

REAL DNA/RNA PURIFICATION KIT

Ref. RBMER16: (para 50 EXTRACCIONES)

(for 50 EXTRATION)

1.INTRODUCCIÓN

1.1 Descripción del producto

REAL DNA/RNA PURIFICATION Kit provee un método rápido para la extracción y purificación simultánea de **ADN genómico y ARN total** a partir de una única muestra de células en cultivo y pequeñas muestras de tejidos, sangre, bacterias, levaduras, hongos y plantas.

El proceso implica primero la lisis de las células o tejido de interés en un Tampón de guanidina isotiocianato que rápidamente inactiva las RNasas y DNasas para asegurar una extracción de ADN y ARN intacto. El lisado se pasa a través de una DNA Spin columna, esta columna permite la unión selectiva del ADN genómico. La columna es lavada y el ADN es posteriormente eluido.

Se añade etanol al líquido que ha pasado a través de la DNA Spin columna para crear las condiciones favorables para que el ARN se una a la RNA Spin columna, y la muestra es pasada por la RNA Spin columna, donde el ARN total se une a la membrana y los contaminantes son eliminados mediante lavados y luego el ARN total es eluido con agua libre de nucleasas. El kit permite purificar todas las especies de ARN, desde el ARN ribosomal y ARNm hasta el microARN (miARN) y el ARN de interferencia (ARNi).

El ARN purificado puede ser utilizado en diversas aplicaciones incluidas real time PCR, RT-PCR, Northern blotting, RNase protection and primer extension and expression array assays. El ADN genómico es de alta calidad y puede ser utilizado en reacciones de PCR, secuenciación, Southern blotting and SNP análisis.

1.INTRODUCTION

1.1 Product Description

REAL DNA/RNA PURIFICATION Kit provides a rapid method for the simultaneous extraction and purification of genomic DNA and total RNA from a single sample of cultured cells and small samples of tissues, blood, bacteria, yeast, fungi and plants.

The process first involves lysis of the cells or tissue of interest in a guanidine isothiocyanate buffer that rapidly inactivates RNases and DNases to ensure intact DNA and RNA extraction. The lysate is passed through a DNA Spin column, this column allows selective binding of genomic DNA. The column is washed and the DNA is subsequently eluted.

Ethanol is added to the liquid that has passed through the DNA Spin column to create favorable conditions for RNA to bind to the RNA Spin column, and the sample is passed through the RNA Spin column, where the total RNA binds to the membrane and contaminants are removed by washing and then the total RNA is eluted with nuclease-free water. The kit allows purification of all RNA species, from ribosomal RNA and mRNA to microRNA (miRNA) and interference RNA (RNAi).

Purified RNA can be used in a variety of applications including real time PCR, RT-PCR, Northern blotting, RNase protection and primer extension and expression array assays. The genomic DNA is of high quality and can be used in PCR reactions, sequencing, Southern blotting and SNP analysis.

2.COMPONENTES DEL KIT / KIT COMPONENTS

Componentes/ <i>Components</i>	REF.	Ref. RBMER16 (50 Extrac.)	Tª
Tampón de Lisis/ <i>CTAB Extraction Buffer</i>		25 ml	RT
Tampón de Desinhibición*/ <i>Desinhibition Buffer*</i>		18 ml	RT
Tampón de Lavado DNA* / <i>DNA Wash Buffer*</i>		10 ml	RT
Tampón de Lavado RNA* / <i>RNA Wash Buffer*</i>		22 ml	RT
Tampón Elución DNA <i>DNA Elution Buffer</i>		6 ml	RT
Tampón Elución RNA <i>RNA Elution Buffer</i>		6 ml	RT
Dna Spin Columnas/ <i>Dna Spin Columns</i>		50 unid	RT
Rna Spin Columnas/ <i>Rna Spin Columns</i>		50 unid	RT
Tubos de recogida / <i>Collection Tubes</i>		200 unid	RT

(*) Estas soluciones deben prepararse como se indica en la sección Preparaciones preliminares del protocolo.

(*) These solutions must be prepared as indicated in the Preliminary Preparations section of the protocol.

Equipos y reactivos necesarios y no provistos

- * Etanol 100 %.
- * Etanol 70%.
- * Microcentrifuga.
- * Microtubos de 1.5 ml y 2.0 ml.
- * Homogenizadores generales para homogenizar tejidos animales y de plantas.
- * Nitrogeno líquido.
- * β-mercaptoetanol.

Equipment and reagents needed and not provided

- * Ethanol 100%
- * Ethanol 70%.
- * Microcentrifuge
- * 1.5 ml and 2.0 ml microtubes
- * General homogenizers for homogenizing animal and plant tissues.
- * Liquid nitrogen.
- * β-mercaptoethanol.

3. PROTOCOLO GENERAL

3. GENERAL PROCEDURE

3.1 Preparaciones preliminares

- Añadir Etanol 100 % al Tampón de Lavado RNA indicado en la etiqueta, unos **50 ml** con lo que el volumen final será de 72 ml. Mantener el envase bien cerrado para evitar la evaporación del etanol.
- Añadir **10 ml de Etanol 100 %** al Tampón de Desinhibición. Mantener el envase bien cerrado para evitar la evaporación del etanol.
- Añadir **40 ml de Etanol 100 %** al Tampón de Lavado DNA. Mantener el envase bien cerrado para evitar la evaporación del etanol.
- Precalentar el Tampón de Elución DNA a 70°C.
- Asegurarse que todas las soluciones se encuentran a temperatura ambiente.
- **OPCIONAL:** El uso de β-mercaptoetanol en la lisis es altamente recomendado para tejidos animales, particularmente en aquellos que se sabe que tienen un alto contenido en RNAsas (ejem. páncreas), al igual que en tejidos de plantas. También se recomienda para aquellos usuarios que quieren aislar RNA para aplicaciones muy sensibles o enriquecimiento de microRNA. Preparar una cantidad apropiada de Tampón de Lisis RNA añadiendo 10 µl de β-mercaptoetanol por 1 ml de Tampón de Lisis RNA. Alternativamente, la Solución de Lisis RNA puede ser utilizada tal y como es suministrada.
- **NO utilizar más muestra que la indicada en la DNA Spin column, ya que esto llevará a copurificar ADN con ARN. Tampoco sobrecargar la RNA Spin column ya que esto reducirá el rendimiento y pureza del ARN total obtenido. Algunos tejidos o muestras pueden contener cantidades altas de ADN lo que sobrecargará la DNA Spin column, para estas muestras, se recomienda realizar una digestión de ADNasa si el eluido de ARN total va a ser utilizado posteriormente en aplicaciones sensibles a la presencia de pequeñas cantidades de ADN.**

3.2 Protocolo de extracción de ADN/ARN a partir de células en cultivo

Nota: La máxima cantidad recomendada de células es 1 x 10⁶. Pellets de células pueden ser conservados a -70°C para un uso posterior (determinar el número de células antes de congelar). Los pellets congelados no deberán ser conservados más de 2 semanas para asegurar que la integridad del ARN no se verá comprometida. El Tampón de lisis RNA se añadirá directamente sobre los pellets congelados sin dejar que alcancen la temperatura ambiente.

3.1 Preliminary preparations

- Add 100 % Ethanol to the RNA Wash Buffer indicated on the label, about **50 ml** so that the final volume will be 72 ml. Keep the container tightly closed to prevent evaporation of the ethanol.
- Add **10 ml of 100% Ethanol** to the Disinhibition Buffer. Keep the container tightly closed to avoid evaporation of the ethanol.
- Add **40 ml of 100 % Ethanol** to the DNA Wash Buffer. Keep the container tightly closed to avoid evaporation of ethanol.
- Preheat the DNA Elution Buffer to 70°C.
- Ensure that all solutions are at room temperature.
- **OPTIONAL:** The use of β-mercaptoethanol in lysis is highly recommended for animal tissues, particularly those known to have a high RNase content (e.g. pancreas), as well as plant tissues. It is also recommended for users who want to isolate RNA for very sensitive applications or microRNA enrichment. Prepare an appropriate amount of RNA Lysis Buffer by adding 10 µl of β-mercaptoethanol per 1 ml of RNA Lysis Buffer. Alternatively, RNA Lysis Solution can be used as supplied.
- **DO NOT use more sample than indicated on the DNA Spin column, as this will lead to copurify DNA with RNA. Also do not overload the RNA Spin column as this will reduce the yield and purity of the total RNA obtained. Some tissues or samples may contain high amounts of DNA which will overload the DNA Spin column, for these samples, it is recommended to perform a DNAase digestion if the total RNA eluate is to be used later in applications sensitive to the presence of small amounts of DNA.**

3.2 Protocol for DNA/RNA extraction from cells in culture

Note: The maximum recommended number of cells is 1 x 10⁶. Cell pellets can be stored at -70°C for later use (determine the number of cells before freezing). Frozen pellets should not be stored for more than 2 weeks to ensure that the integrity of the RNA will not be compromised. RNA Lysis Buffer should be added directly onto the frozen pellets without allowing them to reach room temperature.

