximum speed for 1 minute.
10. Add **700µl of RNA Washing Solution 2**. Centrifuge at maximum speed for 1 minute.
11. **Centrifuge for 3 minutes at maximum speed (11.000 rpm) to completely dry the membrane.**
12. Place the column in a 1.5 ml (not supplied) microtube. To avoid **Spin RNA columns**.

13. Añadir **25-30µl Nuclease-Free Water** en el depósito de la columna Spin. Dispensar el tampón directamente sobre la membrana de sílice. Incubar a temperatura ambiente durante 2 minutos.
Es muy importante añadir el tampón de elución en el centro de la membrana para que se humedezca completamente.
14. **Centrifugar a 10.000 rpm velocidad durante 60 segundos.** Recoger los 25-30µl y volver a depositar en el centro de la membrana. Esto hace aumentar el rendimiento.
15. **Incubar 2 minutos y centrifugar a máxima velocidad.** Ahora el microtubo contiene los microRNAs. Utilizar o almacenar a -20°C o -80°C.

3.5 Protocolo de extracción de microARN a partir de bacterias cultivadas.

Nota: Se recomienda no utilizar más de 1×10^9 células /ml, el crecimiento bacteriano puede ser medido por un espectrofotómetro, como regla general, un cultivo de E.coli de 1×10^9 células /ml tiene una DO₆₀₀ de 1.0.

Preparar una cantidad apropiada de tampón TE conteniendo lisozima, esta solución se preparará con tampón TE libre de RNAsas y conservado en hielo hasta su uso. Para Gram-negativos la concentración de lisozima será de 1 mg/ml y Gram-positivos la concentración de lisozima será de 3 mg/ml.

1. Pellet las células por centrifugación a (**aprox. 14.000 rpm durante 1 minuto.**)
2. Eliminar el sobrenadante y eliminar cuidadosamente cualquier resto de medio por aspiración. Resuspender utilizando la micropipeta adecuada el pellet en **100µl del TE con la cantidad apropiada de lisozima.** Incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
3. Añadir **300µl de RNA Lysis Solution.** Lisar las células mediante vortex durante 15 segundos.
4. Añadir **210µl etanol 100%** al lisado. Mezclar por vortex durante 10 segundos. Asegurese de que todo el pellet esta completamente disuelto antes de proceder al siguiente paso.
5. Ensamblar una **Columns RNA Large Removal** con un **collection tubes** que se suministra.
6. Añadir el lisado + etanol a la columna. **Centrifugar durante 1 minuto a 10.00 rpm.**
7. **Retener el líquido que ha pasado a través de la columna y que se encuentra en el collection tubes** el cual contiene las **especies pequeñas de ARN.**
8. Añadir **700 µl de etanol 100%** al lisado recogido en el punto 7. Mezclar bien.
9. Pasar la mitad del lisado a una **Spin RNA Columns** con su **collection tubes.** **Centrifugar a 10.000 rpm durante 30 segundos.**
10. Colocar la columna en un nuevo **collection tubes.** **Pasar la otra mitad y centrifugar a 10.000 rpm durante 30 segundos.**
11. Añadir **100µl Washing Solution 1.** Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.
12. Añadir **700µl Washing Solution 2.** Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.

13. **Add 25-30µl Nuclease-Free Water** into reservoir of Spin column. Dispense buffer directly onto the silica membrane. **Incubate at room temperature for 2 min.**
It is very important to add the elution buffer in the centre of the membrane to be completely wet.
14. **Centrifuge at 10.000 rpm for 60 seconds.** Collect 25-30µl and redeposit in the centre of the membrane. This increases yield.
15. **Incubate 2 minutes and centrifuge at maximum speed for 1 minute** The microtube now contains the microRNAs. Use or store at -20°C or -80°C.

3.5 Protocol for microARN purification from bacteria cultures.

Note: It is recommended that no more than 1×10^9 bacteria cells/ml be used. Bacterial growth can be measured using a spectrophotometer, as a general rule, an E.coli culture containing 1×10^9 bacteria cells has an OD₆₀₀ of 1.0.

