

ARN-PrepZOL 100 ml Highway (R0010)

PRECAUCIÓN: Este reactivo es tóxico en contacto con la piel. En caso de exposición lavar inmediatamente con agua y detergente.

USO PARA INVESTIGACIÓN *IN VITRO*

El ARN-PrepZOL se emplea para la extracción de ARN total de células y tejidos, se encuentra listo para usar. El ARN resultante se encuentra libre de ADN y proteínas. El mismo puede ser empleado en análisis de Real Time PCR, Northern Blot, hibridización de Dot Blot, selección de poly (A)+, clonado molecular, ensayo de protección de RNasa y traducción *in vitro*.

Durante la homogeneización de la muestra o la lisis, el ARN-PrepZOL mantiene la integridad del ARN. La adición de cloroformo luego de la centrifugación, separa la solución en una fase acuosa y otra fase orgánica. El ARN permanece exclusivamente en la fase acuosa y es recuperado mediante precipitación con isopropanol. Luego de remover la fase acuosa, el ADN y las proteínas de la muestra pueden ser recuperados mediante precipitaciones secuenciales. La precipitación con etanol, permite extraer ADN de la interfase y una precipitación adicional con isopropanol permite obtener las proteínas de la fase orgánica.

Empleando el ARN-PrepZOL, se puede partir tanto de una pequeña cantidad de tejido (50-100mg) o células (5×10^6) como de una mayor cantidad (tejidos \geq a 1 g y células \geq a 10^7) tanto de origen humano, animal, plantas o bacterias.

Mediante este método se pueden procesar varias muestras en paralelo y todo el proceso no demanda más de 1 hora.

PROTOCOLO

Reactivos necesarios, no provistos:

- Cloroformo
- Isopropanol
- Etanol 75% (en agua libre de RNasa)
- Agua libre de RNasa o solución SDS al 0,5% (con agua libre de RNasa)

Cantidad de ARN-PrepZOL recomendada, dependiendo de la muestra:

10 ⁷ de células en suspensión	1-2 ml
10 cm ² células adherentes	1 ml
100 µl de leucocitos	2 ml
50-100 mg de tejido (hígado, bazo, cartílago, hueso)	2ml
50-100 mg de otros tejidos	1 ml
15-100 mg planta	1ml

HOMOGENEIZACIÓN

Tejidos

Tejidos de origen animal o vegetal (frescos o conservados a 70°C hasta su uso) pueden ser procesados tanto por congelamiento con nitrógeno líquido como por desintegración con un mortero. Homogeneizar el tejido con 1 ml de ARN-PrepZOL cada 50-100 mg de tejido y la ayuda de un homogeneizador.

Células adherentes

Lisar las células directamente en una placa de cultivo de 3,5 cm de diámetro agregando 1 ml de ARN-PrepZOL y pasar el lisado varias veces a través de la pipeta (1ml de ARN-PrepZOL por cada 10 cm² de área de placa de cultivo). Una cantidad insuficiente de ARN-PrepZOL resultará en contaminación del ARN con ADN.

Suspensión de células

Centrifugar las células y agregar ARN-PrepZOL pipeteando varias veces la solución. Emplear 1 ml de reactivo cada 5-10 x 10⁶ células de levadura, planta o animal o cada 1x10⁷ bacterias. El lavado de las células antes del agregado del ARN-PrepZOL no se aconseja, ya que puede provocar la degradación del ARNm. La lisis de algunas levaduras y bacterias puede requerir el uso de un homogeneizador.

NOTA: se recomienda realizar un paso adicional en muestras con alto contenido de proteínas, grasas, polisacáridos o material extracelular. Luego de la homogeneización remover el material insoluble mediante centrifugación a 12.000g por 10 min a 4°C. Continuar trabajando con el sobrenadante que

contiene el ARN. En muestras con alto contenido de tejido graso, remover la capa superior que contienen las grasas. Transferir la solución homogeneizada a un nuevo tubo.

SEPARACIÓN DE FASES

-Incubar las muestras homogeneizadas por 5 min a temperatura ambiente para permitir la completa disociación de los complejos nucleo-proteína.

-Agregar 0,2 ml de cloroformo por ml de ARN-PrepZOL y agitar el tubo vigorosamente durante algunos segundos. Incubar a temperatura ambiente durante 3 min.

-Centrifugar la muestra a 12.000g durante 10 min a 4°C. Luego de la centrifugación quedará una fase amarillenta fenol-cloroformo en el fondo, una interfase y una fase superior acuosa incolora. El ARN se encuentra exclusivamente en la fase acuosa.

PRECIPITACIÓN DEL ARN

-Transferir la fase acuosa incolora a un nuevo tubo. Importante: Evitar transferir parte de la interfase.

NOTA: Conservar la fase orgánica si se quiere extraer ADN y proteínas.

-Agregar 0,5 ml de isopropanol a la fase acosa, por ml de ARN-PrepZOL empleado en la homogeneización. Mezclar invirtiendo el tubo varias veces e incubar a temperatura ambiente por 10 min.

-Centrifugar a 12.000g a 4°C por 10 min.

El RNA total precipitado formará un pellet transparente en el fondo del tubo. Descartar el sobrenadante suavemente con micropipeta.

LAVADO DEL ARN

-Agregar al precipitado 1 ml de etanol 75%. Mezclar invirtiendo el tubo varias veces. Centrifugar a 12.000g durante 2 minutos a 4°C.

-Descartar el etanol y repetir el paso anterior.

REDISOLUCIÓN DEL ARN

-Dejar secar el precipitado de ARN a temperatura ambiente durante 5-10 minutos. Es importante que el precipitado no este completamente seco, ya que esto dificultará su solubilidad.

-Resuspender el precipitado en 20-40 µl de agua libre de RNAsa o solución SDS 0,5% (no emplear en caso de que el ARN se utilice luego en reacciones enzimáticas). Mezclar con pipeta hasta observar que el pellet se encuentra completamente disuelto.

- Incubar 10 min a 55-60°C. Conservar a -70°C.

Rendimiento de ARN

Diluir la muestra en agua libre de RNAsa y medir la Absorbancia a 260 nm y 280 nm.

-Calcular la concentración de ARN según la siguiente fórmula:

$$A_{260} \times \text{dilución} \times 40 = \mu\text{g ARN/ ml}$$

-Calcular la relación A_{260}/A_{280} . Si es cercano a 2 es considerado un ARN puro.