A) ARN total de células creciendo en monocapa

1. Aspirar el medio y lavar las células con una cantidad apropiada de PBS. Aspirar el PBS.
2. Añadir directamente **400µl de Tampón de Lisis RNA** directamente a la placa de cultivo.
3. Lisar las células, tapar la placa y agitar el tampón alrededor de la superficie de la placa durante 5 minutos.
4. Pasar el lisado a un microtubo. **IMPORTANTE: Anotar la cantidad de lisado.**
5. Añadir un volumen de etanol 100% que es equivalente a **(15 µl de etanol 100 % es añadido cada 100 µl de lisado)**. Mezcla por vortex 10 segundos.
6. Ensamblar una **DNA Spin column** con un tubo de recogida que se suministra.
7. Añadir el lisado + etanol a la columna. **Centrifugar durante 1 minuto.**
8. **Retener el líquido que ha pasado a través de la columna y que se encuentra en el tubo de recogida y que contiene el ARN total.** Pasar el líquido retenido a un microtubo nuevo de 1.5 ml (no suministrado con el kit).
9. Ensamblar la DNA Spin column con un tubo de recogida y conservar a temperatura ambiente (15-25°C) o a 4°C para purificación del ADN más tarde.
10. Añadir **450 µl de Etanol 95-100% al líquido retenido que contiene el ARN total.** Mezcla por vortex 10 segundos. Después de la adición del etanol se podrá apreciar un precipitado, **asegurarse** de que todo el precipitado se añade a la RNA Spin columna.
11. Ensamblar una **RNA Spin column** con un tubo de recogida que se suministra.
12. Aplicar la mitad del líquido + etanol en la RNA Spin column y **centrifugar durante 1 minuto.** Descartar el líquido y reensamblar la columna con su tubo de recogida.
13. Repetir el punto 12 hasta completar la captura de todo el ARN total.
14. Añadir **400 µl de Tampón de Lavado RNA** a la columna y centrifugar durante 1 minuto. Asegurarse que todo el tampón de lavado ha pasado a través de la columna, sino fuera así centrifugar otro minuto adicional.
15. Eliminar el líquido y ensamblar la columna con el tubo de recogida. Añadir **400 µl de Tampón de Lavado RNA** a la columna y centrifugar durante 1 minuto.
16. Realizar un tercer lavado. Añadir **400 µl de Tampón de Lavado RNA** a la columna y centrifugar durante 1 minuto. Eliminar el líquido del tubo de recogida y centrifugar durante 2 minutos adicionales para eliminar todo el etanol residual. Eliminar el tubo de recogida.
17. Colocar la columna en un microtubo nuevo de 1.5 ml (no suministrado con el kit) para eluir el ARN total.
18. Añadir **50 -100 µl de Tampón de Elución RNA** a la columna.
19. Centrifugar durante 2 minutos a **200x g (aprox. 2.000 rpm)**, seguido de 1 minuto a **14.000 x g (aprox. 14.000 rpm)**. Ver la cantidad de eluido de la columna, sino se han eluido los 50 µl centrifugar por 1 minuto adicional a 14.000 x g (aprox. 14.000 rpm).
20. El ARN purificado puede ser conservado a -20°C durante algunos días. Se recomienda que las muestras se conserven a -70°C para almacenamientos largos.

A) Total RNA from cells growing as a monolayer

1. Aspirate the medium and wash the cells with an appropriate amount of PBS. Aspirate the PBS.
2. Directly **add 400µl of RNA Lysis Buffer** directly to the culture plate.
3. Lyse the cells, cover the plate and shake the buffer around the surface of the plate for 5 minutes.
4. Transfer the lysate to a microtube. **IMPORTANT: Note the amount of lysate.**
5. Add a volume of 100% ethanol that is equivalent to **(15 µl of 100% ethanol is added per 100 µl of lysate)**. Vortex mix for 10 seconds.
6. Assemble a **DNA Spin column** with a collection tube provided.
7. Add the lysate + ethanol to the column. **Centrifuge for 1 minute.**
8. **Retain the liquid that has passed through the column and is in the collection tube containing total RNA.** Transfer the retained liquid to a new 1.5 ml microtube (not supplied with the kit).
9. Assemble the DNA Spin column with a collection tube and store at room temperature (15-25°C) or at 4°C for later DNA purification.
10. **Add 450 µl of 95-100% Ethanol to the retained liquid containing total RNA.** Vortex mix for 10 seconds. After the addition of ethanol, a precipitate will be visible, make sure that all of the precipitate is added to the RNA Spin column.
11. Assemble an **RNA Spin column** with a collection tube provided.
12. Apply half of the liquid + ethanol to the RNA Spin column and **centrifuge for 1 minute.** Discard the liquid and reassemble the column with its collection tube.
13. Repeat 12 until complete capture of all total RNA.
14. Add **400 µl of RNA Wash Buffer** to the column and centrifuge for 1 minute. Make sure that all wash buffer has passed through the column, otherwise centrifuge for an additional minute.
15. Remove the liquid and assemble the column with the collection tube. Add **400 µl of RNA Wash Buffer** to the column and centrifuge for 1 minute.
16. Perform a third wash. Add **400 µl of RNA Wash Buffer** to the column and centrifuge for 1 minute. Remove the liquid from the collection tube and centrifuge for an additional 2 minutes to remove all residual ethanol. Discard the collection tube.
17. Place the column in a new 1.5 ml microtube (not supplied with the kit) to elute total RNA.
18. Add **50 -100 µl of RNA Elution Buffer** to the column.
19. Centrifuge for 2 minutes at **200x g (approx. 2,000 rpm)**, followed by 1 minute at **14,000 x g (approx. 14,000 rpm)**. Check the amount of eluate on the column, if the 50 µL have not been eluted, centrifuge for an additional 1 minute at 14,000 x g (approx. 14,000 rpm).
20. Purified RNA can be stored at -20°C for a few days. It is recommended that samples be stored at -70°C for long term storage.

Extracción de ADN genómico de células creciendo en monocapa

1. Añadir **500 µl de Tampón de Desinhibición a la DNA Spin columna. Centrifugar durante 1 minuto.** Eliminar el líquido.
2. **Añadir 500 µl de Tampón de Lavado DNA** en el reservorio de la DNA Spin columna. **Centrifugar durante 1 minuto.** Eliminar el líquido.
3. 2º Lavado. **Añadir 500 µl de Tampón de Lavado DNA** en el reservorio de la DNA Spin columna. **Centrifugar durante 1 minuto.** Eliminar el líquido
4. **Centrifugar a máxima velocidad durante 2 minutos para eliminar todo el etanol residual.**
5. Eliminar el tubo de recolección y insertar la DNA Spin columna en un microtubo de 1.5 ml. **Añadir 50-100 µl Tampón de Elución DNA** (precalentado a 70°C) en el reservorio de la DNA Spin columna. Incubar durante 1 minuto.
6. **Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.** El microtubo contiene ahora el ADN genómico.

B) Extracción de ARN total de células creciendo en suspensión

1. Transferir la suspensión celular a un tubo libre de RNAsas (no suministrado) y centrifugar a no más de **200x g (aprox. 2.000 rpm)** durante 10 minutos para pellet las células.
2. Cuidadosamente eliminar el sobrenadante.
3. Añadir **400 µl de Tampón de Lisis RNA** al pellet. Lisar las células mediante micropipeta arriba-abajo o vortex. Asegurarse que todo el pellet está disuelto antes de proceder con el siguiente paso.
4. Pasar el lisado a un microtubo. **IMPORTANTE: Anotar la cantidad de lisado.**
5. Añadir un volumen de etanol 100% que es equivalente a **(15 µl de etanol 100 % es añadido cada 100 µl de lisado)**. Mezcla por vortex 10 segundos.
6. Ensamblar una **DNA Spin columna** con un tubo de recogida que se suministra.
7. Añadir el lisado + etanol a la columna. **Centrifugar durante 1 minuto.**
8. **Retener el líquido que ha pasado a través de la columna y que se encuentra en el tubo de recogida y que contiene el ARN total.** Pasar el líquido retenido a un microtubo nuevo de 1.5 ml (no suministrado con el kit).
9. Ensamblar la DNA Spin columna con un tubo de recogida y conservar a temperatura ambiente (15-25°C) o a 4°C para purificación del ADN más tarde.
10. **Añadir 450 µl de Etanol 95-100% al líquido retenido que contiene el ARN total.** Mezcla por vortex 10 segundos. Después de la adición del etanol se podrá apreciar un precipitado, **asegurarse** de que todo el precipitado se añade a la RNA Spin columna.
11. Ensamblar una **RNA Spin columna** con un tubo de recogida que se suministra.
12. Aplicar la mitad del líquido + etanol en la RNA Spin columna y **centrifugar durante 1 minuto.** Descartar el líquido y reensamblar la columna con su tubo de recogida.
13. Repetir el punto 12 hasta completar la captura de todo el ARN total.
14. Añadir **400 µl de Tampón de Lavado RNA** a la columna y centrifugar durante 1 minuto. Asegurarse que todo el tampón de lavado ha pasado a través de la columna, sino fuera así centrifugar otro minuto adicional.