Prepare the appropriate lysozyme-containing TE buffer, this solution should be prepared with sterile, Rnase free TE buffer, and kept on ice until needed. For Gram-negative the concentration of lysozyme will be of 1 mg/ml and for Gram-positive the concentration of lysozyme will be of 3 mg/ml.

1. Pellet bacteria by centrifugation at (**aprox. 14.000 rpm for 1 minute.**)
2. Decant supernatant, and carefully remove any remaining media by aspiration. Resuspended the bacteria in **100µl of appropriate lysozyme-containing TE by vortexing.** **Incubate at room temperature for 10 minutes.**
3. Add **300µl of RNA Lysis Solution.** Lyse cells by vortex for 15 seconds.
4. Add **210µl of ethanol 100%** to lysate. Mix by vortex for 10 seconds. Ensure that the entire pellet is completely dissolved before proceeding to the next step.
5. Assemble a **Columns RNA Large Removal** with one the provided **collection tubes.**
6. Apply the clarified lysate with ethanol into the columns. **Centrifuge at 10.000 rpm for 1 minute.**
7. **Retain the liquid that has passed through the column and that is in the collection tubes, which contains the small RNA species.**
8. Add **700µl de ethanol 100% to the lysate.** Mix well.
9. Pass half of the lysate to a **Spin RNA Columns** with its **collection tubes.** **Centrifuge at 10.000 rpm for 30 seconds.**
10. Place the column in a new **collection tube.** **Pass the other half and centrifuge at 10,000 rpm for 30 seconds.**
11. Add **100µl of RNA Washing Solution 1.** Centrifuge at maximum speed for 1 minute.
12. Add **700µl of RNA Washing Solution 2.** Centrifuge at maximum speed for 1 minute.

13. **Centrifugar 3 minutos a máxima velocidad (11.000)** para secar completamente la membrana. Colocar la columna en un microtubo nuevo de 1.5 ml (no suministrado con el kit) para eluir el **Spin RNA Columns**.
14. Retire el **Collection tube** e inserte las **Spin RNA Columns** en un microtubo de 1,5ml.
15. Añadir **25-30µl Nuclease-free water en la Spin RNA columns**. Dispensar el tampón directamente sobre la membrana de sílice. Incubar a temperatura ambiente durante 2 minutos.

Es muy importante añadir el **Nuclease-free water** en el centro de la membrana para que se humedezca completamente.
16. **Centrifugar a 10.000 rpm velocidad durante 60 segundos**. Recoger los 25-30µl y volver a depositar en el centro de la membrana. Esto hace aumentar el rendimiento.
17. **Incubar 2 minutos y centrifugar a máxima velocidad.**

3.6 Protocolo de extracción de microARN a partir de cultivos de levaduras

Nota: Se recomienda no utilizar más de 10^7 células de levadura o 1ml de cultivo.

Preparar una cantidad apropiada de Tampón de Resuspensión que contenga líticas: 50mM tris, pH 7.5, 10 mM EDTA, 1M Sorbitol, 0.10 % β-mercaptoetanol y 1 unidad /µl de lítica. Esta solución debería prepararse con reactivos estériles y libres de RNAsas y mantenida en hielo hasta ser utilizada.

