

REAL SPIN PLANT DNA KIT

Ref. **RBMEGS13:** (para **50 EXTRACCIONES**)
 Ref. **RBMEGS14:** (para **250 EXTRACCIONES**)

(for **50 EXTRACTION**)
 (for **250 EXTRACTION**)

1.INTRODUCCIÓN

Este Kit proporciona un método eficiente y rápido para la extracción de **ADN genómico de plantas y hongos utilizando columnas MiniSpin.**

El kit incluye 2 soluciones de lisis optimizados, basados en los métodos establecidos de CTAB y de SDS. Las plantas son muy heterogéneas y contienen diferentes metabolitos como polifenoles, polisacáridos o componentes ácidos, REALPURE SPIN PLANTAS Y HONGOS Kit **suministra 2 diferentes procedimientos de lisis para el óptimo procesamiento de diferentes muestras de plantas.**

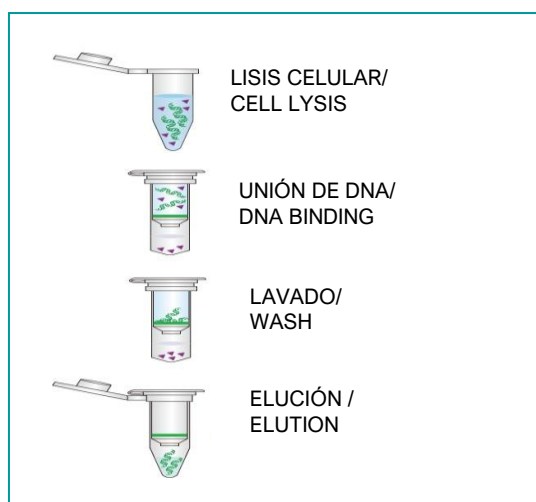
Además, también le suministramos **una PVP solution que une los polisacáridos y polifenoles.**

1.INTRODUCTION

This kit provides a method for an efficient and fast method for **genomic DNA extraction from tissues from plants and fungi using MiniSpin columns.**

The kit includes two optimized, alternative lysis solution based on the established CTAB and SDS lysis methods. As plants are very heterogenous and contain a lot of different metabolites like polyphenols, polysaccharides, or acidic components, REALPURE SPIN "Plants and Fungi" **offers two different lysis procedures for optimal processing of various samples.**

In addition we also **use a PVP solution that can bind the polysaccharides and polyphenols.**



Las muestras de plantas son primero homogenizadas y luego lisadas en una solución optimizado que contiene sales caotrópicas, agentes desnaturalizantes y detergentes. Se puede utilizar 2 Soluciones optimizados de lisis basados en los métodos establecidos de CTAB y SDS.

El lisado crudo es limpiado por centrifugación y el lisado resultante es mezclado después con el Lysis/Binding Solution y procesado a través de una Columns Spin DNA que contiene una membrana de sílica que permite la unión del ADN.

Los contaminantes e impurezas como sales, metabolitos y componentes celulares son eliminados mediante un paso de lavado con 2 Washing Solution diferentes.

El ADN genómico de elevada pureza es posteriormente eluido en un *Hydration Solution*. El ADN resultante podrá ser utilizado en diferentes aplicaciones.

Plant samples are first homogenized and then lysed in a highly optimized solution system, containing chaotropic salt, denaturing agent and detergents. A choice of two lysis solutions based on the established CTAB or SDS method are provided.

Crude lysate is cleared by centrifugation and the cleared lysate is then mixed with the Lysis/Binding Solution and processed through a Columns Spin DNA containing a silica membrane to which the plant genomic DNA binds. Contaminants and impurities such as salts, metabolites and cellular components are removed by simple Washing Solution steps with two different Soluciones.

High-quality purified plant genomic DNA is then eluted in a low *Hydration Solution*. The DNA is ready-to-use for a wide variety of applications.

