



REAL TOTAL RNA SPIN PLANTS AND FUNGI KIT

Ref. **RBMER13 50 Preps.**

1. INTRODUCCIÓN

Este kit permite la obtención de **ARN total libre de ADN** a partir de diferentes tejidos y células de plantas y muestras de hongos utilizando para ello **columnas con una membrana de sílica.**

El procedimiento incluye la pulverización de la muestra con Ni líquido, seguido de una incubación en la solución de lisis que inactiva inmediatamente las RNasas y crea las condiciones de unión apropiadas para la absorción del ARN en la membrana de sílica. Junto con la solución de lisis se añade una **solución de PVP** (polivinilpirrolidona) que actúa uniendo contaminantes como polisacáridos y polifenoles que pueden interferir o degradar el ARN.

El ADN contaminante es eliminado por la aplicación de una solución de DNasa I (suministrada con el kit) directamente sobre la columna. Las sales, metabolitos y componentes celulares son eliminados por 2 pasos de lavado. Finalmente, el ARN es eluido con agua libre de nucleasas.

El REALTOTAL ARN SPIN PLANTAS Y HONGOS contiene 2 soluciones diferentes de lisis, una basada en guanidina tiocianato, **Solución de Lisis I**, la más recomendada debido a su fuerte propiedad desnaturizante y otra en guanidina HCl, **Solución de Lisis II**, ya que en algunas plantas y mohos la presencia de determinados metabolitos conduce a una solidificación del lisado, no siendo posible su procesamiento, en tales casos se utiliza la solución de lisis con guanidina HCl.

1. INTRODUCTION

*This kit allows obtaining **DNA-free total RNA** from different cells and tissues of plants and fungi samples using **columns with a silica membrane.***

*The samples are ground under liquid nitrogen, followed by incubation in the lysis solution which immediately inactivates the RNases and creates the correct binding conditions for the RNA absorption on the silica membrane. Together with the lysis solution is added a **PVP Solution** (polyvinylpyrrolidone) that acts binding contaminants such as polysaccharides and polyphenols that can interfere or degrade the RNA. The contaminant DNA is removed by the application of a **DNase I solution** (supplied with the kit) directly on the column. The salts, metabolites and cells components are removed by 2 wash steps. Finally, the RNA is eluted with nuclease-free water.*

*The REALTOTAL RNA SPIN PLANTS AND FUNGI contains 2 different lysis solutions, one guanidine thiocyanate based, **Lysis Solution I**, the most recommended due to strong denaturing feature and another based in guanidine HCl, **Lysis Solution II**, as in some plants and fungi the presence of certain metabolites leads to a solidification of the lysate, avoiding its processing, in such cases the lysis solution with guanidine HCl is used*

Sistema de
producción
certificado
bajo norma
ISO



Production
system
certified
under ISO



2. COMPONENTES DEL KIT KIT COMPONENTS

	Ref.	Ref. RBMER13 50 preps	T ^a
Solución de Lisis I <i>Lysis I Solution</i>	ERC1	25 ml	RT
Solución de Lisis II <i>Lysis II Solution</i>	EPH5	25 ml	RT
Solución de PVP <i>PVP Solution</i>	EPH3	3 ml	4°C
Solución STOP DNasa <i>DNasa STOP Solution</i>	ERC2	15 ml	RT
Solución de Lavado Concentrada <i>Concentrated Wash Solution</i>	ERC3	12.5 ml	RT
Tampón de Desalado de la Membrana <i>Membrane Desalting Buffer</i>	ERCM	25 ml	RT
Tampón de Reacción de la DNasa <i>DNase Reaction Buffer</i>	ERCD	7 ml	RT
Dnasa libre de RNasa (liofilizada) RNase-free DNase (lyophilized)	--	1 vial	4°C
Agua Libre de Nucleasas <i>Nuclease-free Water</i>	ERCH	15 ml	RT
Columnas de Unión ARN + Tubos Recolección <i>RNA Binding Columns + Collection Tubes</i>	ERC11	50 unid.	RT
Columnas de Filtración <i>Filtration Columns</i>	ERC12	50 unid.	RT
Tubos de Recolección <i>Collection Tubes</i>	ERC13	150 unid.	RT
Tubos de 1.5 ml <i>1.5 ml Tubes</i>	ERC14	50 unid.	RT

3. PROTOCOLO GENERAL GENERAL PROCEDURE

3.1 Consideraciones preliminares

- Debido a la omnipresencia de RNasas es absolutamente esencial que todo el material inicial sea congelado en Ni Líquido y conservado a -70°C. Añadir las soluciones de lisis lo antes posible, una vez añadida la solución de lisis, el lisado puede ser conservado a -70°C durante meses.
- **ATENCIÓN:** La Solución de Lisis I, la solución STOP DNasa I y el Tampón de Desalado Membrana contienen guanidina ticiannato. La Solución de Lisis II contiene guanidina HCL. Utilizar guantes y gafas como protección. En caso de contacto lavarse con agua abundantemente.

