

**PROTOCOLO NORMALIZADO DE TRABAJO 2.1**  
**EXTRACCIÓN DE RNA CON SISTEMA PAXGENE TUBES MANUAL**

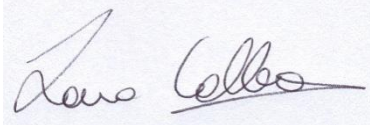
**CONTROL DE CAMBIOS**

<i>REVISIÓN</i> Nº	<i>FECHA</i>	<i>DESCRIPCIÓN DE LAS MODIFICACIONES</i>	<i>APARTADOS MODIFICADOS</i>
01	2007	Edición inicial	
02	14-06-2011	Normalización del texto adaptando a las condiciones actuales y cambio de ubicación a lo que se debe hacer antes de empezar, agregado de Anexo 1.	3
03	26-03-2019	Modificación NanoDROP	3

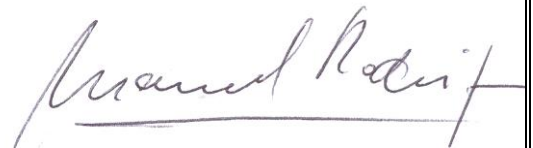
 MODIFICADO POR:  
 LOURDES BOHORQUEZ



 REVISADO POR:  
 LAURA CALLEROS



 APROBADO POR:  
 MANUEL RODRIGUEZ PUYOL



**EXTRACCIÓN DE RNA CON EL SISTEMA PAXgene BLOOD RNA TUBES: MANUAL****1. MUESTRAS:**

Partimos de 2.5 ml de sangre periférica extraída en tubos "PAXgene Blood RNA Tubes".

**2. MATERIALES:**

- **Kit PAXgene Blood RNA Kit (50)**

**Contenido:**

- . BR1 Tampón de resuspensión 20 ml
- . BR2 Tampón de unión 18 ml
- . BR3 Tampón de lavado 1, 45 ml
- . BR4 Tampón de lavado 2, 11 ml (concentrado)
- . BR5 Tampón de elución 5 ml
- . RNFW Agua libre de RNAsa 2 x (frasco) 125 ml
- . PK Proteinasa K 2 x (tapa verde) 1,4 ml
- . PRC Columnas PAXgene de centrifugación de ARN (rojas) 5 x 10
- . PT Tubos de procesado 6 x 50 (2 ml)
- . Hemogard Cierres Hemogard secundarios de RB 50
- . MCT Tubos de microcentrífuga 3 x 50, (1,5 ml) 1 x 10
- . RNFD DNAsa I, libre de RNAsa 1500 (liofilizada)
- . RDD Tampón de digestión 2 x 2 ml de ADN (tapa blanca)
- . DRB Resuspensión de DNAsa 2 ml Tampón (tubo, tapa roja)
- . PSC 5 x 10 Columnas PAXgene de disrupción por centrifugación (lila)

**3. PROCEDIMIENTO:****- Antes de empezar:**

- Para garantizar una hemólisis completa después de extraer la sangre, deje los PAXgene Blood RNA Tubes (**BRT**) incubándose en la mesa a temperatura ambiente durante al menos 2 horas. Si el tubo se deja incubando durante toda la noche puede que aumente el rendimiento. Si después de extraer la sangre el tubo ha estado guardado a 2–8 °C (o entre –20 y –70 °C), espere a que alcance la temperatura ambiente, y manténgalo a esa temperatura durante 2 horas antes de comenzar el procedimiento.
- El tampón de unión (**BR2**) puede precipitar durante el almacenamiento. Si es necesario, caliéntelo hasta 37 °C para disolverlo.

- El tampón de lavado 2 (**BR4**) se suministra concentrado. Antes de usarlo por primera vez, añada 4 volúmenes de etanol (96 %–100 %, pureza de calidad p.a.) según se indica en el frasco para obtener la solución de trabajo.

- Si es la primera vez que usa el kit de **DNAsa** libre de RNAsa, prepare la solución madre de DNAsa I. Disuelva la DNAsa I sólida (RNFD; 1500 unidades Kunitz) en 550 µl del tampón de resuspensión de DNAsa (DRB) que se incluye en el kit. No desperdicie DNAsa I (RNFD) al abrir el vial. No agite la DNAsa I (RNFD) reconstituida en el vortex. La DNAsa I es especialmente sensible a la desnaturalización física. Debe mezclarse únicamente invirtiendo el tubo con suavidad.

