



REAL TOTAL RNA SPIN PLUS KIT

Ref. RBMER11 50 Preps.

1. INTRODUCCIÓN

Este kit permite la obtención de **ARN total libre de ADN** a partir de cultivos celulares, tejidos animales, bacterias, levaduras, fluidos biológicos y mezcla de reacciones utilizando para ello **columnas con una membrana de sílica**.

Para la obtención de ARN de elevada calidad es importante prevenir la degradación del ARN y eliminar el ADN genómico. Las células son lisadas por incubación en una solución que contiene agentes caotrópicos que inactivan inmediatamente las RNasas (las cuales están presentes en todos los materiales biológicos) y a la vez crean las condiciones de unión apropiadas que favorecen la absorción del ARN en la membrana de sílica. Después de la lisis, se realiza una homogenización y filtración con un filtro que se provee con el kit. El ADN contaminante unido a la membrana de sílica es eliminado con una solución de DNasa I aplicada directamente en la membrana. Las sales, metabolitos y componentes celulares son eliminados por lavados con dos tampones diferentes. El ARN total es eluido con agua libre de nucleasas.

El ARN total preparado con el REALTOTAL SPIN[™]PLUS[™] es útil para aplicaciones como RT-PCR, Northern, primer extension, tecnología de "arrays" y ensayos de protección de la RNasa.

1. INTRODUCTION

This kit allows obtaining DNA-free Total RNA from cell cultures, animal tissues, bacteria, yeast, biologic fluids and reactions mixture using columns with a silica membrane.

For the obtaining of high quality RNA, is important to prevent the RNA degradation and to remove genomic DNA. The cells are lysed by incubation in a solution that contains chaotropic salts and immediately inactivates the RNases (which are present in all biological materials) and at the same time creates the suitable binding conditions to ease the RNA adsorption to the silica membrane. The lysis is followed by a homogenization and a filtration through a filter provided with the kit. Contaminating DNA, which is also bound to the silica membrane is removed by a DNase I solution that is directly applied onto the silica membrane. The salts, metabolites and cell components are removed by washing with two different buffers. The total RNA is eluted with nuclease-free water.

The total RNA prepared with REALTOTAL SPIN[™]PLUS[™] is useful for applications such as RT-PCR, Northern, primer extension, arrays technology and RNase protection experiments.

MUESTRA / SAMPLE	ARN PROMEDIO / RNA AVERAGE
8 x 10 ⁴ HeLa Cells	1.5 µg
4 x 10 ⁵ HeLa Cells	4 µg
1 x 10 ⁶ HeLa Cells	14µg
2 x 10 ⁶ s HeLa Cells	21 µg
2.5 x 10 ⁶ HeLa Cells	25 µg
5 x 10 ⁶ HeLa Cells	50 µg



2. COMPONENTES DEL KIT KIT COMPONENTS

	Ref.	Ref. RBMER11 50 preps	T ^a
Solución de Lisis I <i>Lysis I Solution</i>	ERC1	25 ml	RT
Solución STOP DNasa <i>DNasa STOP Solution</i>	ERC2	15 ml	RT
Solución de Lavado Concentrada <i>Concentrated Wash Solution</i>	ERC3	12.5 ml	RT
Tampón de Desalado de la Membrana <i>Membrane Desalting Buffer</i>	ERCM	25 ml	RT
Tampón de Reacción de la DNasa <i>DNase Reaction Buffer</i>	ERCD	7 ml	RT
Dnasa libre de RNasa (liofilizada) <i>RNase-free DNase (lyophilized)</i>	--	1 vial	4°C
Agua Libre de Nucleasas <i>Nuclease-free Water</i>	ERCH	15 ml	RT
Columnas de Unión ARN + Tubos Recolección <i>RNA Binding Columns + Collection Tubes</i>	ERC11	50 unid.	RT
Columnas de Filtración <i>Filtration Columns</i>	ERC12	50 unid.	RT
Tubos de Recolección <i>Collection Tubes</i>	ERC13	150 unid.	RT
Tubos de 1.5 ml <i>1.5 ml Tubes</i>	ERC14	50 unid.	RT