Extraction of genomic DNA from cells growing in a monolayer.

1. Add **500 µl of Deinhibition Buffer to the DNA Spin column. Centrifuge for 1 minute.** Remove the liquid.
2. **Add 500 µl of DNA Wash Buffer** to the reservoir of the DNA Spin column. **Centrifuge for 1 minute.** Remove liquid.
3. 2nd Wash. **Add 500 µl of DNA Wash Buffer** to the reservoir of the DNA Spin column. **Centrifuge for 1 minute.** Remove the liquid.
4. **Centrifuge at maximum speed for 2 minutes to remove all residual ethanol.**
5. Remove the collection tube and insert the DNA Spin column into a 1.5 ml microtube. **Add 50-100 µl DNA Elution Buffer** (pre-warmed to 70°C) to the reservoir of the DNA Spin column. Incubate for 1 minute.
6. **Centrifuge at maximum speed for 1 minute.** The microtube now contains the genomic DNA.

B) Extraction of total RNA from cells growing in suspension

1. Transfer the cell suspension to an RNase-free tube (not supplied) and centrifuge at no more than **200x g (approx. 2,000 rpm)** for 10 min to pellet the cells.
2. Carefully remove the supernatant.
3. Add **400 µl of RNA Lysis Buffer** to the pellet. Lyse the cells by micropipetting up-down or vortexing. Ensure that the entire pellet is dissolved before proceeding to the next step.
4. Transfer the lysate to a microtube. **IMPORTANT: Note the amount of lysate.**
5. Add a volume of 100% ethanol that is equivalent to **(15 µl of 100% ethanol is added per 100 µl of lysate)**. Vortex mix for 10 seconds.
6. Assemble a **DNA Spin column** with a collection tube provided.
7. Add the lysate + ethanol to the column. **Centrifuge for 1 minute.**
8. **Retain the liquid that has passed through the column and is in the collection tube containing total RNA.** Transfer the retained liquid to a new 1.5 ml microtube (not supplied with the kit).
9. Assemble the DNA Spin column with a collection tube and store at room temperature (15-25°C) or at 4°C for later DNA purification.
10. **Add 450 µl of 95-100% Ethanol to the retained liquid containing total RNA.** Vortex mix for 10 seconds. After the addition of ethanol, a precipitate will be visible, make sure that all of the precipitate is added to the RNA Spin column.
11. Assemble an **RNA Spin column** with a collection tube provided.
12. Apply half of the liquid + ethanol to the RNA Spin column and **centrifuge for 1 minute.** Discard the liquid and reassemble the column with its collection tube.
13. Repeat 12 until complete capture of all total RNA.
14. Add **400 µl of RNA Wash Buffer** to the column and centrifuge for 1 minute. Make sure that all the wash buffer has passed through the column, otherwise centrifuge for an additional minute.

15. Eliminar el líquido y ensamblar la columna con el tubo de recogida. Añadir **400 µl de Tampón de Lavado RNA** a la columna y centrifugar durante 1 minuto.
16. Realizar un tercer lavado. Añadir **400 µl de Tampón de Lavado RNA** a la columna y centrifugar durante 1 minuto. Eliminar el líquido del tubo de recogida y centrifugar durante 2 minutos adicionales para eliminar todo el etanol residual. Eliminar el tubo de recogida.
17. Colocar la columna en un microtubo nuevo de 1.5 ml (no suministrado con el kit) para eluir el ARN total.
18. Añadir **50 -100 µl de Tampón de Elución RNA** a la columna.
19. Centrifugar durante 2 minutos a **200x g (aprox. 2.000 rpm)**, seguido de 1 minuto a **14.000 x g (aprox. 14.000 rpm)**. Ver la cantidad de eluido de la columna, sino se han eluido los 50 µl centrifugar por 1 minuto adicional a 14.000 x g (aprox. 14.000 rpm).
20. El ARN purificado puede ser conservado a -20°C durante algunos días. Se recomienda que las muestras se conserven a -70°C para almacenamientos largos.

Extracción de ADN genómico de células creciendo en solución

1. Añadir **500 µl de Tampón de Desinhibición a la DNA Spin columna. Centrifugar durante 1 minuto.** Eliminar el líquido.
2. **Añadir 500 µl de Tampón de Lavado DNA** en el reservorio de la DNA Spin columna. **Centrifugar durante 1 minuto.** Eliminar el líquido.
3. 2º Lavado. **Añadir 500 µl de Tampón de Lavado DNA** en el reservorio de la DNA Spin columna. **Centrifugar durante 1 minuto.** Eliminar el líquido
4. **Centrifugar a máxima velocidad durante 2 minutos para eliminar todo el etanol residual.**
5. Eliminar el tubo de recolección y insertar la DNA Spin columna en un microtubo de 1.5 ml. **Añadir 50-100 µl Tampón de Elución DNA** (precalentado a 70°C) en el reservorio de la DNA Spin columna. Incubar durante 1 minuto.
6. **Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.** El microtubo contiene ahora el ADN genómico.

3.3 Protocolo de extracción de ADN/ARN a partir de tejidos animales

Nota: El ARN en tejidos animales no se encuentra protegido hasta que después de su recolección es roto y homogenizado en la Solución de Lisis. Tejidos frescos o congelados pueden ser utilizados para este procedimiento. Los tejidos deberían congelarse en nitrógeno líquido y transferidos inmediatamente a -70°C. Cuando aislamos microARN de tejidos congelados asegúrese que no desciende mucho su temperatura durante el pesaje y la pulverización con una mano de mortero.

1. Determinar la cantidad de tejido a pesar, se recomienda no utilizar más de 10 mg de tejido.
2. Colocar el tejido en un mortero que contenga una cantidad apropiada de nitrógeno líquido para cubrir la muestra. Pulverizar el tejido utilizando una mano de mortero. Permitir que el nitrógeno líquido se evapore.
3. Pasar la muestra a un microtubo libre de RNAsas (no suministrado) y añadir **400 µl de Tampón de Lisis RNA**. Homogenizar pasando el lisado 5 o 10 veces a través de una jeringa con una aguja de 25 o con un homogenizador eléctrico de mano.

15. Remove the liquid and assemble the column with the collection tube. Add **400 µl of RNA Wash Buffer** to the column and centrifuge for 1 minute.
16. Perform a third wash. Add **400 µl of RNA Wash Buffer** to the column and centrifuge for 1 minute. Remove the liquid from the collection tube and centrifuge for an additional 2 minutes to remove all residual ethanol. Discard the collection tube.
17. Place the column in a new 1.5 ml microtube (not supplied with the kit) to elute total RNA.
18. Add **50 -100 µl of RNA Elution Buffer** to the column.
19. Centrifuge for 2 minutes at **200x g (approx. 2,000 rpm), followed by 1 minute at 14,000 x g (approx. 14,000 rpm)**. Check the amount of eluate on the column, if not all 50 µl are eluted, centrifuge for an additional 1 minute at 14,000 x g (approx. 14,000 rpm).
20. Purified RNA can be stored at -20°C for a few days. It is recommended that samples be stored at -70°C for long term storage.

Extraction of genomic DNA from cells growing in solution.

1. Add **500 µl of Deinhibition Buffer to the DNA Spin column. Centrifuge for 1 minute.** Remove the liquid.
2. **Add 500 µl of DNA Wash Buffer** to the reservoir of the DNA Spin column. **Centrifuge for 1 minute. Remove liquid.**
3. 2nd Wash. **Add 500 µl of DNA Wash Buffer** to the reservoir of the DNA Spin column. **Centrifuge for 1 minute.** Remove the liquid.
4. **Centrifuge at maximum speed for 2 minutes to remove all residual ethanol.**
5. Remove the collection tube and insert the DNA Spin column into a 1.5 ml microtube. **Add 50-100 µl DNA Elution Buffer** (pre-warmed to 70°C) to the reservoir of the DNA Spin column. Incubate for 1 minute.
6. **Centrifuge at maximum speed for 1 minute.** The microtube now contains the genomic DNA.