*Nota 1: El fabricante indica que la **DNAsa I** (RNFD) reconstituida se puede almacenar a 2–8 °C hasta 6 semanas. Para almacenar DNAsa I (RNFD) a largo plazo, extraiga la solución madre del vial de vidrio, divídala en alícuotas para cada uso (use los tubos de microcentrífuga de 1,5 ml [MCT] que se incluyen en el kit; hay suficiente para 5 alícuotas) y quédela a –20 °C hasta 6 meses. Las alícuotas descongeladas se pueden almacenar a 2–8 °C hasta 6 semanas. No vuelva a congelar las alícuotas una vez descongeladas.*

**1.** Una vez que los tubos PAXgene estén atemperados, Centrifugar el PAXgene Blood RNA Tube durante 10 minutos a 3000–5000 xg con un rotor oscilante.

*Nota 2: El rotor debe estar provisto de adaptadores para tubos de fondo redondo. Si se usa otro tipo de adaptador, los tubos se pueden romper durante la centrifugación.*

**2.** Retirar el sobrenadante por decantación o pipeteando. Añada 4 ml de H<sub>2</sub>O libre de RNAsa (DEPC) al pellet y cerrar el tubo usando un cierre secundario Hemogard nuevo. Si se decanta el sobrenadante, hay que procurar no deshacer el pellet, y secar el borde del tubo con una servilleta de papel limpia.

**3.** Agitar el tubo en el vortex hasta que el pellet se disuelva, centrifugar durante 10 minutos a 3000–5000xg con un rotor oscilante. Aspirar y desechar todo el sobrenadante.

*- Los pequeños restos que quedan en el sobrenadante después de pasar por el vortex pero antes de centrifugar, no afectarán al procedimiento.*

*Si queda algo de sobrenadante, inhibirá la lisis y diluirá el lisado, por lo que se verán afectadas las condiciones de unión del ARN a la membrana PAXgene.*

**4.** Añadir 350 µl de tampón de resuspensión (BR1) y agitar en el vortex hasta que el pellet esté claramente disuelto.

**5.** Pipetear la muestra en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml (MCT). Añadir 300µl de tampón de unión (BR2) y 40 µl de proteinasa K (PK). Agitar en el vortex durante 5 segundos para mezclar, e incubar durante 10 minutos a 55 °C en el bloque

térmico con agitador a 400–1400 r.p.m. Después de incubar, ajustar la temperatura del bloque térmico a 65 °C (para el paso 20).

- *No combine el tampón de unión (BR2) y la proteinasa K (PK) antes de añadirlos a la muestra.*

**6.** Pipetear el lisado directamente en una columna PAXgene de disrupción por centrifugación (PSC; lila) introducir en un tubo de procesado (PT) de 2 ml y centrifugar durante 3 minutos a velocidad máxima (sin superar 20.000 xg).

- *Pipetear con cuidado el lisado en la columna de centrifugación (PSC) y comprobar visualmente que se ha transferido todo el lisado a la columna (PSC). Para no dañar las columnas (PSC) y los tubos (PT), no superar 20.000 xg.*

**7.** Transferir cuidadosamente todo el sobrenadante de la fracción eluída a un tubo de microcentrífuga (MCT) de 1,5 ml nuevo, procurando no deshacer el pellet del tubo de procesado.

**8.** Añadir 350 µl de etanol (96–100 %, pureza de calidad p.a.). Mezclar en el vortex y centrifugar brevemente (1–2 segundos a 500–1000 xg) para eliminar las gotas del interior de la tapa del tubo.

- *La centrifugación no debe durar más de 1–2 segundos, ya que podría formar un pellet de ácidos nucleicos que reduciría el rendimiento del ARN total.*

**9.** Pipetear 700 µl de muestra en la columna PAXgene de centrifugación de ARN (PRC; roja) introducida en un tubo de procesado de 2 ml (PT) y centrifugar durante 1 minuto a 8000–20.000 xg. Introducir la columna de centrifugación (PRC) en un tubo de procesado nuevo de 2 ml (PT) y desechar el tubo de procesado previo (PT) con el eluído.

**10.** Pipetear el resto de la muestra en una columna PAXgene de centrifugación de ARN (PRC) y centrifugar durante 1 minuto a 8000–20.000 x g. Introducir la columna de centrifugación (PRC) en un tubo de procesado nuevo de 2 ml (PT) y desechar el tubo de procesado previo (PT) con el eluído.

