

Protocolo estandarizado para la extracción de RNA con el Kit *mirVana* Isolation (Cat. AM1560). Utilizando la centrífuga Heal Force Neofuge 13R

Nota: Asegurarse de colocar la centrífuga a 4°C, mantener el PBS 1X en hielo, el etanol absoluto a temperatura ambiente y descongelar las muestras antes de comenzar este protocolo.

1. A partir de alícuotas de leche materna (~1 ml) homogenizadas, centrifugar a máxima velocidad (13 800 rpm), durante 5 min a 4°C, para fraccionar la leche en tres fases, en caso de que no se formen adecuadamente la 3 fases, centrifugar de nuevo.
2. Utilizando puntas con filtro de 100µL y la micropipeta correspondiente, descartar la fase acuosa(fracción intermedia), introduciendo la punta de tal manera que la fracción lipídica (fracción superior) se desplace hacia un lado y se mantengan en el tubo tanto la pastilla como el sobrenadante.
3. Lavar dos veces con 1ml de PBS frío, disgregando la pastilla en vórtex, centrifugar bajo los mismos parámetros después de cada enjuague y repetir el paso 2 en cada ocasión. Centrifugar la pastilla celular y el contenido lipídico durante un minuto a 13 800 rpm. Posterior a ello, colocar la centrífuga a temperatura ambiente (24°C).
4. Agregar a cada tubo 600µL de Lysis/Binding Buffer y vortexear hasta que la pastilla se disgregue. Posterior a ello, añadir 3 µL de cel-mir-39 RNA (microRNA (cel-miR-39) Spike-InKit, Cat. 59000), a 33 fmol para llevar un control interno de la extracción de RNA y los experimentos siguientes. Añadir 60 µL de miRNA Homogenate Additive, vortexear 10 s e incubar en hielo durante 10 min.
5. Añadir 600 µL de Acid-Phenol:Chloroform y vortexear durante un minuto.
6. Centrifugar durante 5 min a 11 500 rpm a 24°C. Colocar Filter Cartridges por cada muestra en tubos colectores incluidos en el Kit.
7. Trasladar la fase acuosa a un tubo eppendorf estéril (descartar el resto), asegurándose de no tomar la interfase. Medir el volumen recuperado, luego

agregar al tubo, etanol absoluto 1.25 veces el volumen tomado y mezclar invirtiendo el tubo tres veces.

8. Agregar 700 µL de la mezcla lisado/etanol absoluto en el filtro, centrifugar los filtros durante 15 s a 10 000 rpm, descartar lo filtrado y repetir este paso hasta filtrar todo el volumen disponible de la mezcla lisado/etanol. Reutilizar el tubo colector para los pasos siguientes.
9. Iniciar el lavado, agregando al filtro 700 µL de miRNA Wash Solution 1, centrifugar durante 10 s a 10 000 rpm y descartar el filtrado. A partir de este paso, asegurarse de alicuotar la cantidad necesaria de Elution Solution y comenzar a precalentarla a 95° C por 1 min.
10. Agregar al filtro 500 µL de Wash Solution 2/3, centrifugar durante 10 s a 10 000 rpm y descartar el filtrado. Repetir este paso una vez. Después de esto, secar la columna centrifugando durante 1 min a 10 000 rpm y cambiar los filtros a un tubo colector nuevo para la elución.
11. Agregar al filtro 100 µL de Elution Solution precalentada a 95°C por 1 min, centrifugar durante 1 min a 10 000 rpm y descartar el filtro. Alicuotar 40 µL de RNA para realizar la cuantificación, geles para evaluar la integridad y cDNA. Esta alicuota se mantendrá a -20° C y almacenar los 60 µL restantes a -70° C como stock debidamente etiquetado.

Observaciones:

- a) **No resuspender la pastilla con la micropipeta para evitar introducir aerosoles.**
- b) **Mantener las muestras y los reactivos en hielo durante el mayor tiempo posible ayuda a lograr un mejor rendimiento en la extracción.**
- c) **Antes de comenzar a trabajar, es necesario limpiar el área con etanol e inhibidor de RNAsas (RnaseZap, Cat. 9780. 9782).**
- d) **Los primeros 6 pasos de este trabajo pueden trabajarse en una mampara limpia, después de la separación por fenol (paso 7 en adelante), debe trabajarse en el área de PCR para evitar contaminación de la muestra.**

- e) Es importante colocar los filtros en los tubos colectores incluidos en el kit, pues los tubos normales tienen menor diámetro y pueden romper el filtro.**
- f) Dado que la solución de elución se calienta a 95° C, cubrir el tubo con parafilm ayuda a evitar que el contenido del mismo se evapore.**
- g) Durante el uso de los filtros, se debe agregar la muestra y los reactivos al centro de la columna para evitar que el contenido se pierda en las paredes.**

CONFIDENCIAL