

# REAL PLANT DNA KIT

Ref. **RBMEG04:** (para **50 EXTRACCIONES**)  
Ref. **RBMEG05:** (para **200 EXTRACCIONES**)

(for **50 EXTRACTION**)  
(for **200 EXTRACTION**)

## 1. DESCRIPCIÓN

### 1.1. Descripción del producto.

Este kit provee un método para una eficiente y rápida extracción de **ADN genómico a partir de tejidos y células de plantas y hongos.**

Es conocido que las plantas contienen cantidades de diferentes sustancias (polisacáridos, polifenoles, etc) y que plantas del mismo género o géneros relacionados pueden presentar enormes variabilidades en sus composiciones bioquímicas, de esta forma, se hace difícil de disponer de un único método de extracción de ADN para todas las plantas.

Para solventar este problema y poder abarcar el mayor número de plantas posibles REAL utiliza una **PVP Solution** que es capaz de unir los polisacáridos y polifenoles que se liberan mediante la lisis celular y que poseen la capacidad de formar complejos con los ácidos nucleicos y degradarlos o hacer que precipiten con ellos.

El procedimiento incluye una homogenización de la muestra en un **Plants and Fungi Extraction Solution** y la **PVP Solution**. La lisis se completa con la incubación en un **Lysis Solution** y **RNase** a 37°C durante 30 minutos.

Las proteínas celulares y restos celulares son eliminados mediante una Tampón de eliminación de proteínas, lo que permite dejar el ADN genómico en solución. Finalmente, el ADN genómico es aislado por una precipitación con isopropanol.

## 1. DESCRIPTION

### 1.1 Product description

This kit provides a method for efficient and rapid extraction of **genomic DNA from plant and fungal tissues and cells.**

It is known that plants contain quantities of different substances (polysaccharides, polyphenols, etc.) and that plants of the same genus or related genera can present enormous variability in their biochemical compositions, thus making it difficult to have a single DNA extraction method for all plants.

To solve this problem and to be able to cover as many plants as possible REAL uses a **PVP Solution** that is able to bind polysaccharides and polyphenols that are released by cell lysis and that have the ability to form complexes with nucleic acids and degrade them or cause them to precipitate with them.

The procedure includes a homogenization of the sample in an **Plants and Fungi Extraction Solution** and **PVP Solution**. Lysis is completed by incubation in **Lysis Solution** and **RNase** at 37°C for 30 minutes.

Cellular proteins and cellular debris are removed using a Protein Removal Buffer, leaving the genomic DNA in solution. Finally, the genomic DNA is isolated by isopropanol precipitation.

## 2. COMPONENTES DEL KIT / KIT COMPONENTS

Componentes REAL	Ref.	Envase (50 Extracciones)	Envase (200 Extracciones)	T <sup>a</sup>
Plants and Fungi Extraction Solution	EPH1	25 ml	100 ml	RT
PVP Solution	EPH3	10 ml	40 ml	4°C
Lysis Solution	EPH2	3 ml	12 ml	RT
RNase	E30	150 µ	600 µ	-20°C
Protein Precipitation Solution	E23	18 ml	72 ml	RT
Hydration Solution	E24	5 ml	20 ml	RT

### Equipos y reactivos necesarios no incluidos:

- \* Isopropanol
- \* Etanol 70 %.
- \* Microtubos de 1.5, y 2.0 ml.
- \* Tubos de centrifuga de 15 o 30 ml que soporten elevadas velocidades (para extracciones mayores de 100 mg de tejidos).
- \* Microcentrífuga o centrífuga clínica
- \* Vortex
- \* Baño de Agua
- \* Nitrógeno líquido y mortero para pulverizar los tejidos.
- \* Homogenizador eléctrico.
- \* Proteinasa K (20 mg/ml) para extracción en hongos.

### Equipment and additional reagents required

- \* Isopropanol
- \* 70 % Ethanol
- \* 1.5, or 2.0 ml microtubes.
- \* 15 or 30 ml centrifuge tubes that can withstand high speeds (for extractions greater than 100 mg of tissue).
- \* Microcentrifuge or clinic centrifuge.
- \* Vortex
- \* Water Bath
- \* Liquid nitrogen and mortar for tissue spraying.
- \* Electric homogenizer

## 3.PROTOCOLO GENERAL

## 3. GENERAL PROCEDURE

### 3.1. Preparaciones preliminares

- Si la **Lysis Solution** contiene un precipitado debido a las bajas temperaturas. Incubar a 37°C y mezclar para disolver el precipitado.
- Conservar la **RNase** a 4°C. Si el periodo de utilización del kit va a ser elevado, se recomienda hacer alícuotas y conservar a -20°C.