Características:

- Tecnología de membrana de sílica que utiliza columns Spin DNA.
- Se puede elegir entre 2 Soluciones de lysis solution optimizados y PVP solution.
- Elevada pureza: $A_{260}/A_{280} = 1.6 - 1.9$.
- El DNA genómico de plantas queda aislado en 30 minutos

Aplicaciones:

- Extracción de ADN genómico de plantas a partir: Tejido de plantas o de hongos fresco, congelado o liofilizado. Células de plantas.
- El ADN aislado está listo para las siguientes aplicaciones: PCR, PCR cuantitativa y genotipado.

Features:

- Silica Membrane Technology using columns Spin DNA.
- Choice of two optimized lysis solution and PVP solution.
- High-purity DNA: typical A_{260}/A_{280} ratio 1.6 - 1.9.
- Plant genomic DNA isolated in 30 minutes

Applications:

- Isolation of genomic DNA from: fresh/frozen/lyophilized plant tissue and fungi.
- Isolated DNA is ready for downstream applications such as PCR, real-time PCR and genotyping.

2.COMONENTES DEL KIT / KIT COMPONENTS

Componente REAL	Ref.	Envase (50 Preps)	Envase (250 Preps)	T°
Neutralization Solution	E08	12 ml	60 ml	4°C
Proteinase K *	E40	20 mg	100 mg	-20°C
Washing solution *	EP08	10 ml	50 ml	RT
Plants and Fungi Extraction Solution	EPH1	50 ml	250 ml	RT
Lysis Solution	EPH2	12 ml	60 ml	RT
PVP Solution	EPH3	10 ml	50 ml	4°C
Lysis/Binding Solution	REA01	35 ml	175 ml	RT
Disinhibition Solution (GHCL 8M) *	REA03	16,5 ml	82,5 ml	RT
Hydration Solution	REA05	10 ml	50 ml	RT
CTAB Extraction Solution	RES03	60 ml	300 ml	RT
Columns Spin DNA	RSC03	50 unid.	250 unid.	RT
Collection Tubes	R30	100 unid.	500 unid.	RT

* Ver en el apartado de preparaciones preliminares como preparar estas soluciones. / See the section on preliminary preparations on how to prepare these solutions.

Equipos y reactivos necesarios y no provistos

- * Isopropanol.
- * Etanol 100 %.
- * Etanol 70%
- * Microcentrifuga.
- * Microtubos de 1.5 ml y 2.0 ml.
- * Homogenizador eléctrico de mano.
- * Baño incubador.
- * Vortex.
- * Nitrogeno líquido.

Equipment and reagents needed and not provided

- * Isopropanol
- * Ethanol 100%
- * Ethanol 70 %
- * Microcentrifuge
- * 1.5 ml and 2.0 ml microtubes
- * Electronic homogenization
- * Water bath
- * Vortex
- * Liquid nitrogen and pestle and mortar to grind tissues

3. PROTOCOLO GENERAL

3. GENERAL PROCEDURE

3.1 Preparaciones preliminares

- Disolver la *Proteinase K* en **1.0 ml** de agua libre de nucleasas (kit 50 extracciones) y en **5.0 ml** (kit 250 extracciones) y conservar a -20°C . Se recomienda realizar varias alícuotas para evitar demasiados ciclos de descongelado-congelado. A esta temperatura es estable durante 1 año.
- Verificar que el *Lysis/Binding Solution* y *CTAB Extraction Solution* no tienen precipitados debido a las bajas temperaturas. Si es necesario, disolver calentando a 37°C .
- Añadir el Etanol 100 % al *Disinhibition Solution* indicado en la etiqueta, unos **10 ml** (kit 50 extracciones) y unos **50 ml** (kit 250 extracciones). Mantener el envase bien cerrado para evitar la evaporación del etanol.
- Añadir el Etanol 100 % al *Washing Solution* indicado en la etiqueta, unos **40 ml** (kit 50 extracciones) y unos **200 ml** (kit 250 extracciones). Mantener el envase bien cerrado para evitar la evaporación del etanol.
- Pre-calentar el *Hydration Solution* a 70°C .
- Tanto el *Lysis/Binding Solution* como el *Disinhibition Solution* contiene sales irritantes, por esta razón recomendamos el uso de guantes y gafas.