3.3 Protocol for extraction of DNA/RNA from animal tissues

Note: RNA in animal tissues is not protected until after collection it is broken and homogenized in Lysis Solution. Fresh or frozen tissues can be used for this procedure; tissues should be frozen in liquid nitrogen and transferred immediately to -70°C. When isolating microRNA from frozen tissues ensure that the temperature does not drop too low during weighing and spraying with a pestle and mortar.

1. Determine the amount of tissue to be weighed, it is recommended not to use more than 10 mg of tissue.
2. Place the tissue in a pestle containing an appropriate amount of liquid nitrogen to cover the sample. Pulverize the tissue using a pestle and mortar. Allow the liquid nitrogen to evaporate.
3. Transfer the sample to an RNase-free microtube (not supplied) and add **400 µl of RNA Lysis Buffer**. Homogenize by passing the lysate 5 to 10 times through a syringe with a 25-gauge needle or with a hand-held electric homogenizer.

4. Centrifugar durante 2 minutos para pellet algún desecho celular que pueda quedar. Pasar el sobrenadante a un microtubo libre RNAsas nuevo (no suministrado). **IMPORTANTE: Anotar la cantidad de sobrenadante/lisado.**
5. Añadir un volumen de etanol 100% que es equivalente a **(15 µl de etanol 100 % es añadido por cada 100 µl de lisado)**. Mezcla por vortex 10 segundos.
6. Ensamblar una **DNA Spin columna** con un tubo de recogida que se suministra.
7. Añadir el lisado + etanol a la columna. **Centrifugar durante 1 minuto.**
8. **Retener el líquido que ha pasado a través de la columna y que se encuentra en el tubo de recogida y que contiene el ARN total.** Pasar el líquido retenido a un microtubo nuevo de 1.5 ml (no suministrado con el kit).
9. Ensamblar la DNA Spin columna con un tubo de recogida y conservar a temperatura ambiente (15-25°C) o a 4°C para purificación del ADN más tarde.
10. Añadir **450 µl de Etanol 95-100% al líquido retenido que contiene el ARN total.** Mezcla por vortex 10 segundos. Después de la adición del etanol se podrá apreciar un precipitado, **asegurarse** de que todo el precipitado se añade a la RNA Spin columna.
11. Ensamblar una **RNA Spin columna** con un tubo de recogida que se suministra.
12. Aplicar la mitad del líquido + etanol en la RNA Spin columna y **centrifugar durante 1 minuto.** Descartar el líquido y reensamblar la columna con su tubo de recogida.
13. Repetir el punto 12 hasta completar la captura de todo el ARN total.
14. Añadir **400 µl de Tampón de Lavado RNA** a la columna y centrifugar durante 1 minuto. Asegurarse que todo el tampón de lavado ha pasado a través de la columna, sino fuera así centrifugar otro minuto adicional.
15. Eliminar el líquido y ensamblar la columna con el tubo de recogida. Añadir **400 µl de Tampón de Lavado RNA** a la columna y centrifugar durante 1 minuto.
16. Realizar un tercer lavado. Añadir **400 µl de Tampón de Lavado RNA** a la columna y centrifugar durante 1 minuto. Eliminar el líquido del tubo de recogida y centrifugar durante 2 minutos adicionales para eliminar todo el etanol residual. Eliminar el tubo de recogida.
17. Colocar la columna en un microtubo nuevo de 1.5 ml (no suministrado con el kit) para eluir el ARN total.
18. Añadir **50 -100 µl de Tampón de Elución RNA** a la columna.
19. Centrifugar durante 2 minutos a **200x g (aprox. 2.000 rpm)**, seguido de 1 minuto a **14.000 x g (aprox. 14.000 rpm)**. Ver la cantidad de eluido de la columna, sino se han eluido los 50 µl centrifugar por 1 minuto adicional a 14.000 x g (aprox. 14.000 rpm).
20. El ARN purificado puede ser conservado a -20°C durante algunos días. Se recomienda que las muestras se conserven a -70°C para almacenamientos largos.

Extracción de ADN genómico de tejidos animales

1. Añadir **500 µl de Tampón de Desinhibición a la DNA Spin columna. Centrifugar durante 1 minuto.** Eliminar el líquido.
2. **Añadir 500 µl de Tampón de Lavado DNA** en el reservorio de la DNA Spin columna. **Centrifugar durante 1 minuto.** Eliminar el líquido.
3. 2º Lavado. **Añadir 500 µl de Tampón de Lavado DNA** en el reservorio de la DNA Spin columna. **Centrifugar durante 1 minuto.** Eliminar el líquido

4. Centrifuge for 2 minutes to pellet any cell debris that may remain. Transfer the supernatant to a new RNase-free microtube (not supplied). **IMPORTANT: Note the amount of supernatant/lysate.**
5. Add a volume of 100% ethanol that is equivalent to **(15 µl of 100% ethanol is added per 100 µl of lysate)**. Vortex mix for 10 seconds.
6. Assemble a **DNA Spin column** with a collection tube provided.
7. Add the lysate + ethanol to the column. **Centrifuge for 1 minute.**
8. **Retain the liquid that has passed through the column and is in the collection tube containing total RNA.** Transfer the retained liquid to a new 1.5 ml microtube (not supplied with the kit).
9. Assemble the DNA Spin column with a collection tube and store at room temperature (15-25°C) or at 4°C for later DNA purification.
10. Add **450 µl of 95-100% Ethanol to the retained liquid containing total RNA.** Vortex mix for 10 seconds. After addition of ethanol a precipitate will be visible, make sure that all precipitate is added to the RNA Spin column.
11. Assemble an **RNA Spin column** with a collection tube provided.
12. Apply half of the liquid + ethanol to the RNA Spin column and **centrifuge for 1 minute.** Discard the liquid and reassemble the column with its collection tube.
13. Repeat step 12 until capture of all total RNA is complete.
14. Add **400 µl of RNA Wash Buffer** to the column and centrifuge for 1 minute. Make sure that all of the wash buffer has passed through the column, otherwise centrifuge for an additional minute.
15. Remove the liquid and assemble the column with the collection tube. Add 400 µl of RNA Wash Buffer to the column and centrifuge for 1 minute.
16. Perform a third wash. Add **400 µl of RNA Wash Buffer** to the column and centrifuge for 1 minute. Remove the liquid from the collection tube and centrifuge for an additional 2 minutes to remove all residual ethanol. Discard the collection tube.
17. Place the column in a new 1.5 ml microtube (not supplied with the kit) to elute total RNA.
18. Add **50 -100 µl of RNA Elution Buffer** to the column.
19. Centrifuge for 2 minutes at **200x g (approx. 2,000 rpm)**, followed by 1 minute at **14,000 x g (approx. 14,000 rpm)**. Check the amount of eluate on the column, if not all 50 µL are eluted, centrifuge for an additional 1 minute at 14,000 x g (approx. 14,000 rpm).
20. The purified RNA can be stored at -20°C for a few days. It is recommended that samples be stored at -70°C for long term storage.

Extraction of genomic DNA from animal tissues

1. Add **500 µl of Deinhibition Buffer to the DNA Spin column. Centrifuge for 1 minute.** Remove the liquid.
2. **Add 500 µl of DNA Wash Buffer** to the reservoir of the DNA Spin column. **Centrifuge for 1 minute.** Remove liquid.
3. 2nd Wash. **Add 500 µl of DNA Wash Buffer** to the reservoir of the DNA Spin column. **Centrifuge for 1 minute.** Remove the liquid.

4. **Centrifugar a máxima velocidad durante 2 minutos para eliminar todo el etanol residual.**
5. Eliminar el tubo de recolección y insertar la DNA Spin columna en un microtubo de 1.5 ml. **Añadir 50-100 µl Tampón de Elución DNA** (precalentado a 70°C) en el reservorio de la DNA Spin columna. Incubar durante 1 minuto.
6. **Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.** El microtubo contiene ahora el ADN genómico.

3.4 Protocolo de extracción de ADN/ARN a partir de sangre.

Nota: Se recomienda no utilizar más de 100 µl de sangre total y que se haya utilizado EDTA como anticoagulante.