### 3.1 Preliminary preparations

- If the **Lysis Solution** contains a precipitate due to low temperatures. Incubate at 37°C and mix to dissolve the precipitate.
- Store the **RNase** at 4°C. If the period of use of the kit is going to be long, it is recommended to make aliquots and store at -20°C.

### 3.2. Consideraciones preelminares

- Para una efectiva obtención de ADN a partir de **plantas** se recomienda pulverizar la muestra en un mortero de porcelana con nitrógeno líquido. Para tejidos blandos y no fibrosos, como hojas jóvenes, flores, etc. pueden ser homogenizadas en un homogenizador eléctrico pero siempre que se trate de muestras frescas, diseccionando la muestra en pequeños trozos, añadir el **Plants and Fungi Extraction Solution + PVP Solution** y homogeneizar. Para tejidos duros o fibrosos, como tallos, semillas, etc. se recomienda el uso de Ni líquido.
- En el caso de **los hongos** recoger el micelio a partir del cultivo por filtración, lavar 3 veces con agua estéril desionizada o PBS para eliminar el medio de cultivo. Pulverizar el tejido en un mortero de porcelana con Ni líquido, conservar a -80°C o procesar la muestra.
- **NOTA:** Puede ser necesario variar la cantidad del material inicial dependiendo de la especie, estado, preparación del tejido o tamaño del genoma.
- Para procesar muestras de 100 mg es necesario utilizar tubos de 15 o 30 ml que soporten altas velocidades de centrifugación.

### 3.2. Preliminary considerations

- For effective DNA collection from **plants**, it is recommended to pulverize the sample in a porcelain mortar with liquid nitrogen. For soft and non-fibrous tissues, such as young leaves, flowers, etc., they can be homogenized in an electric homogenizer, but always in the case of fresh samples, dissecting the sample into small pieces, adding the **Plants and Fungi Extraction Solution + PVP Solution** and homogenizing. For hard or fibrous tissues, such as stems, seeds, etc. the use of liquid Ni is recommended.
- **For fungi** collect the mycelium from the culture by filtration, wash 3 times with sterile deionized water or PBS to remove the culture medium. Pulverize the tissue in a porcelain mortar with liquid Ni, store at -80°C or process the sample.
- **NOTE:** It may be necessary to vary the amount of starting material depending on species, condition, tissue preparation or genome size.
- For processing 100 mg samples it is necessary to use 15 or 30 ml tubes that can withstand high centrifugation speeds.

### 3.3 Protocolo de extracción de ADN fenómico a partir de 10-20 mg de tejido de planta o 10-20 mg de tejido de hongo.

#### Lisis celular

1. Pesar la muestra **10-20 mg de tejido de planta o 10-20 mg tejido de hongo** y añadir **400 µl de Plants and Fungi Extraction Solution + 200 µl de PVP Solution**. Homogenizar con un homogeneizador eléctrico durante 20 segundos.
2. Añadir **60 µl Lysis Solution + 3 µl RNase**. Vortex vigorosamente e incubar la muestra a 37°C durante 30 minutos. *En el caso de los hongos para aumentar la eficiencia de la lisis añadir 3 µl de Proteinasa K (20 mg/ml) e incubar a 55°C durante 1 hora o overnight. Si es posible, invertir o vortex periódicamente durante la incubación.*

### 3.3 Protocol for extraction of phenolic DNA from 10-20 mg of plant tissue or 10-20 mg of fungal tissue.

#### Cell lysis

1. Weigh the sample **10-20 mg of plant tissue or 10-20 mg of mushroom tissue** and add 400 µl of **Plants and Fungi Extraction Solution + 200 µl of PVP Solution**. Homogenize with an electric homogenizer for 20seconds.
2. Add **60 µl Lysis Solution + 3 µl RNase**. Vortex vigorously and incubate the sample at 37°C for 30 minutes. For fungi to increase lysis efficiency add 3 µl Proteinase K (20 mg/ml) and incubate at 55°C for 1 hour or overnight. If possible, invert or vortex periodically during incubation.