3.1 Preliminary conditions

- *Due to the RNases omnipresence, it is absolutely necessary that all the initial material is frozen in liquid Nitrogen and stored at -70°C. Add the lysis solutions as soon as possible, once the lysis solution has been added, the lysate can be stored at -70°C for months.*
- **ATTENTION:** *The Lysis Solution I, the DNase I STOP Solution and the Membrane Desalting Buffer contains guanidine thiocyanate. The Lysis Solution II contains guanidine HCL. Use gloves and glasses for protection. In case of contact wash with water.*



3.2 Preparaciones preliminares

- **Reconstituir la DNasa I libre de RNasa liofilizada, añadir 540 µl de agua libre de nucleasas al vial** e incubar 1 minuto a temperatura ambiente, mezclar hasta disolver la DNasa I. Dispensar en alícuotas y conservar a -20°C. No descongelar/congelar más de 3 veces las alícuotas.
- **Añadir 50 ml de alcohol 100 % a la solución de lavado concentrada, marcar la fecha.**

3.2 Preliminary Preparations

- *Reconstitute the lyophilized RNase-free DNase I, add 540 µl of nuclease-free water to the vial and incubate 1 minute at room temperature, mix until the DNase I is dissolved. Dispense into aliquots and store at -20°C. Do not thaw/freeze the aliquots more than 3 times.*
- *Add 50 ml of 100% alcohol to the concentrated wash solution, mark the date.*

3.3 Protocolo de extracción de ARN a partir de 100mg tejidos de plantas u hongos

Es necesario pulverizar los tejidos con Ni líquido debido a la omnipresencia de RNasas y para conseguir una lisis óptima de los tejidos, sino fuera posible, los tejidos blandos (hojas jóvenes, flores, etc.) pueden ser homogeneizadas directamente en la solución de lisis con un homogenizador eléctrico. Añadir la solución de lisis lo antes posible para inactivar las RNasas.

1. Añadir **350 µl de Solución de Lisis I + 50 µl Solución de PVP y 3.5 µl de β-mercaptoetanol** al tejido pulverizado con Ni líquido y agitar mediante vortex vigorosamente o utilizar un homogenizador eléctrico. Si el lisado se solidifica utilizar la Solución de Lisis II.
2. Reducir la viscosidad y limpiar el lisado por filtración a través de **una columna de filtración**. Colocar la columna de filtración en un tubo de recolección, aplicar el lisado y **centrifugar 1 minuto a 11.000 x g**. Transferir el filtrado a un nuevo tubo de centrifuga. **No agitar el pellet** de desechos celulares que se puede observar en el fondo del tubo de recolección después de la centrifugación.
3. Añadir **350 µl de Etanol 70 %** al filtrado resultante del paso 2 y mezclar por vortex o pipeteo. Después de añadirse el etanol se puede observar un precipitado que no afectará al proceso, este precipitado debe cargarse todo en la columna.
4. Coger una **columna de unión ARN** más su tubo de recolección y añadir el lisado. Centrifugar a **8.000 x g (10.000 rpm.)** durante **30 segundos**. Colocar la columna en un nuevo tubo de recolección.
5. Añadir **350 µl de Tampón de Desalado Membrana** y centrifugar a **máxima velocidad (11.000 x g)** durante **1 minuto** para secar la membrana. La eliminación de las sales producirá una digestión de la DNasa I mucho

más efectiva. Evitar el contacto del final de la columna con el líquido a desechar.

6. Preparar la **mezcla de reacción de la DNasa** en un microtubo estéril, para cada extracción, añadir **10 µl de DNasa I** reconstituida y **90 µl de Tampón de Reacción DNasa I**. Mezclar.
7. Aplicar **95 µl de la mezcla de reacción de la DNasa** directamente en el centro de la membrana de sílica de la columna. Incubar a **temperatura ambiente** durante **15 minutos**.
8. Añadir **200 µl Solución STOP/DNasaI** a la columna. Centrifugar a **8.000 x g** durante **30 segundos**. Colocar la columna en un nuevo tubo de recolección. Este tampón inactivará la DNasaI.
9. Añadir **600 µl de Solución de Lavado** a la columna. Centrifugar a **8.000 x g** durante **30 segundos**. Desechar el líquido y colocar de nuevo la columna en el tubo de recolección.
10. Añadir **250 µl de Solución de Lavado** a la columna. Centrifugar **2 minutos a máxima velocidad (11.000 x g)** para secar completamente la membrana. Colocar la columna en un microtubo de 1.5 ml (suministrado). Si por alguna razón, el líquido toca la columna después de la centrifugación, repetir el proceso.
11. Añadir **30 µl de Agua libre de Nucleasas** (suministrada) en la columna, asegurándose de que queda toda bien empapada. **Incubar 1 minuto a temperatura ambiente**. Centrifugar a **máxima velocidad (11.000 x g)** durante **1 minuto**
12. Añadir de nuevo otros **30 µl de Agua libre de Nucleasas** en la misma columna, manteniendo también el tubo de recolección y centrifugar a **máxima velocidad (11.000 x g)** durante **1 minuto**. En total se obtendrán unos **60 µl de ARN**