1. Transferir 100 µl de sangre no coagulada a un microtubo libre RNAsas (no suministrado).
2. Añadir **300 µl de Tampón de Lisis RNA** a la sangre. Lisar las células por vortex durante 15 segundos. Asegurarse que la mezcla está transparente antes de proceder con el siguiente paso. **IMPORTANTE: Anotar la cantidad de lisado.**
3. Añadir un volumen de etanol 100% que es equivalente a **(15 µl de etanol 100 % es añadido cada 100 µl de lisado)**. Mezcla por vortex 10 segundos.
4. Ensamblar una **DNA Spin columna** con un tubo de recogida que se suministra.
5. Añadir el lisado + etanol a la columna. **Centrifugar durante 1 minuto.**
6. **Retener el líquido que ha pasado a través de la columna y que se encuentra en el tubo de recogida y que contiene el ARN total.** Pasar el líquido retenido a un microtubo nuevo de 1.5 ml (no suministrado con el kit).
7. Ensamblar la DNA Spin columna con un tubo de recogida y conservar a temperatura ambiente (15-25°C) o a 4°C para purificación del ADN más tarde.
8. Añadir **450 µl de Etanol 95-100% al líquido retenido que contiene el ARN total.** Mezcla por vortex 10 segundos. Después de la adición del etanol se podrá apreciar un precipitado, **asegurarse** de que todo el precipitado se añade a la RNA Spin columna.
9. Ensamblar una **RNA Spin columna** con un tubo de recogida que se suministra.
10. Aplicar la mitad del líquido + etanol en la RNA Spin columna y **centrifugar durante 1 minuto.** Descartar el líquido y reensamblar la columna con su tubo de recogida.
11. Repetir el punto 12 hasta completar la captura de todo el ARN total.
12. Añadir **400 µl de Tampón de Lavado RNA** a la columna y centrifugar durante 1 minuto. Asegurarse que todo el tampón de lavado ha pasado a través de la columna, sino fuera así centrifugar otro minuto adicional.
13. Eliminar el líquido y ensamblar la columna con el tubo de recogida. Añadir **400 µl de Tampón de Lavado RNA** a la columna y centrifugar durante 1 minuto.
14. Realizar un tercer lavado. Añadir **400 µl de Tampón de Lavado RNA** a la columna y centrifugar durante 1 minuto. Eliminar el líquido del tubo de recogida y centrifugar durante 2 minutos adicionales para eliminar todo el etanol residual. Eliminar el tubo de recogida.
15. Colocar la columna en un microtubo nuevo de 1.5 ml (no suministrado con el kit) para eluir el ARN total.
16. Añadir **50 -100 µl de Tampón de Elución RNA** a la columna.

4. **Centrifuge at maximum speed for 2 minutes to eliminate all the residual ethanol.**
5. Remove the collection tube and insert the DNA Spin column into a 1.5 ml microtube. **Add 50-100 µl DNA Elution Buffer** (pre-warmed to 70°C) to the reservoir of the DNA Spin column. Incubate for 1 minute.
6. **Centrifuge at maximum speed for 1 minute.** The microtube now contains the genomic DNA.

3.4 Protocol for DNA/RNA extraction from blood.

Note: It is recommended that no more than 100 µl of whole blood be used and that EDTA has been used as an anticoagulant.

1. Transfer 100 µl of unclotted blood to an RNase-free microtube (not supplied).
2. Add **300 µl of RNA Lysis Buffer** to the blood. Vortex the cells for 15 seconds. Ensure that the mixture is clear before proceeding to the next step. **IMPORTANT: Record the amount of lysate.**
3. Add a volume of 100% ethanol that is equivalent to **(15 µl of 100% ethanol is added per 100 µl of lysate)**. Vortex mix for 10 seconds.
4. Assemble a **DNA Spin column** with a collection tube provided.
5. Add the lysate + ethanol to the column. **Centrifuge for 1 minute.**
6. **Retain the liquid that has passed through the column and is in the collection tube containing total RNA.** Transfer the retained liquid to a new 1.5 ml microtube (not supplied with the kit).
7. Assemble the DNA Spin column with a collection tube and store at room temperature (15-25°C) or at 4°C for later DNA purification.
8. Add **450 µl of 95-100% Ethanol to the retained liquid containing total RNA.** Vortex mix for 10 seconds. After the addition of ethanol, a precipitate will be visible, make sure that all of the precipitate is added to the RNA Spin column.
9. Assemble an **RNA Spin column** with a collection tube provided.
10. Apply half of the liquid + ethanol to the RNA Spin **column and centrifuge for 1 minute.** Discard the liquid and reassemble the column with its collection tube.
11. Repeat step 12 until capture of all total RNA is complete.
12. Add **400 µl of RNA Wash Buffer** to the column and centrifuge for 1 minute. Make sure that all the wash buffer has passed through the column, otherwise centrifuge for an additional minute.
13. Remove the liquid and assemble the column with the collection tube. Add **400 µl of RNA Wash Buffer** to the column and centrifuge for 1 minute.
14. Perform a third wash. Add **400 µl RNA Wash Buffer** to the column and centrifuge for 1 minute. Remove the liquid from the collection tube and centrifuge for an additional 2 minutes to remove all residual ethanol. Discard the collection tube.
15. Place the column in a new 1.5 ml microtube (not supplied with the kit) to elute total RNA.
16. Add **50 -100 µl of RNA Elution Buffer** to the column.

- Centrifugar durante 2 minutos a **200x g (aprox. 2.000 rpm)**, seguido de 1 minuto a **14.000 x g (aprox. 14.000 rpm)**. Ver la cantidad de eluido de la columna, sino se han eluido los 50 µl centrifugar por 1 minuto adicional a 14.000 x g (aprox. 14.000 rpm).
- El ARN purificado puede ser conservado a -20°C durante algunos días. Se recomienda que las muestras se conserven a -70°C para almacenamientos largos.

Extracción de ADN genómico de sangre

- Añadir **500 µl de Tampón de Desinhibición a la DNA Spin columna. Centrifugar durante 1 minuto.** Eliminar el líquido.
- Añadir 500 µl de Tampón de Lavado DNA** en el reservorio de la DNA Spin columna. **Centrifugar durante 1 minuto.** Eliminar el líquido.
- 2º Lavado. **Añadir 500 µl de Tampón de Lavado DNA** en el reservorio de la DNA Spin columna. **Centrifugar durante 1 minuto.** Eliminar el líquido
- Centrifugar a máxima velocidad durante 2 minutos para eliminar todo el etanol residual.**
- Eliminar el tubo de recolección y insertar la DNA Spin columna en un microtubo de 1.5 ml. **Añadir 50-100 µl Tampón de Elución DNA** (precalentado a 70°C) en el reservorio de la DNA Spin columna. Incubar durante 1 minuto.
- Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.** El microtubo contiene ahora el ADN genómico.

3.5 Protocolo de extracción de ADN/ARN a partir de bacterias

Nota: Se recomienda no utilizar más de 1 x 10⁹ células /ml, el crecimiento bacteriano puede ser medido por un espectrofotómetro, como regla general, un cultivo de E.coli de 1 x 10⁹ células /ml tiene una DO₆₀₀ de 1.0.

Preparar una cantidad apropiada de TE conteniendo lisozima, esta solución se preparará con TE libre de RNAsas y conservado en hielo hasta su uso. Para Gram-negativos la concentración de lisozima será de 1 mg/ml y Gram-positivos la concentración de lisozima será de 3 mg/ml.

- Pellet las células por centrifugación a **14.000 x g (aprox. 14.000 rpm) durante 1 minuto.**
- Eliminar el sobrenadante y resuspender por vortex el pellet en **100 µl del TE con la cantidad apropiada de lisozima.** Incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- Añadir **200 µl de Tampón de Lisis RNA** y vortex durante 15 segundos.
- Añadir **50 µl de Etanol 95-100%** al lisado. Mezcla por vortex 10 segundos. Asegurarse que el pellet es completamente disuelto antes de proceder con el siguiente paso.
- Ensamblar una **DNA Spin columna** con un tubo de recogida que se suministra.
- Añadir el lisado + etanol a la columna. **Centrifugar durante 1 minuto.**
- Retener el líquido que ha pasado a través de la columna y que se encuentra en el tubo de recogida y que contiene el ARN total.** Pasar el líquido retenido a un microtubo nuevo de 1.5 ml (no suministrado con el kit).
- Ensamblar la DNA Spin columna con un tubo de recogida y conservar a temperatura ambiente (15-25°C) o a 4°C para purificación del ADN más tarde.

- Centrifuge for 2 minutes at **200x g (approx. 2,000 rpm)**, followed by 1 minute at **14,000 x g (approx. 14,000 rpm)**. Check the amount of eluate on the column, if not all 50 µl are eluted, centrifuge for 1 additional minute at 14,000 x g (approx. 14,000 rpm).
- Purified RNA can be stored at -20°C for a few days. It is recommended that samples be stored at -70°C for long term storage.

Extraction of genomic DNA from blood

- Add **500 µl of Disinhibition Buffer to the DNA Spin column. Centrifuge for 1 minute.** Discard the liquid.
- Add 500 µl of DNA Wash Buffer** to the reservoir of the DNA Spin column. **Centrifuge for 1 minute.** Remove liquid.
- 2nd Wash. **Add 500 µl of DNA Wash Buffer** to the reservoir of the DNA Spin column. **Centrifuge for 1 minute.** Remove the liquid.
- Centrifuge at full speed for 2 minutes to remove all residual ethanol.**
- Remove the collection tube and insert the DNA Spin column into a 1.5 ml microtube. **Add 50-100 µl DNA Elution Buffer** (pre-warmed to 70°C) to the reservoir of the DNA Spin column. Incubate for 1 minute.
- Centrifuge at maximum speed for 1 minute.** The microtube now contains the genomic DNA.