3. PROTOCOLO GENERAL GENERAL PROCEDURE

3.1 Consideraciones preliminares

- Tamaño muestra:**
 - Hasta 5×10^6 Células
 - Hasta 30 mg tejido
 - Hasta 1×10^9 bacterias
 - Hasta 5×10^7 levaduras
- Promedio ARN obtenido:** Hasta 70 µg
- Volumen Elución:** 40 – 120 µl
- Capacidad de Unión:** 100 µg
- Tiempo/ preparación** < 30 minutos / 6 prep

Es posible obtener hasta 70 µg de ARN total, cuando como muestra se utiliza 5×10^6 células o 30 mg de tejido. El ARN obtenido puede ser utilizado para RT-PCR. Generalmente, entre 1-10% del total del ARN obtenido a partir de 1×10^6 células o 10 mg de tejido es suficiente para ser utilizado en RT-PCR.

El ARN obtenido a partir de muestras iniciales grandes está generalmente libre de ADN, aunque pueden permanecer algunas trazas de ADN en la preparación, si se utilizan materiales ricos en ADN. Es por ello que si se ha de utilizar en RT-PCR recomendamos el uso de bajas cantidades de muestra inicial.

3.1 Preliminary conditions

- Sample Size:**
 - Up to 5×10^6 Cells
 - Up to 30 mg tissue
 - Up to 1×10^9 bacteria
 - Up to 5×10^7 yeast
- Obtained RNA average:** Up to 70 µg
- Elution Volume:** 40 – 120 µl
- Binding Capacity:** 100 µg
- Time/ preparation:** < 30 minutes / 6 prep

It is possible to obtain up to 70 µg of total RNA from 5×10^6 cultured cells or 30 mg of tissue are used as sample. The RNA obtained can be used as template for RT-PCR. Generally, between 1-10% of the total RNA obtained from 1×10^6 cells or 10 mg of tissue is sufficient as template for RT-PCR.

The RNA prepared from such high amounts is generally DNA-free, although some DNA traces can remain in the preparation if DNA-rich materials are used. For this reason we recommend to use lower quantities of sample if it has to be used in RT-PCR.



3.2 Preparaciones preliminares

- **Reconstituir la DNasa I libre de RNasa liofilizada, añadir 540 µl de agua libre de nucleasas al vial** e incubar 1 minuto a temperatura ambiente, mezclar hasta disolver la DNasa I. Dispensar en alícuotas y conservar a -20°C. No descongelar/congelar más de 3 veces las alícuotas.
- **Añadir 50 ml de alcohol 100 % a la solución de lavado concentrada, marcar la fecha.**
- Debido a la omnipresencia de RNasas es absolutamente esencial que todo el material inicial sea congelado en Ni Líquido y conservado a -70°C. Añadir las soluciones de lisis lo antes posible, una vez añadida la solución de lisis, el lisado puede ser conservado a -70°C durante meses.
- **ATENCIÓN:** La Solución de Lisis I, la solución STOP DNasa I y el Tampón de Desalado Membrana contienen guanidina ticiannato. Utilizar guantes y gafas como protección. En caso de contacto, lavarse con agua abundantemente.
- El ARN no está protegido hasta que el material es congelado en Ni líquido o lisado en presencia de agentes desnaturizantes. Por tanto, es importante que las muestras sean congeladas en Ni líquido, inmediatamente y conservadas a -70°C, también puede utilizarse RNAlater (AMBION) o ser procesadas inmediatamente. Las muestras pueden ser conservadas en la solución de lisis después de la homogenización a -70°C durante 1 año, a 4°C durante 24 horas y hasta varias horas a temperatura ambiente.