3.3 Protocol for RNA extraction from 100mg of plant or fungi tissues

It is necessary to ground the tissues with liquid Nitrogen due to the omnipresence of RNases and in order to obtain an optimal lysis of the tissues. If it wasn't possible, soft tissues (young leaves, flowers, etc.) can be directly homogenized in the lysis solution with a mechanical homogenizer (Polytron, Turrax). Add the lysis solution as soon as possible to inactive RNases.

1. Add **350 μ l of Lysis Solution I + 50 μ l of PVP Solution and 3.5 μ l of β -mercaptoethanol** to the ground tissue and shake vigorously with vortex or a mechanical homogenizer. If the lysate is solidified use the Lysis Solution II.
2. Reduce the viscosity and clear the lysate by filtration through a **filtration column**. Place the filtration column in a collection tube, pour the lysate and **centrifugate for 1 minute at 11.000 x g**. Transfer the lysate to a new centrifuge tube. **Do not shake the cell remains pellet** that can be seen at the bottom of the collection tube after the centrifugation.
3. Add **350 μ l of Ethanol 70 %** to the filtrate obtained in step 2 and mix by vortex. After addition of ethanol it is possible to see a precipitate that will not affect the process, be sure to load all of the precipitate on the column.
4. Take a RNA binding column and its collection tube and add the lysate. Centrifuge at **8.000 x g (10.000 rpm.) for 30 seconds**. Place the column in a new collection tube.
5. Add **350 μ l of Membrane Desalting Buffer** and centrifuge at **maximum speed (11.000 x g) for 1 minute** to dry the membrane. The salt removal will produce a DNase I digestion much more effective. If the column outlet has come into contact with the flow-through for any reason, discard the flow-through and centrifuge again for 30 seconds at 11.000 x g.
6. Prepare the **DNase I Reaction mixture** in a sterile microtube, for each extraction, add **10 μ l of reconstituted DNase I** to **90 μ l of DNase I Reaction Buffer**. Mix.
7. Apply **95 μ l of DNase Reaction mixture** directly onto the centre of the silica membrane of the column. Incubate at **room temperature for 15 minutes**.
8. Add **200 μ l of STOP/DNase I Solution** to the RNA binding column. Centrifuge at **8.000 x g for 30 seconds**. Place the tube in a new collection tube. This buffer will inactivate the DNase I.
9. Add **600 μ l of Wash Solution** to the column. Centrifuge at **8.000 x g for 30 seconds**. Remove the liquid and place the column back in the collection tube.
10. Add **250 μ l of Washing Solution** to the column. Centrifuge for **2 minutes at maximum speed (11.000 x g)** to completely dry the membrane. Place the column in a 1.5 ml (supplied) microtube. If for any reason, the liquid touches the column after the centrifugation, repeat the process.
11. Elute the RNA in **30 μ l of Nuclease-free Water** (supplied) and centrifuge at **maximum speed (11.000 x g) for 1 minute**.
12. Add again **30 μ l of Nuclease-free Water** to the same column, with the same collection tube. Centrifuge at **maximum speed (11.000 x g) for 1 minute**. Finally it will be obtained **60 μ l of RNA**



4. GUIA DE PROBLEMAS Y POSIBLES SOLUCIONES *TROUBLESHOOTING*

4.1 ARN degradado o no se obtiene ARN:

Intentar crear una zona de trabajo con un ambiente libre de RNasas, se puede utilizar para limpiar las superficies y material el RNasa Remove (Ref.RD056). Cambiar de guantes frecuentemente. Se recomienda el uso de tubos estériles y que estén cerrados siempre que se pueda durante el proceso.