1. Pellet las levaduras por centrifugación (**aprox. 14.000 rpm) durante 1 minuto**.
2. Eliminar el sobrenadante y eliminar cuidadosamente cualquier resto de medio por aspiración. Resuspender utilizando la micropipeta adecuada el pellet en **100µl del Tampón de Resuspensión con la cantidad apropiada de líticas**. Incubar a 37°C durante 10 minutos.
3. Añadir **300µl de RNA Lysis Solution** y vortex durante 15 segundos.
4. Añadir **210µl etanol 100%** al lisado. Mezclar por vortex durante 10 segundos. Asegúrese de que todo el pellet esta completamente disuelto antes de proceder al siguiente paso.
5. Ensamblar una **Columns RNA Large Removal** con un **Collection tube** que se suministra.
6. Añadir el lisado + etanol a la columna. **Centrifugar durante 1 minuto a 10.000 rpm**.
7. **Retener el líquido que ha pasado a través de la columna y que se encuentra en el Collection tube**, el cual contiene **las especies pequeñas de ARN**.
8. Añadir **700µl de etanol 100%** al lisado recogido en el punto 7. Mezclar bien.
9. Pasar la mitad del lisado a una **Spin RNA Columns** con su **Collection tube**. Centrifugar a 10.000 rpm durante 30 segundos.
10. Colocar la columna en un nuevo **Collection tube**. **Pasar la otra mitad y centrifugar a 10.000 rpm durante 30 segundos**.
11. Añadir **100µl Washing Solution 1**. Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.
12. Añadir **700µl Washing Solution 2**. Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.

13. Centrifuge for **3 minutes at maximum speed (11.000 rpm)** to completely dry the membrane. Place the column in a 1.5 ml (not supplied) microtube.
14. Remove the collection tube and insert the **Spin RNA Columns** in a 1.5 ml microtube.
15. Add **25-30µl Nuclease-free water** into reservoir of Spin column. Dispense buffer directly onto the silica membrane. **Incubate at room temperature for 2 min**.
It is very important to add the **Nuclease-free water** in the centre of the membrane to be completely wet.
16. **Centrifuge at 10.000 rpm for 60 seconds**. Collect 25-30µl and redeposit in the centre of the membrane. This increases yield.
17. **Incubate 2 minutes and centrifuge at maximum speed for 1 minute**.

3.6 Protocol for microARN purification from yeast cultures

Note: It is recommended to use no more than 107 yeast cells or 1ml of culture.

Prepare the appropriate amount of lyticase resuspension buffer have the following composition: 50mM Tris, pH 7.5, 10 mM EDTA, 1M Sorbitol, 0.10 % μ-mercaptoethanol and 1 unit /µl of lyticase. This solution should be prepared with sterile, RNase free reagents, and kept on ice until needed.

1. Pellet yeast for centrifugation (**aprox. 14.000 rpm) for 1 minute**.
2. Decant supernatant, and carefully remove any remaining media by aspiration. Resuspended the yeast in **100 µl of Lyticase resuspension buffer by vortexing**. Incubate at 37°C for 10 minutes.
3. Add **300µl of RNA Lysis Solution**. Lyse cells by vortex for 15 seconds.
4. Add **210µl of ethanol 100%** to lysate. Mix by vortex for 10 seconds. Ensure that the entire pellet is completely dissolved before proceeding to the next step.
5. Assemble a **Columns RNA Large Removal** with one the provided **Collection tube**.
6. Apply the clarified lysate with ethanol into the columns. **Centrifuge at 10.000 rpm for 1 minute**.
7. **Retain the liquid that has passed through the column and that is in the Collection tube**, which contains the **small RNA species**.
8. Add **700 µl de ethanol 100%** to the lysate. Mix well.
9. Pass half of the lysate to a **Spin RNA Columns** with its **Collection tube**. **Centrifuge at 10.000 rpm for 30 seconds**.
10. Place the column in a new **Collection tube**. **Pass the other half and centrifuge at 10,000 rpm for 30 seconds**.
11. Add **100µl of RNA Washing Solution 1**. Centrifuge at maximum speed for 1 minute.
12. Add **700µl of RNA Washing Solution 2**. Centrifuge at maximum speed for 1 minute.

13. **Centrifugar 3 minutos a máxima velocidad (11.000 rpm)** para secar completamente la membrana. Colocar la columna en un microtubo de 1,5 ml (no suministrado).
14. Retire el **Collection tube** e inserte la **Spin RNA Columns** en un microtubo de 1,5ml. Añadir 25-30µl **Nuclease-free wáter** en el depósito de las **Spin RNA Columns**. Dispensar el tampón directamente sobre la membrana de sílice. Incubar a temperatura ambiente durante 2 minutos.
15. Es muy importante añadir el **Nuclease-free water** en el centro de la membrana para que se humedezca completamente.
16. **Centrifugar a 10.000 rpm velocidad durante 60 segundos.** Recoger los 25-30µl y volver a depositar en el centro de la membrana. Esto hace aumentar el rendimiento.
17. **Incubar 2 minutos y centrifugar a máxima velocidad.**

3.7 Protocolo de extracción de microARN a partir de tejidos vegetales.

Nota: Se recomienda no utilizar más de 30 mg de tejido o 5 x 10⁶ células vegetales.