3.5 Protocol for DNA/RNA extraction from bacteria

Note: It is recommended not to use more than 1 x 10⁹ cells /ml, bacterial growth can be measured by spectrophotometer, as a rule of thumb, an E.coli culture of 1 x 10⁹ cells /ml has an OD 600 of 1.0.

Prepare an appropriate amount of TE containing lysozyme, this solution should be prepared with RNase-free TE and kept on ice until use. For Gram-negative cells the lysozyme concentration will be 1 mg/ml and Gram-positive cells the lysozyme concentration will be 3 mg/ml.

- Pellet the cells by centrifugation at **14,000 x g (approx. 14,000 rpm) for 1 minute.**
- Remove the supernatant and vortex resuspend the pellet in **100 µl of TE with the appropriate amount of lysozyme.** Incubate at room temperature for 10 minutes.
- Add **200 µl of RNA Lysis Buffer** and vortex for 15 sec.
- Add 50 µl of 95-100% Ethanol to the lysate. Vortex mix for 10 seconds. Ensure that the pellet is completely dissolved before proceeding to the next step.
- Assemble a **DNA Spin column** with a collection tube provided.
- Add the lysate + ethanol to the column. **Centrifuge for 1 minute.**
- Retain the liquid that has passed through the column and is in the collection tube containing total RNA.** Transfer the retained liquid to a new 1.5 ml microtube (not supplied with the kit).
- Assemble the DNA Spin column with a collection tube and store at room temperature (15-25°C) or at 4°C for later DNA purification.

9. Añadir **450 µl de Etanol 95-100% al líquido retenido que contiene el ARN total**. Mezcla por vortex 10 segundos. Después de la adición del etanol se podrá apreciar un precipitado, **asegurarse** de que todo el precipitado se añada a la RNA Spin columna.
10. Ensamblar una **RNA Spin columna** con un tubo de recogida que se suministra.
11. Aplicar la mitad del líquido + etanol en la RNA Spin columna y **centrifugar durante 1 minuto**. Descartar el líquido y reensamblar la columna con su tubo de recogida.
12. Repetir el punto 11 hasta completar la captura de todo el ARN total.
13. Añadir **400 µl de Tampón de Lavado RNA** a la columna y centrifugar durante 1 minuto. Asegurarse que todo el tampón de lavado ha pasado a través de la columna, sino fuera así centrifugar otro minuto adicional.
14. Eliminar el líquido y ensamblar la columna con el tubo de recogida. Añadir **400 µl de Tampón de Lavado RNA** a la columna y centrifugar durante 1 minuto.
15. Realizar un tercer lavado. Añadir **400 µl de Tampón de Lavado RNA** a la columna y centrifugar durante 1 minuto. Eliminar el líquido del tubo de recogida y centrifugar durante 2 minutos adicionales para eliminar todo el etanol residual. Eliminar el tubo de recogida.
16. Colocar la columna en un microtubo nuevo de 1.5 ml (no suministrado con el kit) para eluir el ARN total.
17. Añadir **50 -100 µl de Tampón de Elución RNA** a la columna.
18. Centrifugar durante 2 minutos a **200x g (aprox. 2.000 rpm)**, seguido de 1 minuto a **14.000 x g (aprox. 14.000 rpm)**. Ver la cantidad de eluido de la columna, sino se han eluido los 50 µl centrifugar por 1 minuto adicional a 14.000 x g (aprox. 14.000 rpm).
19. El ARN purificado puede ser conservado a -20°C durante algunos días. Se recomienda que las muestras se conserven a -70°C para almacenamientos largos.

Extracción de ADN genómico de bacterias

1. Añadir **500 µl de Tampón de Desinhibición a la DNA Spin columna. Centrifugar durante 1 minuto**. Eliminar el líquido.
2. Añadir **500 µl de Tampón de Lavado DNA** en el reservorio de la DNA Spin columna. **Centrifugar durante 1 minuto**. Eliminar el líquido.
3. 2º Lavado. Añadir **500 µl de Tampón de Lavado DNA** en el reservorio de la DNA Spin columna. **Centrifugar durante 1 minuto**. Eliminar el líquido
4. **Centrifugar a máxima velocidad durante 2 minutos para eliminar todo el etanol residual**.
5. Eliminar el tubo de recolección y insertar la DNA Spin columna en un microtubo de 1.5 ml. **Añadir 50-100 µl Tampón de Elución DNA** (precalentado a 70°C) en el reservorio de la DNA Spin columna. Incubar durante 1 minuto.
6. **Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto**. El microtubo contiene ahora el ADN genómico.

3.6 Protocolo de extracción ADN/ARN a partir de levaduras

Nota: Se recomienda no utilizar más de 10⁷ células de levadura o 1ml de cultivo.

Preparar una cantidad apropiada de Tampón de Resuspensión que contenga liticase: 50mM tris, pH 7.5, 10 mM EDTA, 1M Sorbitol, 0.10 % β-mercaptoetanol y 1 unidad / µl de liticase. Esta solución debería prepararse con reactivos estériles y libres de RNAsas y mantenida en hielo hasta ser utilizada.

9. Add **450 µl of 95-100% Ethanol to the retained liquid containing total RNA**. Vortex mix for 10 seconds. After addition of ethanol a precipitate will be visible, make sure that all precipitate is added to the RNA Spin column.
10. Assemble an **RNA Spin column** with a collection tube provided.
11. Apply half of the liquid + ethanol to the RNA Spin column and **centrifuge for 1 minute**. Discard the liquid and reassemble the column with its collection tube.
12. Repeat step 11 until capture of all total RNA is complete.
13. Add **400 µl of RNA Wash Buffer** to the column and centrifuge for 1 minute. Make sure that all of the wash buffer has passed through the column, otherwise centrifuge for an additional minute.
14. Remove the liquid and assemble the column with the collection tube. **Add 400 µl of RNA Wash Buffer** to the column and centrifuge for 1 minute.
15. Perform a third wash. **Add 400 µl of RNA Wash Buffer** to the column and centrifuge for 1 minute. Remove the liquid from the collection tube and centrifuge for an additional 2 minutes to remove all residual ethanol. Discard the collection tube.
16. Place the column in a new 1.5 ml microtube (not supplied with the kit) to elute total RNA.
17. Add **50 -100 µl of RNA Elution Buffer** to the column.
18. Centrifuge for 2 minutes at **200x g (approx. 2,000 rpm)**, followed by 1 minute at **14,000 x g (approx. 14,000 rpm)**. Check the amount of eluate on the column, if not all 50 µL are eluted, centrifuge for an additional 1 minute at 14,000 x g (approx. 14,000 rpm).
19. Purified RNA can be stored at -20°C for a few days. It is recommended that samples be stored at -70°C for long term storage.

Extraction of genomic DNA from bacteria

1. Add **500 µl of Deinhhibition Buffer to the DNA Spin column. Centrifuge for 1 minute**. Remove the liquid.
2. **Add 500 µl of DNA Wash Buffer** to the reservoir of the DNA Spin column. **Centrifuge for 1 minute**. Remove liquid.
3. 2nd Wash. **Add 500 µl of DNA Wash Buffer** to the reservoir of the DNA Spin column. **Centrifuge for 1 minute**. Remove the liquid.
4. **Centrifuge at full speed for 2 minutes to remove all residual ethanol**.
5. Remove the collection tube and insert the DNA Spin column into a 1.5 ml microtube. **Add 50-100 µl DNA Elution Buffer** (pre-warmed to 70°C) to the reservoir of the DNA Spin column. Incubate for 1 minute.
6. **Centrifuge at maximum speed for 1 minute**. The microtube now contains the genomic DNA.

3.6 Protocol for DNA/RNA extraction from yeasts

Note: It is recommended to use no more than 10⁷ yeast cells or 1ml of culture.

Prepare an appropriate amount of Resuspension Buffer containing lyticase: 50mM tris, pH 7.5, 10 mM EDTA, 1M Sorbitol, 0.10 % β-mercaptoethanol and 1 unit / µl of lyticase. This solution should be prepared with sterile, RNase-free reagents and kept on ice until used.