3.2 Preliminary Preparations

- *Reconstitute the lyophilized RNase-free DNase I, add 540 µl of nuclease-free water to the vial and incubate 1 minute at room temperature, mix until the DNase I is dissolved. Dispense into aliquots and store at -20°C. Do not thaw/freeze the aliquots more than 3 times.*
- *Add 50 ml of 100% alcohol to the concentrated wash solution, mark the date.*
- *Due to the RNases omnipresence, it is absolutely necessary that all the initial material is frozen in liquid Nitrogen and stored at -70°C. Add the lysis solution as early as possible, once it has been added the lysate can be stored at -70°C for months.*
- **ATTENTION:** *The Lysis Solution I, the STOP DNase I solution and the Membrane Desalting Buffer contains Guanidine thiocyanate. Use gloves and glasses for protection. In case of contact, wash with water.*
- *RNA is not protected against digestion until the sample material is flash frozen or disrupted in the presence of Rnase inhibiting or denaturing agents. Therefore it is important that samples are flash frozen in liquid nitrogen immediately and stored at -70°C or processed as soon possible, it is also possible to use RNAlater (AMBION). The samples can be stored in the lysis solution after the homogenization at -70°C for 1 year, at 4°C for 24 hours or up to for several hours at room temperature.*

3.3 Protocolo de extracción de ARN a partir de tejidos o células

Homogenización de la muestra: homogenizar hasta 30 mg de tejido congelado y pulverizarlo con nitrógeno líquido.

IMPORTANTE: Es esencial para una eficiente preparación de ARN que todo el ARN que contiene la muestra sea liberado de las células por la homogenización con un homogenizador mecánico (tipo Polytron), tener cuidado en mantener el rotor sumergido para evitar formar mucha espuma. Para los tejidos frescos y blandos se recomienda utilizar el homogenizador; para los tejidos frescos duros o ricos en RNasas pulverizar con Ni líquido. Para los tejidos

congelados blandos o pequeñas piezas utilizar el homogenizador; Para todos los demás tejidos congelados pulverizar con Ni líquido.

En el caso de células en cultivo, recolectar hasta 5×10^6 células eucariotas mediante centrifugación y lisarlas por la adición de la Solución de Lisis I directamente.

1. Añadir 350 µl de Solución de Lisis I + 3.5 µl de β-mercaptoetanol al tejido pulverizado o pellet celular y agitar con vortex vigorosamente.
2. Reducir la viscosidad y limpiar el lisado por filtración a través de una columna de

- filtración.** Colocar la columna de filtración en un tubo de recolección, aplicar el lisado y **centrifugar 1 minuto a 11.000 x g.** Transferir el filtrado a un nuevo tubo de centrifuga. **No agitar el pellet** de desechos celulares que se puede observar en el fondo del tubo de recolección después de la centrifugación.
3. Añadir **350 µl de Etanol 70 %** al filtrado resultante del paso 2 y mezclar por vortex o pipeteo. Después de añadirse el etanol se puede observar un precipitado que no afectará al proceso, asegurarse de cargar todo el precipitado en la columna.
 4. Coger una **columna de unión ARN** más su tubo de recolección y añadir el lisado. Centrifugar a **8.000xg (10.000 rpm.)** durante **30 segundos.** Colocar la columna en un nuevo tubo de recolección. La capacidad máxima de la columna es de 750 µl. Repetir el proceso si se utilizan volúmenes mayores.
 5. Añadir **350 µl de Tampón de Desalado Membrana** y centrifugar a **máxima velocidad (11.000 xg)** durante **1 minuto** para secar la membrana. La eliminación de las sales producirá una digestión de la DNasa I mucho más efectiva. Evitar el contacto del final de la columna con el líquido a desechar.
 6. Preparar la **mezcla de reacción de la DNasa** en un microtubo estéril, para cada extracción, añadir **10 µl de DNasa I** reconstituida y **90 µl de Tampón de Reacción DNasa I.** Mezclar.
 7. Aplicar **95 µl de la mezcla de reacción de la DNasa** directamente en el centro de la membrana de sílica de la columna. Incubar a **temperatura ambiente** durante **15 minutos.**
 8. Añadir **200 µl Solución STOP/DNasaI** a la columna. Centrifugar a **8.000 xg** durante **30 segundos.** Colocar la columna en un nuevo tubo de recolección. Este tampón inactivará la DNasaI.
 9. Añadir **600 µl de Solución de Lavado** a la columna. Centrifugar a **8.000 xg** durante **30 segundos.** Desechar el líquido y colocar de nuevo la columna en el tubo de recolección.
 10. Añadir **250 µl de Solución de Lavado** a la columna. Centrifugar **2 minutos a máxima velocidad (11.000 x g)** para secar completamente la membrana. Colocar la columna en un microtubo de 1.5 ml (suministrado). Si por alguna razón, el líquido toca la columna después de la centrifugación, repetir el proceso.
 11. Añadir **30 µl de Agua libre de Nucleasas** (suministrada) en la columna, asegurándose de que queda toda bien empapada. **Incubar 1 minuto a temperatura ambiente.** Centrifugar a **máxima velocidad (11.000 x g)** durante **1 minuto**
 12. Añadir de nuevo otros **30 µl de Agua libre de Nucleasas** en la misma columna, manteniendo también el tubo de recolección y centrifugar a **máxima velocidad (11.000 x g)** durante **1 minuto.** En total se obtendrán unos **60 µl de ARN**