Para este protocolo pueden utilizarse tanto tejidos frescos como congelados. Los tejidos deberían congelarse en nitrógeno líquido y transferidos inmediatamente a -70°C para su almacenamiento a largo plazo. Cuando aislamos MicroARN de tejidos congelados asegúrese que no desciende mucho su temperatura durante el pesaje y la pulverización con una mano de mortero para asegurarse que la integridad del MicroARN no se compromete.

1. Colocar el tejido en un mortero que contenga una cantidad apropiada de nitrógeno líquido para cubrir la muestra. Pulverizar el tejido utilizando una mano de mortero. Permitir que el nitrógeno líquido se evapore.
2. Pasar la muestra a un microtubo libre de RNAsas (no suministrado) y Añadir **400 µl de RNA 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 5 minutos a temperatura ambiente.**
3. **Centrifugar 3 minutos a máxima velocidad.**
4. Pasar el sobrenadante a un microtubo libre RNAsas nuevo (no suministrado).

IMPORTANTE: *Anotar la cantidad de sobrenadante/lisado.*

5. Añadir **etanol 100%** siguiendo esta regla, 5µl de etanol 100% es añadido por cada 100µl de sobrenadante/lisado. Mezclar por vortex durante 10 segundos.
6. Ensamblar una **Columns RNA Large Removal** con un **Spin RNA Columns** que se suministra.
7. Añadir el lisado + etanol a la columna. **Centrifugar durante 1 minuto a 10.000 rpm.**
8. **Retener el líquido que ha pasado a través de la columna y que se encuentra en el Spin RNA Columns**, el cual contiene **las especies pequeñas de ARN.**
9. Añadir **700µl de etanol 100%** al lisado recogido en el punto 8. Mezclar bien.
10. Pasar la mitad del lisado a una **Spin RNA Columns** con su **Spin RNA Columns**. **Centrifugar a 10.000 rpm durante 30 segundos.**
11. Colocar la columna en un nuevo **Spin RNA Columns**. **Pasar la otra mitad y centrifugar a 10.000 rpm durante 30 segundos.**
12. Añadir **100µl Washing Solution 1**. Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.

13. Centrifuge for **3 minutes at maximum speed (11.000 rpm)** to completely dry the membrane. Place the column in a 1.5 ml (not supplied) microtube.
14. Remove the **Collection tube** and insert the **Spin RNA Columns** in a 1.5 ml microtube. Add **25-30µl Nuclease-free water** into reservoir of **Spin RNA Columns**. Dispense buffer directly onto the silica membrane. **Incubate at room temperature for 2 min.**
15. It is very important to add the **Nuclease-free water** in the centre of the membrane to be completely wet.
16. **Centrifuge at 10.000 rpm for 60 seconds.** Collect 25-30µl and redeposit in the centre of the membrane. This increases yield.
17. **Incubate 2 minutes and centrifuge at maximum speed for 1 minute.**

3.7 Protocol for microARN extraction from plant tissues.

Note: The maximum recommended input of plant tissue is 30 mg o 5 x 10⁶ plant cells.

Both fresh and frozen plant samples can be used for this protocol. Samples should be flash frozen in liquid nitrogen and transfer immediately to a -70°C freezer for long-term storage. When isolating MicroRNA from frozen tissues ensure that the temperature does not drop too low during weighing and spraying with a pestle and mortar to ensure that the integrity of the MicroRNA is not compromised.