1. Pellet las levaduras por centrifugación a **14.000 x g (aprox. 14.000 rpm)** durante **1 minuto**.
2. Eliminar el sobrenadante y resuspender por vortex el pellet en **100 µl del Tampón de Resuspensión con la cantidad apropiada de litycasa**. Incubar a 37°C durante 10 minutos.
3. Añadir **300 µl de Tampón de Lisis RNA** al pellet. Lisar las células por vortex durante 15 segundos. Asegurarse que todo el pellet está disuelto antes de proceder con el siguiente paso.
4. Pasar el lisado a un microtubo. **IMPORTANTE: Anotar la cantidad de lisado**.
5. Añadir un volumen de etanol 100% que es equivalente a **(15 µl de etanol 100 % es añadido cada 100 µl de lisado)**. Mezcla por vortex 10 segundos.
6. Ensamblar una **DNA Spin column** con un tubo de recogida que se suministra.
7. Añadir el lisado + etanol a la columna. **Centrifugar durante 1 minuto**.
8. **Retener el líquido que ha pasado a través de la columna y que se encuentra en el tubo de recogida y que contiene el ARN total**. Pasar el líquido retenido a un microtubo nuevo de 1.5 ml (no suministrado con el kit).
9. Ensamblar la DNA Spin column con un tubo de recogida y conservar a temperatura ambiente (15-25°C) o a 4°C para purificación del ADN más tarde.
10. Añadir **450 µl de Etanol 95-100% al líquido retenido que contiene el ARN total**. Mezcla por vortex 10 segundos. Después de la adición del etanol se podrá apreciar un precipitado, **asegurarse** de que todo el precipitado se añade a la RNA Spin columna.
11. Ensamblar una **RNA Spin column** con un tubo de recogida que se suministra.
12. Aplicar la mitad del líquido + etanol en la RNA Spin columna y **centrifugar durante 1 minuto**. Descartar el líquido y reensamblar la columna con su tubo de recogida.
13. Repetir el punto 12 hasta completar la captura de todo el ARN total.
14. Añadir **400 µl de Tampón de Lavado RNA** a la columna y centrifugar durante 1 minuto. Asegurarse que todo el tampón de lavado ha pasado a través de la columna, sino fuera así centrifugar otro minuto adicional.
15. Eliminar el líquido y ensamblar la columna con el tubo de recogida. Añadir **400 µl de Tampón de Lavado RNA** a la columna y centrifugar durante 1 minuto.
16. Realizar un tercer lavado. Añadir **400 µl de Tampón de Lavado RNA** a la columna y centrifugar durante 1 minuto. Eliminar el líquido del tubo de recogida y centrifugar durante 2 minutos adicionales para eliminar todo el etanol residual. Eliminar el tubo de recogida.
17. Colocar la columna en un microtubo nuevo de 1.5 ml (no suministrado con el kit) para eluir el ARN total.
18. Añadir **50 -100 µl de Tampón de Elución RNA** a la columna.
19. Centrifugar durante 2 minutos a **200x g (aprox. 2.000 rpm)**, seguido de 1 minuto a **14.000 x g (aprox. 14.000 rpm)**. Ver la cantidad de eluido de la columna, sino se han eluido los 50 µl centrifugar por 1 minuto adicional a 14.000 x g (aprox. 14.000 rpm).
20. El ARN purificado puede ser conservado a -20°C durante algunos días. Se recomienda que las muestras se conserven a -70°C para almacenamientos largos.

1. Pellet the yeasts by centrifugation at **14,000 x g (approx. 14,000 rpm)** for **1 minute**.
2. Remove the supernatant and vortex resuspend the pellet in **100 µl of Resuspension Buffer with the appropriate amount of litycase**. Incubate at 37°C for 10 minutes.
3. Add **300 µl of RNA Lysis Buffer** to the pellet. Vortex the cells for 15 seconds. Ensure that the entire pellet is dissolved before proceeding to the next step.
4. Transfer the lysate to a microtube. **IMPORTANT: Note the amount of lysate**.
5. Add a volume of 100% ethanol that is equivalent to **(15 µl of 100% ethanol is added per 100 µl of lysate)**. Vortex mix for 10 seconds.
6. Assemble a **DNA Spin column** with a collection tube provided.
7. Add the lysate + ethanol to the column. **Centrifuge for 1 minute**.
8. **Retain the liquid that has passed through the column and is in the collection tube containing total RNA**. Transfer the retained liquid to a new 1.5 ml microtube (not supplied with the kit).
9. Assemble the DNA Spin column with a collection tube and store at room temperature (15-25°C) or at 4°C for later DNA purification.
10. Add **450 µl of 95-100% Ethanol to the retained liquid containing total RNA**. Vortex mix for 10 seconds. After addition of the ethanol a precipitate will be visible, make sure that all of the precipitate is added to the RNA Spin column.
11. Assemble an **RNA Spin column** with a collection tube provided.
12. Apply half of the liquid + ethanol to the RNA Spin column and **centrifuge for 1 minute**. Discard the liquid and reassemble the column with its collection tube.
13. Repeat 12 until complete capture of all total RNA.
14. Add 400 µl of RNA Wash Buffer to the column and centrifuge for 1 minute. Make sure that all wash buffer has passed through the column, otherwise centrifuge for an additional minute.
15. Remove the liquid and assemble the column with the collection tube. **Add 400 µl of RNA Wash Buffer** to the column and centrifuge for 1 minute.
16. Perform a third wash. **Add 400 µl of RNA Wash Buffer** to the column and centrifuge for 1 minute. Remove the liquid from the collection tube and centrifuge for an additional 2 minutes to remove all residual ethanol. Discard the collection tube.
17. Place the column in a new 1.5 ml microtube (not supplied with the kit) to elute total RNA.
18. Add **50 -100 µl of RNA Elution Buffer** to the column.
19. Centrifuge for 2 minutes at **200x g (approx. 2,000 rpm)**, followed by 1 minute at **14,000 x g (approx. 14,000 rpm)**. Check the amount of eluate on the column, if not all 50 µl are eluted, centrifuge for an additional 1 minute at 14,000 x g (approx. 14,000 rpm).
20. Purified RNA can be stored at -20°C for a few days. It is recommended that samples be stored at -70°C for long term storage.

Extracción de ADN genómico de levaduras

1. Añadir **500 µl de Tampón de Desinhibición a la DNA Spin columna. Centrifugar durante 1 minuto.** Eliminar el líquido.
2. **Añadir 500 µl de Tampón de Lavado DNA** en el reservorio de la DNA Spin columna. **Centrifugar durante 1 minuto.** Eliminar el líquido.
3. 2º Lavado. **Añadir 500 µl de Tampón de Lavado DNA** en el reservorio de la DNA Spin columna. **Centrifugar durante 1 minuto.** Eliminar el líquido
4. **Centrifugar a máxima velocidad durante 2 minutos para eliminar todo el etanol residual.**
5. Eliminar el tubo de recolección y insertar la DNA Spin columna en un microtubo de 1.5 ml. **Añadir 50-100 µl Tampón de Elución DNA** (precalentado a 70°C) en el reservorio de la DNA Spin columna. Incubar durante 1 minuto.
6. **Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.** El microtubo contiene ahora el ADN genómico.

3.7 Protocolo de extracción de ADN/ARN a partir de plantas

Nota: Se recomienda no utilizar más de 10 mg de tejido o 1 x 10⁶ células de plantas.

Tejidos frescos o congelados pueden ser utilizados para este procedimiento. Los tejidos deberían congelarse en nitrógeno líquido y transferidos inmediatamente a -70°C. Cuando aislamos microARN de tejidos congelados asegurarse que no descende mucho su temperatura durante el pesaje y la pulverización con una mano de mortero para asegurarse que la integridad del microARN no se compromete.

1. Colocar el tejido o células en un mortero que contenga una cantidad apropiada de nitrógeno líquido para cubrir la muestra. Pulverizar el tejido utilizando una mano de mortero. Permitir que el nitrógeno líquido se evapore.
2. Pasar la muestra a un microtubo libre de RNAsas (no suministrado) y añadir **400 µl de Tampón de Lisis RNA.** Homogenizar con un homogenizador eléctrico de mano.
3. Centrifugar durante 2 minutos para pellet algún desecho celular que pueda quedar. Centrifugar durante 2 minutos para pellet algún desecho celular que pueda quedar. Pasar el sobrenadante a un microtubo libre RNAsas nuevo (no suministrado). **IMPORTANTE: Anotar la cantidad de sobrenadante/lisado.**
4. Añadir un volumen de etanol 100% que es equivalente a **15 µl de etanol 100 % es añadido por cada 100 µl de lisado.** Mezcla por vortex 10 segundos.
5. Ensamblar una **DNA Spin columna** con un tubo de recogida que se suministra.
6. Añadir el lisado + etanol a la columna. **Centrifugar durante 1 minuto.**
7. **Retener el líquido que ha pasado a través de la columna y que se encuentra en el tubo de recogida y que contiene el ARN total.** Pasar el líquido retenido a un microtubo nuevo de 1.5 ml (no suministrado con el kit).
8. Ensamblar la DNA Spin columna con un tubo de recogida y conservar a temperatura ambiente (15-25°C) o a 4°C para purificación del ADN más tarde.
9. **Añadir 450 µl de Etanol 95-100% al líquido retenido que contiene el ARN total.** Mezcla por vortex 10 segundos. Después de la adición del etanol se podrá apreciar un precipitado, **asegurarse** de que todo el precipitado se añade a la RNA Spin columna.