3.3 Protocol for RNA extraction from tissues or cultured cells

Homogenization of sample: Disrupt up to 30 mg of tissue.

IMPORTANT: *It is necessary for efficient RNA preparation that all the RNA contained in the sample is released from the cells by disruption with a mechanical homogenizator (Polytron) and that the viscosity of the sample is reduced by homogenization, be careful to keep the rotor submerged to avoid forming too much foam.*

For fresh and soft tissues use the homogenizator; for fresh and hard tissues or RNase-rich tissues grind the sample to a fine powder with liquid Nitrogen. For frozen soft tissues use the homogenizator; for the rest of tissues grind the sample to a fine powder with liquid Nitrogen.

Up to 5 x 10⁶ cultured cells can be collected by centrifugation and directly lysated by the addition of the Lysis I solution.

1. *Add 350 µl of Lysis I Solution + 3.5 µl of β-mercaptoethanol to the ground tissue or to the cell pellet and shake vigorously.*
2. *Reduce the viscosity and clear the lysate by filtration through a filtration column. Place the filtration column in a collection tube, apply the lysate and centrifuge 1 minute at 11.000 x g. Transfer the filtrate into a new centrifuge tube. Do not shake the pellet from cell debris, which can be observed at the bottom of the collection tube after the centrifugation.*
3. *Add 350 µl of 70% Ethanol to the filtrate obtained in step 2 and mix by vortex or pipette. After addition of ethanol a stringy precipitate may become visible which will not affect the RNA isolation. Be sure to load all of the precipitate on the column.*
4. *Take one RNA binding column plus collection tube and load the lysate. Centrifuge at 8.000xg (10.000 rpm.) for 30 seconds. Place the column in a new collection tube. Maximal loading capacity column is 750 µl. Repeat the procedure if larger volumes are to be processed.*
5. *Add 350 µl of Membrane Desalting Buffer and centrifuge at maximum speed (11.000 xg) for 1 minute to dry the membrane. The salts*

removal will make the following a DNase digestion much more effective. Avoid the column contact with the remaining liquid.