4.2 Baja calidad o poca cantidad del ARN obtenido:

- Reactivos no reconstituidos adecuadamente. Añadir la cantidad indicada de agua libre de nucleasas al vial de la DNasaI y etanol a la Solución de lavado concentrada.
- La muestra y reactivos no han sido mezclados completamente.
- No se ha añadido etanol después de la lisis. La unión del ARN a la membrana de sílica es sólo efectiva en presencia de alcohol.
- Conservar todos los componentes del kit como se indica. Almacenamiento a bajas temperaturas puede producir precipitación de sales.
- Mantener los envases bien cerrados para prevenir la evaporación o contaminación.
- La muestra no ha sido conservada apropiadamente. Siempre que se pueda utilizar material fresco, sino es posible, congelar la muestra en Ni líquido y mantenerlas a -70°C hasta añadir la Solución de Lisis.
- Insuficiente homogenización del material inicial, siempre pulverizar las muestras en presencia de Ni Líquido. Utilizar las columnas de filtración

4.3 Sobrecarga de la membrana:

- Demasiado material inicial utilizado. Una sobrecarga de la columna puede llevar a un bajo rendimiento. Reducir la cantidad de muestra o utilizar una mayor cantidad de Solución de Lisis

4.4 Contaminación con ADN genómico:

- DNasa I no activa. Reconstituir y almacenar la DNasa I según las instrucciones dadas.
- Pipetear la solución de la DNasa I directamente en el centro de la membrana de sílica.
- Reducir la cantidad de material inicial utilizado

4.1 Degraded RNA or no RNA obtained:

Try to create a RNase-free working area. You can use RNase Remove (Ref.RD056) to clean surfaces and material. Change gloves frequently. It is recommended to use sterile tubes and to keep them closed as much as possible during the process.

4.2 Low quality or quantity RNA obtained:

- *The reagents have not been correctly reconstituted. Add the indicated quantity of nuclease-free water to the vial containing the DNase I and ethanol to the concentrated Wash Solution.*
- *The samples and reagents have not been completely mixed.*
- *The ethanol has not been added after the lysis. RNA will only bind to the silica membrane in presence of ethanol.*
- *Store all the components of the kit as it is indicated. Low temperature storage can produce salts precipitation. Keep the containers closed to prevent evaporation and contamination.*
- *The sample has not been correctly stored. If possible, use fresh material, if it is not possible, freeze the sample with liquid Nitrogen and store them at -70°C until the addition of the Lysis Solution*

The homogenization of the starting material has not been enough; always pulverize the samples with liquid Nitrogen. Use the filtration columns

4.3 Overloaded Membrane:

- *Too much starting material has been used. An overload of the column can lead to a low yield. Reduce the sample quantity or use a bigger quantity of Lysis Solution.*

4.4 Contamination with genomic DNA:

- *Not active DNase I. Reconstitute and store the DNase I according to the instruction given.*
- *Pipet the DNase I solution directly onto the centre of the silica membrane.*
- *Reduce the starting quantity of material used.*

4.5 Bajo rendimiento del ARN en las siguientes aplicaciones o experimentos:

- No se ha eliminado completamente la solución de lavado que contiene etanol. Asegurarse que el final de la columna no contacta con el líquido después del 2º lavado.
- Comprobar que la solución de lavado ha sido equilibrada a temperatura ambiente antes de usar. Lavar a bajas temperaturas produce un descenso en la eficiencia de eliminar las sales.

4.6 Contaminación con polisacáridos que pueden inhibir los experimentos siguientes

- Este problema viene indicado si se obtiene un A260/ A230 inferior a 2 (Cheng and Seeman). Los polisacáridos se pueden eliminar de varias formas:
A) precipitación con Cloruro de Litio: ajustar la solución de ARN a 2.5 M de LiCl, mezclar, incubar 30 minutos a -20°C y posteriormente centrifugar a 16.000 xg durante 15 minutos.
B) precipitación con acetato de potasio: ajustar la solución de ARN a 0.2 M de AcK, mezclar, incubar 15 minutos en hielo, luego precipitar el material insoluble durante 10 minutos a 4°C (Wilkins and Smart)

4.5 Low RNA yield in the following applications or experiments

- *The wash solution that contains alcohol has not been completely removed. Be sure that the end of the column does not touch the liquid after the 2nd wash.*

Check that the wash solution has been balanced at room temperature before use. Washing at low temperatures produces a decrease on the salt removal efficiency

4.6 Contamination with polysaccharides which can inhibit the following experiments

This problem is indicated if you obtain an A260/ A230 lower than 2 (Cheng and Seeman). The polysaccharides can be removed in different ways:

A) precipitation with Lithium chloride. adjust the RNA reaction at 2.5 M of LiCl, mix, incubate 30 minutes at -20°C, then centrifuge at 16.000 xg for 15 minutes.

B) precipitation with potassium acetate: adjust the RNA reaction at 0.2 M of AcK, mix, incubate 15 minutes in ice, then pellet insoluble material for 10 minutes at 4°C (Wilkins and Smart)