3.2 Consideraciones Preeleminares

- Puede ser necesario reducir el tamaño inicial de muestra dependiendo de la especie, estado, tejido o tamaño del genoma.
- La primera vez que se trabaja con nuestro kit, se RECOMIENDA el uso de los 2 métodos de trabajo (A y B) para establecer con qué método obtenemos mejores resultados.

METODO A. Basado en el Tampón de Lisis SDS

1. Pesar **180-200 mg de muestra** en un microtubo de 2.0 ml y añadir **1000 μl de *Plants and Fungi E.S* + 200 μl *PVP Solution***. Agitar vigorosamente con vortex Homogenizar con un homogenizador eléctrico de mano durante 20 segundos

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 E.S* + *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.

3.1 Preliminary preparations

- Dissolve *Proteinase K* in **1.0 ml** of nuclease-free water (kit 50 extractions) and in **5.0 ml** (kit 250 extractions) and store at -20°C . It is recommended to make several aliquots to avoid too many thaw-freeze cycles. At this temperature it is stable for 1 year.
- Verify that the *Lysis/Binding Solution* and *CTAB Extraction Solution* do not have precipitates due to low temperatures. If necessary, dissolve by heating to 37°C .
- Add 100% Ethanol to the *Disinhibition Solution* indicated on the label, about **10 ml** (kit 50 extractions) and about **50 ml** (kit 250 extractions). Keep the container tightly closed to avoid evaporation of the ethanol.
- Add 100% Ethanol to the *Washing Solution* indicated on the label, about **40 ml** (kit 50 extractions) and about **200 ml** (kit 250 extractions). Keep the container tightly closed to avoid evaporation of the ethanol.
- Pre-heat the *Hydration Solution* to 70°C .
- Both the *Lysis/Binding Solution* and the *Disinhibition Solution* contain irritating salts, for this reason we recommend the use of gloves and goggles.

3.2 Preliminary Considerations

- It can be necessary to reduce the starting quantity of sample depending on the specie, state, tissue preparation or genome size.
- The first time that one works with a sample of plant tissue, we recommend to use the 2 isoaltion methods (A and B) for establishing which is the method that works better with this certain sample.

METHOD A. Based on Lysis Solution SDS

1. Weigh **180-200 mg of plant tissue**. Add **1000 μl of *Plants and Fungi E.S* + 200 μl *PVP solution*** and place them in 2.0 ml microtube. Vortex vigorously. Homogenize with an electric homogenizer for 20 seconds.

For an effective DNA isolation from **plant tissues**, it is recommended to grind the sample a fine powder with liquid nitrogen. Soft and not fibrous tissues, like young leaves, flowers, etc. can be homogenized in an electrical homogenizer but always when you have fresh samples, dissect the sample in small pieces, add ***Plants and Fungi E.S* + *PVP Solutio*** and homogenize. For hard or fibrous tissues, like seeds, steams, etc. It's recommended to use liquid Ni.

In case of **fungi**, collect the micellium from the culture by filtration, wash 3 times with deionized sterile water or PBS to remove the culture medium. Grind the sample a fine powder with liquid Ni, store at -80°C or process the sample.

