

PROTOCOLLO ESTRAZIONE MICRORNA DA PLASMA CON KIT QIAGEN

Il kit utilizzato si chiama miRNeasy Serum/Plasma Kit CAT 217184.

Per **150 ul di plasma**

Note generali:

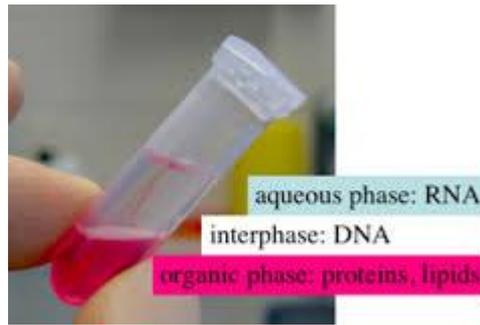
- utilizzare eppendorf caps lock e Dnasi/Rnase free
- utilizzare puntali con filtro
- evitare di parlare in presenza di eppendorf aperte per non contaminare
- maneggiare sempre tutto con guanti

Procedimento

- Scongela a temperatura ambiente il plasma (assicurarsi che sia completamente scongelato, guardare anche in contro luce per verificare che non ci siano cristalli)
- Aggiungere Qiazol in quantità pari a 5 volte il volume di plasma di partenza (per 150 ul di plasma usare **750 ul** di **Qiazol**). Dopo aver aggiunto pipettare più volte finché non si ottiene un composto omogeneo rosa pallido.
- aggiungere **4 ul** di **cel-miR-39** 100 amoli/ul (controllo esogeno di estrazione)

Questa operazione deve essere fatta sotto cappa chimica.

- Incubare 5 minuti a temperatura ambiente.
- Aggiungere **cloroformio** Rnase free in volume uguale al volume di partenza di plasma (nel nostro caso **150 ul**), quindi mescolare bene finché i due componenti non sono completamente omogenei e incubare a temperatura ambiente per 3 minuti.
- Centrifugare 12.000g per 15 min a 4°C. Dopo la centrifugazione si separano 3 fasi:
 - ✓ Inferiore (colore rosa) fase organica contiene proteine e lipidi
 - ✓ Intermedia (colore bianco) contiene DNA
 - ✓ Superiore (trasparente) fase acquosa contiene RNA e microRNA



- Prelevare la fase superiore (fase acquosa) senza toccare la fasi sottostanti e trasferire in una nuova eppendorf Dnasi/Rnasi free da 2 ml.

Questa fase si esegue sotto cappa chimica, mentre le fasi successive si eseguiranno sul bancone.

- Misurare il volume di fase acquosa prelevata.

- Aggiungere **Etanolo 100%** alla fase acquosa in quantità pari 1.5 volte il volume di fase acquosa prelevata (esempio per 500 ul di fase acquosa aggiungere 750 ul di etanolo), pipettando più volte per rendere omogenea la soluzione.

- Aggiungere al filtro rosa 700 ul mix fase acquosa-etanolo facendo attenzione a non toccare con la punta del puntale la parte bianca del filtro.

- Centrifugare 8000g a temperatura ambiente per 30 sec, buttare il contenuto del collection tube nell'apposito bicchierino dei rifiuti e asciugare il collection tube su un tovagliolino copovolgendolo, in modo da non bagnare le pareti esterne del filtro.

- Ripetere più volte questa procedura finchè non si sarà caricato nella colonnina tutto il volume

- Aggiungere **700 ul di buffer RWT**, aggiungendo dall'alto senza toccare l'interno del filtro e quindi centrifugare 8000g per 30 sec temp ambiente, buttare il prodotto di filtrazione, asciugare il collection tube su un tovagliolino copovolgendolo.

- Aggiungere **500 ul di buffer RPE** e centrifugare 8000g per 30 sec RT, buttare il prodotto di filtrazione, asciugare il collection tube su un tovagliolino copovolgendolo.

- Aggiungere **500 ul di etanolo al 80%** centrifugare 8000g per 2 min e buttare il prodotto di filtrazione, asciugare il collection tube su un tovagliolino copovolgendolo.

- Trasferire il filtrino (deve avere le pareti più asciutte possibili) in un nuovo collection tube da 2 ml centrifugo a 12.000 rpm per 5' RT, lasciando il tappo del filtrino aperto.

- Trasferire il filtro in una nuova eppendorf.

- Aggiungere **18 ul di acqua Rnasi/Dnasi free** in centro al filtro, senza toccare le pareti e il filtro, incubare per 10 minuti a temperatura ambiente, tenendo chiusi i tappi dell'eppendorf.

- Centrifugare a 14.000g per 1' a temp ambiente

L'RNA si recupera nella eppendorf sottostante, mentre il filtrino si può buttare, mettere subito la epp contenente l'RNA in ghiaccio.

Conservare l'RNA a -20°C o meglio per periodi più lunghi a -80°C .