



REAL TOTAL RNA FROM BACTERIA AND YEAST KIT

Ref. **RBMER03**

1. INTRODUCCIÓN

Este kit permite la obtención de **ARN total** a partir de diferentes cultivos de bacterias y levaduras, sin la utilización de reactivos tóxicos.

El procedimiento incluye una lisis celular seguida de una precipitación de las proteínas y parte del ADN genómico. Luego, mediante una precipitación con isopropanol, se obtiene el ARN total que finalmente es rehidratado.

Las bacterias Gram (+) y las levaduras son más difíciles de lisar que las bacterias Gram (-), es por ello necesario cuando se parte de este tipo de muestras, la preincubación con enzimas líticas (no suministrados en el kit). En el caso de bacterias Gram (+) se utiliza lisozima y en el caso de levaduras, zimolasa o liticasa.

El REAL TOTAL ARN de Bacterias y Levaduras Kit permite la extracción de ARN total, aunque puede obtenerse con contaminación de DNA

1. INTRODUCTION

*This kit allows the extraction of **total RNA** from different bacterial and yeast cultures avoiding the use of toxic reagents.*

The process includes a cell lysis followed by the precipitation of the proteins and part of the genomic DNA. Later, by a precipitation with isopropanol, the total RNA is obtained, which is finally rehydrated.

Gram (+) strains and yeast are more difficult to lysate than Gram (-) strains and for this reason it's necessary the preincubation with lytic enzymes (not supplied with this kit). In case of Gram (+) strains, lysozyme is used, and zymolase or lyticase is used for yeast.

REAL TOTAL RNA from Bacteria and Yeast Kit allows the extraction of total RNA, although contaminant genomic DNA can also be extracted.

Sistema de producción certificado bajo norma ISO



Production system certified under ISO



2. COMPONENTES DEL KIT

KIT COMPONENTS

	Ref.	Ref. RBMEPS03 50 preps	T ^a
Solución de Lisis <i>Lysis Solution</i>	ER01B	60 ml	RT
Solución de Precipitación Proteínas <i>Protein Precipitation Solution</i>	ER02B	30 ml	4°C
Solución de rehidratación ARN <i>RNA Rehydration Solution</i>	ER03	10 ml	4°C

3. PROTOCOLO GENERAL

GENERAL PROCEDURE

3.1 Consideraciones preliminares

- Las RNAsas se encuentran tanto en procariotas como en eucariotas, y prácticamente en todos los tipos celulares. La principal fuente de RNAsas son los microorganismos (bacterias, hongos y sus esporas) y sus derivados (enzimas de restricción, polimerasas, etc.). Por tanto, en un laboratorio de Biología Molecular pueden estar presentes en numerosos lugares y es conveniente tener en cuenta una serie de precauciones básicas como:
 - Utilizar guantes para prevenir la contaminación de las RNAsas presentes en las manos.
 - Cambiar frecuentemente de guantes.
 - Disponer de un juego de pipetas para trabajar exclusivamente con ARN.
 - Utilizar tubos y pipetas que estén garantizados libres de RNAsas.
 - Utilizar reactivos y compuestos químicos libres de RNAsas.
 - Utilizar una zona exclusiva en el laboratorio donde trabajar con ARN.

3.2 Preparaciones preliminares

- Si la solución de lisis contiene un precipitado debido a las bajas temperaturas, incubar a 37°C y mezclar para disolver el precipitado

3.1 Preliminary conditions

- RNases exist in procariotes as well as in eucariotes, and almost in every cell type. The main RNases sources are microorganisms (bacteria, fungi and their spores) and their products (restriction enzymes, polymerases, etc.). For such reason, they can be present in a Molecular Biology laboratory in many places and it is convenient to be careful with the following recommendations:*
 - Use gloves to prevent contamination by RNases present in hands.*
 - Change frequently your gloves.*
 - Have pipettes for working exclusively with RNA.*
 - Use RNase-free tubes and tips.*
 - Use RNase-free reagents.*
 - Have a determined area in the lab to work with RNA.*

3.2 Preliminary Preparations

- If the lysis solution contains a precipitate due to the low temperatures, incubate at 37°C and mix to dissolve the precipitate*