### Precipitación proteica

1. Enfriar la muestra a temperatura ambiente.
2. Añadir **360 µl of Protein Precipitation Solution**
3. Vortex vigorosamente durante 20-30 segundos.
4. Incubar a **-20°C durante 10 minutos**.
5. Centrifugar a **14.000 rpm durante 5 minutos**. Se observará que el precipitado proteico forma un pellet. Si pasan partículas del pellet volver a centrifugar como en el anterior apartado.

### Precipitación del ADN

1. Pasar el sobrenadante que contiene el ADN a un microtubo que contenga **600 µl de isopropanol**. Mezclar por inversión varias veces.
2. Centrifugar a **14.000 rpm durante 3 minutos**.
3. Eliminar el sobrenadante. Añadir **600 µl de etanol 70%** e invertir varias veces para lavar el pellet.
4. Centrifugar a **14.000 rpm durante 2 minutos**. Cuidadosamente eliminar todo el etanol. Vigilar no perder el pellet de ADN. Normalmente este pellet tiene color verde-marrón y no el característico color blanco.
5. Invertir el tubo y dejar secar en papel absorbente durante 15 minutos.

### Hidratación del ADN

1. Añadir **100 µl del Hydration Solution**. Según la especie, el tamaño del pellet puede ser mayor, utilizar en tales casos una mayor cantidad de Hydration Solution de forma que no quede una solución excesivamente viscosa.
2. Incubar a 65°C durante 1 hora con periódicas agitaciones para ayudar a la dispersión del ADN.
3. **Centrifugar a 14.000 rpm durante 1 minuto ya que puede haber partículas presentes en el ADN rehidratado. Pasar el sobrenadante que contiene el ADN a un nuevo microtubo.**
4. Conservar a 2-8°C. Para almacenajes largos conservar a -20°C o -80°C.

### Eliminación posterior de polisacáridos

En aquellas especies con elevadas cantidades de polisacáridos se puede realizar una purificación posterior que suele producir una reducción en el ADN obtenido, pero de mayor calidad. Para ello valorar si las subsiguientes manipulaciones del ADN son inhibidas.

1. Ajustar la solución de ADN hidratado a 0.5 M de Acetato de Potasio y 30 % de etanol. Incubar a -20°C durante 10 minutos.
2. Centrifugar a 14.000 rpm durante 3 minutos.
3. Recoger el sobrenadante con una pipeta y añadir 1 volumen de isopropanol.
4. Centrifugar a 14.000 rpm durante 3 minutos.
5. Lavar con etanol 70 %.
6. Centrifugar a 14.000 rpm durante 2 minutos.
7. Invertir el tubo y dejar secar en papel absorbente durante 15 minutos.
8. Resuspender el pellet en el Tampón de Rehidratación.

**NOTA:** Para procesar muestras de mayor tamaño, ver la tabla adjunta con los reactivos escalados según el tamaño de la muestra y proceder como el protocolo descrito aplicando las cantidades correspondientes.

### Protein precipitation

1. Cool the sample to room temperature.
2. Add **360 µl of Protein Precipitation Solution**.
3. Vortex vigorously for 20-30 seconds.
4. Incubate at **-20°C for 10 minutes**.
5. Centrifuge at **14,000 rpm for 5 minutes**. The protein precipitate should be observed to form a pellet. If particles pass from the pellet, centrifuge again as in the previous section.

### Precipitation of DNA

1. Transfer the supernatant containing the DNA to a microtube containing **600 µl isopropanol**. Mix by inversion several times.
2. Centrifuge at **14,000 rpm for 3 minutes**.
3. Remove the supernatant. Add **600 µl of 70% ethanol** and invert several times to wash the pellet.
4. Centrifuge at **14,000 rpm for 2 minutes**. Carefully remove all ethanol. Be careful not to lose the DNA pellet. Normally this pellet has a green-brown color and not the characteristic white color.
5. Invert the tube and allow to dry on absorbent paper for 15 minutes.

### DNA hydration

1. Add **100 µl of Hydration Solution**. Depending on the species, the pellet size may be larger, in such cases use a larger amount of Hydration Solution so that the solution does not become excessively viscous.
2. Incubate at 65°C for 1 hour with periodic shaking to aid DNA dispersion.
3. **Centrifuge at 14,000 rpm for 1 minute as particles may be present in the rehydrated DNA. Transfer the supernatant containing the DNA to a new microtube.**
4. Store at 2-8°C. For long term storage store at -20°C or -80°C.