Yeast Genomic DNA Extraction

1. Add 500 µl of Deinhhibition Buffer to the DNA Spin column. Centrifuge for 1 minute. Remove the liquid.
2. Add 500 µl of DNA Wash Buffer to the reservoir of the DNA Spin column. Centrifuge for 1 minute. Remove liquid.
3. 2nd Wash. Add 500 µl of DNA Wash Buffer to the reservoir of the DNA Spin column. Centrifuge for 1 minute. Remove the liquid.
4. Centrifuge at full speed for 2 minutes to remove all residual ethanol.
5. Remove the collection tube and insert the DNA Spin column into a 1.5 ml microtube. Add 50-100 µl DNA Elution Buffer (pre-warmed to 70°C) to the reservoir of the DNA Spin column. Incubate for 1 minute.
6. Centrifuge at maximum speed for 1 minute. The microtube now contains the genomic DNA.

3.7 Protocol for DNA/RNA extraction from plants

Note: It is recommended not to use more than 10 mg of tissue or 1 x 10⁶ plant cells.

Fresh or frozen tissues can be used for this procedure. Tissues should be frozen in liquid nitrogen and transferred immediately to -70°C. When isolating microRNA from frozen tissues ensure that the temperature does not drop too low during weighing and spraying with a pestle and mortar to ensure that the integrity of the microRNA is not compromised.

1. Place the tissue or cells in a mortar containing an appropriate amount of liquid nitrogen to cover the sample. Spray the tissue using a pestle and mortar. Allow the liquid nitrogen to evaporate.
2. Transfer the sample to an RNase-free microtube (not supplied) and add **400 µl of RNA Lysis Buffer.** Homogenize with a handheld electric homogenizer.
3. Centrifuge for 2 minutes to pellet any cell debris that may remain. Centrifuge for 2 minutes to pellet any cell debris that may remain. Transfer the supernatant to a new RNase-free microtube (not supplied). **IMPORTANT: Note the amount of supernatant/lysate.**
4. Add a volume of 100% ethanol that is equivalent to **15 µl of 100% ethanol is added per 100 µl of lysate.** Vortex mix for 10 seconds.
5. Assemble a **DNA Spin column** with a collection tube provided.
6. Add the lysate + ethanol to the column. **Centrifuge for 1 minute.**
7. **Retain the liquid that has passed through the column and is in the collection tube containing total RNA.** Transfer the retained liquid to a new 1.5 ml microtube (not supplied with the kit).
8. Assemble the DNA Spin column with a collection tube and store at room temperature (15-25°C) or at 4°C for later DNA purification.
9. **Add 450 µl of 95-100% Ethanol to the retained liquid containing total RNA.** Vortex mix for 10 seconds. After addition of ethanol a precipitate will be visible, make sure that all precipitate is added to the RNA Spin column.

10. Ensamblar una **RNA Spin column** con un tubo de recogida que se suministra.
11. Aplicar la mitad del líquido + etanol en la RNA Spin column y **centrifugar durante 1 minuto**. Descartar el líquido y reensamblar la columna con su tubo de recogida.
12. Repetir el punto 12 hasta completar la captura de todo el ARN total.
13. Añadir **400 µl de Tampón de Lavado RNA** a la columna y centrifugar durante 1 minuto. Asegurarse que todo el tampón de lavado ha pasado a través de la columna, sino fuera así centrifugar otro minuto adicional.
14. Eliminar el líquido y ensamblar la columna con el tubo de recogida. Añadir **400 µl de Tampón de Lavado RNA** a la columna y centrifugar durante 1 minuto.
15. Realizar un tercer lavado. Añadir **400 µl de Tampón de Lavado RNA** a la columna y centrifugar durante 1 minuto. Eliminar el líquido del tubo de recogida y centrifugar durante 2 minutos adicionales para eliminar todo el etanol residual. Eliminar el tubo de recogida.
16. Colocar la columna en un microtubo nuevo de 1.5 ml (no suministrado con el kit) para eluir el ARN total.
17. Añadir **50 -100 µl de Tampón de Elución RNA** a la columna.
18. Centrifugar durante 2 minutos a **200x g (aprox. 2.000 rpm)**, seguido de 1 minuto a **14.000 x g (aprox. 14.000 rpm)**. Ver la cantidad de eluido de la columna, sino se han eluido los 50 µl centrifugar por 1 minuto adicional a 14.000 x g (aprox. 14.000 rpm).
19. El ARN purificado puede ser conservado a -20°C durante algunos días. Se recomienda que las muestras se conserven a -70°C para almacenamientos largos.

Extracción de ADN genómico de plantas

1. Añadir **500 µl de Tampón de Desinhibición a la DNA Spin column**. **Centrifugar durante 1 minuto**. Eliminar el líquido.
2. Añadir **500 µl de Tampón de Lavado DNA** en el reservorio de la DNA Spin column. **Centrifugar durante 1 minuto**. Eliminar el líquido.
3. 2º Lavado. Añadir **500 µl de Tampón de Lavado DNA** en el reservorio de la DNA Spin column. **Centrifugar durante 1 minuto**. Eliminar el líquido
4. **Centrifugar a máxima velocidad durante 2 minutos para eliminar todo el etanol residual**.
5. Eliminar el tubo de recolección y insertar la DNA Spin column en un microtubo de 1.5 ml. Añadir **50-100 µl Tampón de Elución DNA** (precalentado a 70°C) en el reservorio de la DNA Spin column. Incubar durante 1 minuto.

6. **Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto**. El microtubo contiene ahora el ADN genómico.
10. Assemble an **RNA Spin column** with a collection tube provided.
11. Apply half of the liquid + ethanol to the RNA Spin column and **centrifuge for 1 minute**. Discard the liquid and reassemble the column with its collection tube.
12. Repeat step 12 until the capture of all total RNA is complete.
13. Add **400 µl of RNA Wash Buffer** to the column and centrifuge for 1 minute. Make sure that all the Wash Buffer has passed through the column, otherwise centrifuge for an additional minute.
14. Remove the liquid and assemble the column with the collection tube. Add **400 µl of RNA Wash Buffer** to the column and centrifuge for 1 minute.
15. Perform a third wash. Add **400 µl of RNA Wash Buffer** to the column and centrifuge for 1 minute. Remove the liquid from the collection tube and centrifuge for an additional 2 minutes to remove all residual ethanol. Discard the collection tube.
16. Place the column in a new 1.5 ml microtube (not supplied with the kit) to elute total RNA.
17. Add **50 -100 µl of RNA Elution Buffer** to the column.
18. Centrifuge for 2 minutes at **200x g (approx. 2,000 rpm)**, followed by 1 minute at **14,000 x g (approx. 14,000 rpm)**. Check the amount of eluate on the column, if not all 50 µl are eluted, centrifuge for an additional 1 minute at 14,000 x g (approx. 14,000 rpm).
19. Purified RNA can be stored at -20°C for a few days. It is recommended that samples be stored at -70°C for long term storage.

Extraction of genomic DNA from plants

1. Add **500 µl of Deinhhibition Buffer to the DNA Spin column**. **Centrifuge for 1 minute**. Remove the liquid.
2. Add **500 µl of DNA Wash Buffer** to the reservoir of the DNA Spin column. **Centrifuge for 1 minute**. Remove liquid.
3. 2nd Wash. Add **500 µl of DNA Wash Buffer** to the reservoir of the DNA Spin column. **Centrifuge for 1 minute**. Remove the liquid.
4. **Centrifuge at full speed for 2 minutes to remove all residual ethanol**.
5. Remove the collection tube and insert the DNA Spin column into a 1.5 ml microtube. Add **50-100 µl DNA Elution Buffer** (pre-warmed to 70°C) to the reservoir of the DNA Spin column. Incubate for 1 minute.
6. Centrifuge at maximum speed for 1 minute. The microtube now contains the 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 Tampón de Lisis RNA contiene guanidine isotiocianato y el Tampón de Desinhibición contiene guanidine hydrochloride que son irritantes, utilizar guantes y gafas.

STORAGE AND STABILITY

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








CAUTION: RNA Lysis Buffer contains guanidine isothiocyanate and Disinhibition Buffer contains guanidine hydrochloride which are irritants, wear 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

	Número de catálogo / <i>Catalogue number</i>
	Limitación de temperatura / <i>Temperature limitation</i>
	Fecha de caducidad / <i>Expiration date</i>
	Lote / <i>Lot</i>
	Contiene suficiente para n pruebas / <i>Contains enough for n tests</i>
	Fabricante / <i>Manufacturer</i>
	Uso exclusivo en investigación / <i>Research use only</i>



B65699985