3.3 Protocolo de extracción de ARN total a partir de 1 ml de cultivos bacterianos Gram(+) o Gram(-)

Las bacterias Gram(+) son más difíciles de lisar que las Gram (-), es por ello que se recomienda la incubación con enzimas líticos. Para ciertas especies de Staphylococcus es necesaria la lisis con una mezcla de lisozima (10 mg/ml) y lisostafina (10 mg/ml)

1. Añadir 1ml de un cultivo crecido durante la noche a un tubo de 1.5 ml.
2. Centrifugar a 14.000 xg durante 30 segundos. Eliminar el sobrenadante. **Para bacterias Gram (+) proceder con el punto 3. Para bacterias Gram (-) ir directamente al punto 6.**
3. Resuspender las células en 540 µl de agua libre de nucleasas o EDTA 50 mM.
4. Añadir 60 µl de Lisozima (10 mg/ml). El propósito de este tratamiento es debilitar la pared celular para hacer más eficiente la lisis celular.
5. Incubar la muestra a 37°C durante 60 minutos. Invertir la muestra periódicamente durante la incubación. Centrifugar a 14.000 xg durante 2 minutos. Eliminar el sobrenadante.
6. Añadir 600 µl de **Solución de Lisis (ER01B)** al pellet celular. Pipetear para resuspender y lisar las células.
7. Incubar la muestra a 65°C durante 5 minutos. Dejar enfriar la muestra a temperatura ambiente.
8. Añadir 300 µl de **Solución Precipitación de Proteínas. (ER02B)** Invertir el tubo unas 8-10 veces e incubar en hielo durante 5 minutos.
9. Centrifugar a 14.000 xg durante 5 minutos. Se observará que el precipitado proteico forma un pellet.
10. Pasar el sobrenadante que contiene el ARN a

un tubo que contenga 600 µl de **Isopropanol**. Mezclar por inversión varias veces.

11. Centrifugar a 14.000 xg durante 3 minutos.
 12. Eliminar el sobrenadante. Añadir 600 µl de **Etanol 70 %** e invertir varias veces para lavar el pellet de ARN.
 13. Centrifugar a 14.000 xg durante 2 minutos. Cuidadosamente, pues el pellet puede desprenderse del tubo, eliminar todo el etanol.
 14. Invertir el tubo y dejar secar en papel absorbente durante 15 minutos.
 15. Añadir 100 µl de **Solución de Rehidratación. (ER03)**. Pipetear para resuspender el pellet.
 16. Permitir la rehidratación del ARN al menos durante 30 minutos en hielo. Pipetear para resuspender el pellet.
 17. Conservar las muestras a -70°C.
- ✓ Si el RNA obtenido va a ser utilizado en ensayos de RT-PCR se recomienda la utilización del kit REAL ARN total bacterias y levaduras STAR kit (ref. RBMER04) o del REALSTAR kit (Ref. RBMER10) para la eliminación del posible DNA contaminante.
 - ✓ Los falsos positivos debidos al ADN genómico contaminante en una RT-PCR pueden ser identificados realizando un control de “no transcripción inversa” durante el ensayo de RT-PCR. El problema también puede ser minimizado con el diseño de primers que se sitúen al menos dentro de un intrón de la secuencia genómica, de esta forma, el producto de PCR obtenido a partir de AND contaminante será mayor que el generado a partir del cDNA.

3.3 Protocol for total RNA extraction from 1 ml of Gram (+) or (-) bacterial cultures

Gram (+) strains are more difficult to lyse than Gram (-) strains, for this reason it is recommended to do incubation with lytic enzymes. For certain species of Staphylococcus it is necessary a lysis with a mixture of lysozyme (10 mg/ml) and lysostaphine (10 mg/ml)

1. Add 1ml of an overnight culture to a 1.5 ml. microtube.
2. Centrifuge at 14.000 xg for 30 seconds. Remove the supernatant. **For Gram (+) strains proceed with step 3. For Gram (-) strains go directly to step 6.**

3. Resuspend the cells in 540 µl of nuclease-free water or EDTA 50 mM.
4. Add 60 µl of Lysozyme (10 mg/ml). The purpose of this treatment is to weak the cell wall to make the cell lysis more efficient.
5. Incubate the sample at 37°C for 60 minutes. Invert the periodically the sample during the incubation. Centrifuge at 14.000 xg for 2 minutes. Remove the supernatant.
6. Add 600 µl of **Lysis Solution (ER01B)** to the cell pellet. Pipette to resuspend and to lyse the cells.
7. Incubate the sample at 65°C for 5 minutes. Allow to air dry.