2. **Añadir 200 µl de Lysis Solution. Incubar a 80°C durante 30-45 minutos.** Si es posible, se recomienda agitar con vortex o invertir el tubo periódicamente durante la incubación. Si el **Lysis Solution** contiene precipitados debido a las bajas temperaturas, será necesario calentar a 37°C.
3. **Centrifugar a 14.000 rpm durante 5 minutos.**
4. Pasar el sobrenadante a un nuevo microtubo que contenga **200 µl de Neutralization Solution. Incubar a -20°C durante 3 minutos.**
5. **Centrifugar a 14.000 rpm durante 5 minutos.** Aparecerá un pellet y en la superficie una capa de grasa, introducir la punta de pipeta atravesando esta capa superficial, intentando recoger sólo **600-700 µl** del sobrenadante que es el líquido transparente con color (evitar coger pellet y capa superficial).
6. Pasar el sobrenadante (**entre 600-700 µl**) a un nuevo microtubo.
7. Añadir **600-700 µl del Lysis/Binding Solution + 20 µl Proteinase K** a 600-700 µl del sobrenadante. Mezclar bien. **Incubar a 70°C durante 10 minutos.**
8. Añadir **300 µl de Isopropanol.** Mezclar bien.
9. Añadir **750 µl** en el reservorio de la **Column Spin DNA** con su **Collection Tubes.** **Centrifugar a 12.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el **Collection Tubes.**
10. Repetir el punto N.9 con los **750 µl restantes.** Si quedará más cantidad se puede hacer pasar una tercera vez por la columna.
11. Colocar la **Column Spin DNA** en un nuevo **Collection Tubes** y añadir al reservorio **500 µl de Disinhibition Solution.** **Centrifugar a 12.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el líquido.
12. **Añadir 500 µl de Washing Solution** en el reservorio de la **Column Spin DNA.** **Centrifugar a 12.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el líquido.
13. 2º Lavado. **Añadir 500 µl de Washing Solution** en el reservorio de la **Column Spin DNA.** **Centrifugar a 12.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el líquido.
14. **Centrifugar a máxima velocidad durante 2 minutos para eliminar el etanol residual.**
15. Eliminar el **Collection Tubes** e insertar la **Column Spin DNA** en un microtubo de 1.5 ml. **Añadir 50µl de Hydration Solution** (precalentado a 70°C) en el reservorio de la **Column Spin DNA.** **Incubar 1 minuto.**
16. **Centrifugar a máxima velocidad durante 60 segundos.**
17. Añadir de nuevo otros **50µl de Hydration Solution** (precalentado a 70°C) en el reservorio de la **Column Spin DNA.** **Incubar 1 minuto.**
18. **Centrifugar a máxima velocidad durante 60 segundos.** El microtubo contiene ahora el ADN.

METODO B. Basado en el Tampón de Lisis CTAB

1. Pesar **180-200 mg de muestra** en un microtubo de 2.0 ml y añadir **1.20 ml de CTAB Extraction Solution.** Agitar con vortex vigorosamente.
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 juvenes, 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 **CTAB Extraction Solution** y homogeneizar. Para tejidos duros o fibrosos, como tallos, semillas, etc se recomienda el uso de Ni líquido.