### Subsequent removal of polysaccharides

In those species with high amounts of polysaccharides, a subsequent purification can be carried out, which usually produces a reduction in the DNA obtained, but of higher quality. For this purpose, assess whether subsequent DNA manipulations are inhibited.

1. Adjust the hydrated DNA solution to 0.5 M potassium acetate and 30 % ethanol. Incubate at -20°C for 10 minutes.
2. Centrifuge at 14,000 rpm for 3 minutes.
3. Collect the supernatant with a pipette and add 1 volume of isopropanol.
4. Centrifuge at 14,000 rpm for 3 minutes.
5. To wash with ethanol 70 %.
6. Centrifuge at 14,000 rpm for 2 minutes.
7. Invert the tube and allow to dry on absorbent paper for 15 minutes.
8. Resuspend the pellet in Rehydration Buffer.

**NOTE:** To process larger samples, see the attached table with the reagents scaled according to the sample size and proceed as described in the protocol applying the corresponding amounts

**Tabla de volúmenes de reactivos escalados a partir de 10 mg hasta 250 mg/  
Table of reagent volumes scaled from 10 mg up to 250 mg**

Volumen de Tejidos (mg) <i>Tissue Volume (mg)</i>	10-20	25-35	40-50	100	150	250
Tamaño del Tubo <i>Tube size</i>	1.5 ml	2.0 ml	15 ml	15 ml	15 ml	30 ml
Tampón de Extracción <i>Extraction Buffer</i>	0.40 ml	0.500 ml	0.80 ml	1.60 ml	2.40 ml	4.0 ml
Solución PVP / <i>PVP Solution</i>	0.20 ml	0.250 ml	0.40 ml	0.80 ml	1.20 ml	2.0 ml
Solución de Lisis / <i>Lysis Solution</i>	60 µl	75 µl	120 µl	240 µl	360 µl	600 µl
RNAsa / <i>RNase</i>	3 µl	4.5 µl	6 µl	12 µl	18 µl	30 µl
Tampón de Precipitación de Proteínas / <i>Protein Precipitation Buffer</i>	0.36 ml	0.450 ml	0.72 ml	1.45 ml	2.15 ml	3.6 ml
Isopropanol <i>Isopropanol</i>	0.60 ml	0.75 ml	1.35 ml	2.70 ml	4.0 ml	7.0 ml
Tampón de Hidratación / <i>Hydration Buffer</i>	100 µl	150-200 µl	200-300 µl	300-400 µl	400-500 µl	500-600 µl

#### 4.GUIA DE PROBLEMAS Y POSIBLES SOLUCIONES / TROUBLESHOOTING

Dada la gran variedad de muestras que se pueden tratar para extraer ADN genómico con este kit se hace difícil poder generalizar los posibles problemas y soluciones. Es por ello, que recomendamos ponerse en contacto con el servicio técnico de DURVIZ S.L para cualquier consulta adicional respecto a los protocolos de trabajo o problemas que puedan surgir durante el trabajo.

Given the wide variety of samples that can be treated to extract genomic DNA with this kit, it is difficult to generalize the possible problems and solutions. For this reason, we recommend contacting DURVIZ S.L. technical service for any additional questions regarding working protocols or problems that may arise during the work.

#### 5.ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD / STORAGE AND STABILITY

Todos los componentes son estables durante 12 meses desde la fecha de compra siendo almacenados y utilizados como se indica.

All components are stable for 12 months from date of purchase when stored and used as directed.

#### 6.SIMBOLOS / SYMBOLS

	Número de catálogo / <i>Catalogue number</i>		Fabricante / <i>Manufacturer</i>
	Limitación de temperatura / <i>Temperature limitation</i>		Uso exclusivo en investigación / <i>Research use only</i>
	Fecha de caducidad / <i>Expiration date</i>		Peligro para la salud / <i>Health hazard</i>
	Lote / <i>Lot</i>		Irritante, sensibilizante y nocivo / <i>Irritant, sensitizing and harmful</i>
	Contiene suficiente para n pruebas / <i>Contains enough for n tests</i>		Corrosivo / <i>Corrosive</i>

B65699985