8. Add 300 μ l of **Protein Precipitation Solution. (ER02B)** Invert the tube about 8-10 times and incubate in ice for 5 minutes.
9. Centrifuge at 14.000 xg for 5 minutes. The protein precipitate will form a tight pellet.
10. Pour the supernatant containing the RNA in a new microtube with 600 μ l of **Isopropanol**. Mix by inversion for several times.
11. Centrifuge at 14.000 xg for 3 minutes.
12. Remove the supernatant. Add 600 μ l of **Ethanol 70 %** and invert the tube several times to wash the RNA pellet.
13. Centrifuge at 14.000 xg for 2 minutes. Carefully, avoiding losing the pellet. Remove all the ethanol.
14. Invert and drain the tube on absorbent paper and allow to air dry for 15 minutes.
15. Add 100 μ l of **Rehydration Solution. (ER03)**. Use the pipettor for resuspending the pellet.
16. Allow the RNA to rehydrate on ice for at

least 30 minutes. Use the pipettor for resuspending the pellet.

17. Store the samples at -70°C .

- ✓ If the obtained RNA is going to be used in RT-PCR assays the use of the REAL Total RNA from Bacteria and Yeast STAR kit (ref. RBMER04) or the REALSTAR kit (Ref. RBMER10) it is recommended to remove the contaminant DNA.
- ✓ False positives due to contaminant genomic DNA in a RT-PCR can be identified with a "no reverse transcription" control during the RT-PCR assay. The problem can also be minimized with the design of primers which are located at least inside an intron of the genomic sequence. This way, the PCR product obtained from contaminant DNA will be bigger than the one generated from the cDNA.

3.4 Protocolo de extracción de ARN total a partir de 1 ml de cultivo de levaduras

1. Añadir 1ml de un cultivo crecido durante la noche a un tubo de 1.5 ml.
2. Centrifugar a 14.000 xg durante 2 minutos. Eliminar el sobrenadante.
3. Resuspender las células en 592 μ l de agua libre de nucleasas o EDTA 50 mM.
4. Añadir 8 μ l de Liticasa o Zimolasa (20 mg/ml). El propósito de este tratamiento es debilitar la pared celular para hacer más eficiente la lisis celular.
5. Incubar la muestra a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 60 minutos. Invetir la muestra periódicamente durante la incubación. Centrifugar a 14.000 xg durante 2 minutos. Eliminar el sobrenadante.
6. Añadir 600 μ l de **Solución de Lisis (ER01B)** al pellet celular. Pipetear para resuspender y lisar las células.
7. Incubar la muestra a 65 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos. Dejar enfriar la muestra a temperatura ambiente.
8. Añadir 300 μ l de **Solución Precipitación de Proteínas. (ER02B)** Invertir el tubo unas 8-10 veces e incubar en hielo durante 5 minutos.
9. Centrifugar a 14.000 xg durante 5 minutos. Se observará que el precipitado proteico forma un pellet.
10. Pasar el sobrenadante que contiene el ARN a un tubo que contenga a 600 μ l de **Isopropanol**. Mezclar por inversión varias veces.
11. Centrifugar a 14.000 xg durante 3 minutos.
12. Eliminar el sobrenadante. Añadir 600 μ l de **Ethanol 70 %** e invertir varias veces para lavar

el pellet de ARN.