2. Add **200 µl Lysis Solution.** **Incubate at 80°C for 30-45 minutes.** If possible, shake with vortex or invert during the incubation. Verify that the **Lysis Solution** do not have precipitates due to the low temperatures. If necessary, dissolve heating at 37°C.
3. **Centrifuge at 14.000 rpm for 5 minutes.**
4. Pour the supernatant to a new 2.0 ml microtube with **200 µl Neutralization Solution.** **Incubate at -20°C for 3 minutes.**
5. **Centrifuge at 14.000 rpm for 5 minutes.** A pellet will appear and in the surface a layer of fat, introduce the pipette tip crossing this superficial layer, only trying to pick up **600-700 µ l of supernatant** that it is the transparent liquid with color (to avoid to catch pellet and superficial layer) and to place in a 2.0 ml microtube.
6. Pass the supernatant (**between 600-700 µl**) to a new microtube.
7. Add **600 µl-700 Lysis/Binding Solution + 20 µl Proteinase K** to 600-700 µl of supernatant. Mix well. **Incubate at 70°C for 10 minutes.**
8. Add **300 µl of Isopropanol.** Mix well.
9. Pipette **750 µl** the lysate into reservoir of a combined **Column Spin DNA – Collection Tubes** assembly. **Centrifuge at 12.000 rpm for 60 seconds.** Remove the **Collection Tubes.**
10. Repeat step N.8 with the **750 µl** remaining. If there is more volume it can be passed through the column a third time.
11. Place the **Column Spin DNA** in a new **Collection Tubes** and add **500 µl of Disinhibition Solution** to the reservoir. **Centrifuge at 12.000 rpm for 60 seconds.** Remove the liquid.
12. **Add 500 µl of Washing Solution** into reservoir of **Column Spin DNA.** **Centrifuge at 12.000 rpm for 60 seconds.** Remove the liquid.
13. 2º Wash. **Add 500 µl of Washing Solution** into reservoir of **Column Spin DNA.** **Centrifuge at 12.000 rpm for 60 seconds.** Remove the liquid.
14. **Centrifuge at maximum speed for 2 minutes to remove the residual ethanol.**
15. Remove the **Collection Tubes** and insert the **Column Spin DNA** in a 1.5 ml microtube. **Add 50µl Hydration Solution** (preheated at 70°C) into reservoir of **Column Spin DNA.** **Incubate 1 minute.**
16. **Centrifuge at maximum speed for 60 seconds.**
17. **Add another 50µl of Hydration Solution** (preheated at 70°C) into reservoir of **Column Spin DNA.** **Incubate 1 minute.**
18. **Centrifuge at maximum speed for 60 seconds.** The microtube contains now genomic DNA.

METHOD B. Based on Lysis Buffer CTAB

1. Weight **180-200 mg of plant tissue.** **Add 1.20ml of CTAB Extraction Solution** and place them in 2.0 ml microtube. Shake with vortex vigorously.
*For an effective DNA isolation from **plant tissues**, it is recommended to grind the sample a fine powder with liquid nitrogen. Soft and not fibrous tissues, like young leaves, flowers, etc. can be homogenized in an electrical homogenizer but always when you have fresh samples, dissect the sample in small pieces, add the **CTAB Extraction Solution** and homogenize. For hard or fibrous tissues, like seeds, steams, etc. It's recommended to use liquid Ni.*

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.

2. **Incubar a 80°C durante 30-45 minutos** Si es posible agitar con vortex o invertir durante incubación.
3. **Centrifugar a 14.000 rpm durante 5 minutos.** Aparecerá un pellet y en la superficie una capa de grasa, introducir la punta de pipeta atravesando esta capa superficial, intentando recoger sólo **700 μl de sobrenadante** que es el líquido transparente con color (evitar coger pellet y capa superficial) y colocar en un microtubo de 2.0 ml.
4. Añadir **700 μl del Lysis/ Binding Solution + 20 μl Proteinase K** a los **700 μl de sobrenadante**. Mezclar bien. **Incubar a 70°C durante 10 minutos.**
5. Añadir **300 μl de Isopropanol**. Mezclar bien.
6. Añadir **750 μl** en el reservorio de la **Column Spin DNA**. con su **Collection tube**. **Centrifugar a 12.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el **Collection tube**.
7. Repetir el punto N.6 con los **750 μl restantes**. Si quedará más cantidad se puede hacer pasar una tercera vez por la columna.
8. Colocar la **Column Spin DNA** en un nuevo **Collection tube** y añadir al reservorio **500 μl de Dishinhibition Solution**. **Centrifugar a 12.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el líquido.
9. **Añadir 500 μl de Washing Solution** en el reservorio de la **Column Spin DNA**. **Centrifugar a 12.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el líquido.
10. 2º Lavado. **Añadir 500 μl de Washing Solution** en el reservorio de la **Column Spin DNA**. **Centrifugar a 12.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el líquido.
11. **Centrifugar a máxima velocidad durante 2 minutos para eliminar el etanol residual.**
12. Eliminar el **Collection tube** e insertar la **Column Spin DNA** en un microtubo de 1.5 ml. **Añadir 50 μl de Hydration Solution** (precalentado a 70°C) en el reservorio de la **Column Spin DNA**. **Incubar 1 minuto.**
13. **Centrifugar a máxima velocidad durante 60 segundos.**
14. Añadir de nuevo otros **50 μl de Hydration Solution** (precalentado a 70°C) en el reservorio de la **Column Spin DNA**. **Incubar 1 minuto.**
15. **Centrifugar a máxima velocidad durante 60 segundos.** El microtubo contiene ahora el ADN