1. Transfer the tissue into a mortar that contains an appropriate amount of liquid nitrogen to cover the sample. Grind the tissue thoroughly using a pestle. Allow the liquid nitrogen to evaporate, without allowing the tissue to thaw.
 2. Transfer the sample to an RNase-free tube (not provided) and add **400µl de RNA Lysis Solution**. Homogenize by passing the lysate 5-10 times through a 20-G (0.90 mm) gauge needle attached to a syringe or an electrical homogenizer. **Incubate at room temperature for 5 minutes.**
 3. **Centrifuge for 3 minutes a maximum speed.**
 4. Transfer de supernatant to another RNase-free microcentrifuge tube (not provided).
- IMPORTANT:** *Note the volume of the supernatant/lysate.*
5. Add a volume of **100% ethanol** that is equivalent to (55 µl of 100 % ethanol is added to every 100µl of supernatant/lysate). Mix by vortex for 10 seconds.
 6. Assemble a **Columns RNA Large Removal** with one the provided **Spin RNA Columns**.
 7. Apply the clarified lysate with ethanol into the columns. **Centrifuge at 10.000 rpm for 1 minute.**
 8. **Retain the liquid that has passed through the column and that is in the Spin RNA Columns**, which contains the small RNA species.
 9. Add **700µl de ethanol 100% to the lysate**. Mix well.
 10. Pass half of the lysate to a **Spin RNA Columns** with its **Spin RNA Columns**. **Centrifuge at 10.000 rpm for 30 seconds.**
 11. Place the column in a new **Spin RNA Columns**. **Pass the other half and centrifuge at 10,000 rpm for 30 seconds.**
 12. Add **100µl of RNA Washing Solution 1**. Centrifuge at maximum speed for 1 minute.

13. Añadir **700µl Washing Solution 2**. Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.
14. **Centrifugar 3 minutos a máxima velocidad (11.000 rpm)** para secar completamente la membrana.
15. Colocar la columna en un microtubo nuevo de 1.5 ml (no suministrado con el kit)
16. Retire las **Spin RNA Columns** e introdúzcalas en un microtubo de 1,5 ml. 17. Añada **25-30µl de Nuclease-free water** en el depósito de la columna Spin. Dispensar tampón directamente sobre la membrana de sílice. Incubar a temperatura ambiente durante 2 min.
Es muy importante añadir el tampón de elución en el centro de la membrana para que quede completamente mojada. para eluir el **Spin RNA Columns**.
17. **Centrifugar a 10.000 rpm velocidad durante 60 segundos**. Recoger los 25-30µl y volver a depositar en el centro de la membrana. Esto hace aumentar el rendimiento.
18. **Incubar 2 minutos y centrifugar a máxima velocidad**.

13. Add **700µl of RNA Washing Solution 2**. Centrifuge at maximum speed for 1 minute.
14. **Centrifuge for 3 minutes at maximum speed (11.000 rpm)** to completely dry the membrane.
15. Place the column in a 1.5 ml (not supplied) microtube.
16. Remove the **Spin RNA Columns** and insert the **Spin RNA Columns** in a 1.5 ml microtube. Add **25-30µl Nuclease-free water** into reservoir of Spin column. Dispense buffer directly onto the silica membrane. Incubate at room temperature for 2 min.
It is very important to add the elution buffer in the centre of the membrane to be completely wet.
17. **Centrifuge at 10.000 rpm for 60 seconds**. Collect 25-30µl and redeposit in the centre of the membrane. This increases yield.
18. **Incubate 2 minutes and centrifuge at maximum speed** for 1 minute

4. ALMACENAMIENTO, ESTABILIDAD Y PRECAUCIONES

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

STORAGE, STABILITY AND PRECAUTION

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 compounds when combined with bleach.
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.

For any further questions or doubts about the protocol, please contact DURVIZ s.l. technical service at 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>		Irritante, sensibilizante y nocivo / <i>Irritant, sensitizing and harmful</i>
	Lote / <i>Lot</i>		Corrosivo / <i>Corrosive</i>
	Contiene suficiente para n pruebas / <i>Contains enough for n tests</i>		

B65699985