- *Pipetear despacio la muestra en la columna de centrifugación (PRC) y comprobar visualmente que se ha transferido toda la muestra a la columna (PRC).*

**11.** Pipetear 350 µl del tampón de lavado 1 (BR3) en la columna PAXgene de centrifugación de ARN (PRC). Centrifugar durante 1 minuto a 8000-20.000 x g

Introducir la columna de centrifugación (PRC) en un tubo de procesado (PT) de 2ml nuevo y deseche el tubo de procesado (PT) previo con el eluído.

**12.** Añadir 10 µl de la solución madre de DNasa I (RNFD) a 70 µl de tampón de digestión de ADN (RDD) en un tubo de microcentrífuga (MCT) de 1,5 ml. Mezclar por inversión y centrifugar brevemente para recoger el líquido residual de las paredes del tubo.

**13.** Pipetear la mezcla de incubación de DNAsa I (RNFD, 80 µl) directamente en la membrana de la columna PAXgene de centrifugación de ARN (PRC) y déjala en la mesa (20–30 °C) durante 15 minutos.

*- Asegúrese de poner la mezcla de incubación de DNAsa I (RNFD) directamente sobre la membrana. La digestión de la DNAsa será incompleta si parte de la muestra se aplica en las paredes o en la junta de la columna de centrifugación (PRC) y se queda en esa posición.*

**14.** Pipetear 350 µl de tampón de lavado 1 (BR3) en la columna PAXgene de centrifugación de ARN (PRC) y centrifúguela durante 1 minuto a 8000–20.000xg.

Introducir la columna de centrifugación (PRC) en un tubo de procesado (PT) de 2ml nuevo y desechar el tubo de procesado (PT) previo con el eluido.

**15.** Pipetear 500 µl de tampón de lavado 2 (BR4) en una columna PAXgene de centrifugación de ARN (PRC) y centrifugar durante 1 minuto a 8000–20.000 xg. Introducir la columna de centrifugación (PRC) en un tubo de procesado (PT) de 2 ml nuevo y desechar el tubo de procesado (PT) previo con el eluido.

*- El tampón de lavado 2 (BR4) se suministra concentrado. Asegúrese de añadir etanol al tampón de lavado 2 (BR4) antes de usarlo.*

**16.** Añadir otros 500 µl de tampón de lavado 2 (BR4) en la columna PAXgene de centrifugación de ARN (PRC). Centrifugar durante 3 minutos a 8000-20.000 xg

**17.** Desechar el tubo de procesado (PT) con el eluido e introducir la columna PAXgene de centrifugación de ARN (PRC) en un tubo de procesado (PT) nuevo. Centrifugar durante 1 minuto a 8000-20.000 x g.

**18.** Desechar el tubo de procesado (PT) que contiene el eluido. Introducir la columna PAXgene de centrifugación de ARN (PRC) en un tubo de microcentrífuga (MCT) de 1,5 ml y pipetear 40 µl de tampón de elución (BR5) directamente en la membrana de la columna PAXgene de centrifugación de ARN (PRC). Centrifugar durante 1 minuto a 8000-20.000 x g para eluir el ARN.

*- Es importante humedecer toda la membrana con tampón de elución (BR5) para conseguir la máxima eficacia de elución.*

**19.** Repetir el paso de elución (paso 18) según se describe, usando 40 µl de tampón de elución (BR5) y el mismo tubo de microcentrífuga (MCT).

**20.** Incubar el eluato durante 5 minutos a 65 °C en el bloque térmico con agitador (desde el paso 5) pero sin agitarlo. Después de incubar, ponerlo inmediatamente en hielo.

*- Esta incubación a 65 °C desnaturaliza el ARN para aplicaciones posteriores. No exceda el tiempo o la temperatura de incubación.*

**21.** Si las muestras de ARN no van a utilizarse inmediatamente, guardarlas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Como el ARN se mantiene desnaturalizado después de congelar y descongelar varias veces, no es necesario repetir la incubación a  $65^{\circ}\text{C}$ .

**22.** Cuantificar Las muestras en el Espectrofotómetro con el "**PNT 10 – NanoDROP**" que lleva por nombre "Cuantificación Ácidos Nucleicos con el Nanophotometer P-Class". Guardar el reporte del NanoDROP de manera digital en el Dropbox\Biobanco-1\Cuantificaciones.

Pureza de RNA Ratios 260/280 entre 1,9 y 2,1

Integridad del RNA doble banda en gel de agarosa correspondiente a 28s (5kb) y 18s (1,9kb).

**23.** Pasar los datos de la concentración y el Ratio al Biogest.

Referencias:

- *PAXgene blood RNA kit Handbook, version 2, abril 2008, PreAnalytik a Qiagen/BD Company.*

**Anexo 1:**

**Protocolo Manual Paxgene esquematizado:**