In case of **fungi**, collect the micellium from the culture by filtration, wash 3 times with deionized sterile water or PBS to remove the culture medium. Grind the sample a fine powder with liquid nitrogen, store at -80°C or process the sample.

2. **Incubate at 80°C for 30-45 minutes.** If possible, shake with vortex or invert during the incubation.
3. **Centrifuge at 14.000 rpm for 5 minutes.** A pellet will appear and in the surface a layer of fat, to introduce the pipette tip crossing this superficial layer of fat, only trying to pick up **700 μl of supernatant** that it is the transparent liquid with color (to avoid to catch pellet and superficial layer) and to place in a 2.0 ml microtube.
4. Add **700 Lysis/ Binding Solution + 20 μl Proteinase K** to **700 μl of supernatant**. Mix well. **Incubate at 70°C for 10 minutes.**
5. Add **300 μl of Isopropanol**. Mix well.
6. Pipette **750 μl** the lysate into reservoir of a combined **Column Spin DNA**. –**Collection tube** ssembly. **Centrifuge at 12.000 rpm for 60 seconds.** Remove the **Collection tube**.
7. Repeat step N.6 with the **750 μl** remaining. If there were more quantity it can be passed through a column for third time
8. Place the **Column Spin DNA** in a new **Collection tube** and add **500 μl of Dishinhibition Solution** to the reservoir. **Centrifuge at 12.000 rpm for 60 seconds.** Remove the liquid.
9. **Add 500 μl of Washing Solution** into reservoir of **Column Spin DNA**. **Centrifuge at 12.000 rpm for 60 seconds.** Remove the liquid.
10. 2º Wash. **Add 500 μl of Wash Buffer** into reservoir of **Column Spin DNA**. **Centrifuge at 12.000 rpm for 60 seconds.** Remove the liquid.
11. **Centrifuge at maximum speed for 2 minutes to remove the residual ethanol.**
12. Remove the **Collection tube** and insert the **Column Spin DNA** in a 1.5 ml microtube. **Add 50 μl of Hydration Solution** (preheated at 70°C) into reservoir of MicroSpin column. **Incubate 1 minute.**
13. **Centrifuge at maximum speed for 60 seconds.**
14. **Add another 50 μl of Hydration Solution** (preheated at 70°C) into reservoir of **Column Spin DNA**. **Incubate 1 minute.**
15. **Centrifuge at maximum speed for 60 seconds.** The microtube contains now genomic DNA

4. ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD /

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

ATENCIÓN: El **Lysis/Binding Solution** y el **Disinhibition Solution** contiene guanidine hydrochloride que es irritante, utilizar guantes y gafas.

STORAGE AND STABILITY

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









CAUTION: **Lysis/Binding Solution** and **Disinhibition Solution** contain guanidine hydrochloride which is irritating, use gloves and goggles.

5. GUIA DE PROBLEMAS Y POSIBLES SOLUCIONES / TROUBLESHOOTING

Para cualquier duda o consulta adicional sobre el protocolo pónganse en contacto con el servicio técnico de DURVIZ S.L en durviz@durviz.com.

For any further questions or doubts about the protocol, please contact DURVIZ S.L. technical service at durviz@durviz.com.

6.SIMBOLOS / SYMBOLS

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



B65699985