13. Centrifugar a 14.000 xg durante 2 minutos. Cuidadosamente, pues el pellet puede desprenderse del tubo, eliminar todo el etanol.
 14. Invertir el tubo y dejar secar en papel absorbente durante 15 minutos.
 15. Añadir 100 μ l de **Solución de Rehidratación. (ER03)** Pipetear para resuspender el pellet.
 16. Permitir la rehidratación del ARN al menos durante 30 minutos en hielo. Pipetear para resuspender el pellet.
 17. Conservar las muestras a -70°C .
- ✓ Si el RNA obtenido va a ser utilizado en ensayos de RT-PCR se recomienda la utilización del kit REAL ARN total bacterias y levaduras STAR kit (ref. RBMER04) o del REALSTAR kit (Ref. RBMER10) para la eliminación del posible DNA contaminante.
 - ✓ Los falsos positivos debidos al ADN genómico contaminante en una RT-PCR pueden ser identificados realizando un control de "no transcripción inversa" durante el ensayo de RT-PCR. El problema también puede ser minimizado con el diseño de primers que se sitúen al menos dentro de un intrón de la secuencia genómica, de esta forma, el producto de PCR obtenido a partir de AND contaminante será mayor que el generado a partir del cDNA.



3.4 Protocol for total RNA extraction from 1 ml of yeast culture

1. Add 1ml of an overnight culture to a 1.5 ml. microtube.
 2. Centrifuge at 14.000 xg for 2 minutes. Remove the supernatant.
 3. Resuspend the cells in 592µl of nuclease-free water or EDTA 50 mM.
 4. Add 8 µl of Lyticase or Zymolase (20 mg/ml). The purpose of this treatment is to weak the cell wall to make the lysis more efficient.
 5. Incubate the samples at 37°C for 60 minutes. Invert periodically the sample during the incubation. Centrifuge at 14.000 xg for 2 minutes. Remove the supernatant.
 6. Add 600 µl of **Lysis Solution (ER01B)** to the cell pellet. Use a pipettor to resuspend and to lyse the cells.
 7. Incubate the sample at 65°C for 5 minutes. Allow to air dry.
 8. Add 300 µl of **Protein Precipitation Solution (ER02B)**. Invert the tube for 8-10 times and incubate in ice for 5 minutes.
 9. Centrifuge at 14.000 xg for 5 minutes. The protein precipitate will form a tight pellet.
 10. Pour the supernatant containing the RNA in a new microtube containing 600 µl of **Isopropanol**. Mix by inversion several times.
 11. Centrifuge at 14.000 xg during 3 minutes.
 12. Remove the supernatant. Add 600 µl of **Ethanol 70 %** and invert the tube several times to wash the RNA pellet.
 13. Centrifuge at 14.000 xg for 2 minutes. Carefully, avoiding losing the pellet, removing all the ethanol.
 14. Invert and drain the tube on absorbent paper to allow to air dry for 15 minutes.
 15. Add 100 µl of **Rehydration Solution (ER03)**. Use a pipettor for resuspending the pellet.
 16. Allow the RNA to rehydrated on ice for at least 30 minutes. Use a pipettor for resuspending the pellet.
 17. Store the samples at -70°C.
- ✓ If the obtained RNA is going to be used in RT-PCR the use of the REAL Total RNA from Bacteria and Yeast STAR kit (ref. RBMER04) or the REALSTAR kit (Ref. RBMER10) it is recommended to remove the contaminant DNA.
 - ✓ False positives due to contaminant DNA in a RT-PCR can be identified with a “no reverse transcription” control during the RT-PCR assay. The problem can also be minimized with the design of primers which are located at least inside an intron of the genomic sequence. This way the PCR product obtained from contaminant DNA will be higher than the generated from the cDNA

4. GUIA DE PROBLEMAS Y POSIBLES SOLUCIONES TROUBLESHOOTING

Dada la gran variedad de muestras que se pueden tratar para extraer ARN total con este kit, se hace difícil poder generalizar los posibles problemas y soluciones. Es por ello, que recomendamos que no duden en ponerse en contacto con el servicio técnico del laboratorio REAL (en Durviz, s.l.) para cualquier consulta adicional respecto a los protocolos de trabajo o problemas que puedan surgir durante el trabajo.

Due to the wide number of samples that can be treated to extract total RNA using this kit, it's difficult to generalize the possible problems. Please contact REAL Technical Service (in Durviz, s.l.) for any comment or question regarding the protocol.