6. Prepare the **DNase reaction mixture** in a sterile microtube, for each isolation, add **10 µl of reconstituted DNase I to 90 µl of DNase I reaction Buffer**. Mix.
7. Apply **95 µl of the DNase reaction mixture** directly onto the centre of the silica membrane of the column. Incubate at **room temperature for 15 minutes**.
8. Add **200 µl of STOP/DNase I Solution** to the column. Centrifuge at **8.000 xg for 30 seconds**. Place the column in a new collection tube. This buffer will inactivate the DNase I.
9. Add **600 µl of Wash Solution** to the column. Centrifuge at **8.000 xg for 30 seconds**. Remove the liquid and place the column back into the collection tube.
10. Add **250 µl of Wash Solution** to the column. Centrifuge for **2 minutes at maximum speed (11.000 x g)** to completely dry the membrane. Place the column into a 1.5 ml microtube (supplied). If for any reason the liquid touches the column after the centrifugation, repeat the process.
11. Elute the RNA in **30 µl of Nuclease-free Water** (supplied), be sure that all the membrane is well soaked. **Incubate for 1 minute at room temperature**. Centrifuge at **maximum speed (11.000 x g)** for **1 minute**.
12. Add again **30 µl of Nuclease-free Water** to the same column, with the same collection tube. Centrifuge at **maximum speed (11.000 x g)** for **1 minute**. Finally it will be obtained **60 µl of RNA**

3.4 Protocolo de extracción de ARN a partir de fluidos biológicos

1. No se requiere homogenización de la muestra.
2. Añadir **350 µl de Solución de Lisis I a 100 µl de muestra**. Agitar mediante vortex vigorosamente. No se requiere filtración del lisado.
3. Añadir **350 µl de Etanol 70 %** al filtrado resultante del paso 2 y mezclar por vortex o pipeteo. Después de añadirse el etanol se puede observar un precipitado que no afectará al proceso, asegurarse de cargar todo el precipitado en la columna.
4. Coger una **columna de unión ARN** más su tubo de recolección y añadir el lisado. Centrifugar a **8.000xg (10.000 rpm.)** durante **30 segundos**. Colocar la columna en un nuevo tubo de recolección. La capacidad máxima de la columna es de 750 µl. Repetir el proceso si se utilizan volúmenes mayores.
5. Añadir **350 µl de Tampón de Desalado Membrana** y centrifugar a **máxima velocidad (11.000 xg)** durante **1 minuto** para secar la membrana. La eliminación de las sales producirá una digestión de la DNasa I mucho más efectiva. Evitar el contacto del final de la columna con el líquido a desechar.
6. Preparar la **mezcla de reacción de la DNasa** en un microtubo estéril, para cada extracción, añadir **10 µl de DNasa I** reconstituida y **90 µl de Tampón de Reacción DNasa I**. Mezclar.
7. Aplicar **95 µl de la mezcla de reacción de la DNasa** directamente en el centro de la membrana de sílica de la columna. Incubar a **temperatura ambiente** durante **15 minutos**.
8. Añadir **200 µl Solución STOP/DNasaI** a la columna. Centrifugar a **8.000 xg** durante **30 segundos**. Colocar la columna en un nuevo tubo de recolección. Este tampón inactivará la DNasaI.
9. Añadir **600 µl de Solución de Lavado** a la columna. Centrifugar a **8.000 xg** durante **30 segundos**. Desechar el líquido y colocar de nuevo la columna en el tubo de recolección.
10. Añadir **250 µl de Solución de Lavado** a la columna. Centrifugar **2 minutos a máxima velocidad (11.000 x g)** para secar completamente la membrana. Colocar la columna en un microtubo de 1.5 ml (suministrado). Si por alguna razón, el líquido toca la columna después de la centrifugación, repetir el proceso.
11. Añadir **30 µl de Agua libre de Nucleasas** (suministrada) en la columna, asegurándose de que queda toda bien empapada. **Incubar 1 minuto a temperatura ambiente**. Centrifugar a **máxima velocidad (11.000 x g)** durante **1 minuto**
12. Añadir de nuevo otros **30 µl de Agua libre de Nucleasas** en la misma columna, manteniendo también el tubo de recolección y centrifugar a **máxima velocidad (11.000 x g)** durante **1 minuto**. En total se obtendrán unos **60 µl de ARN**

3.4 Protocol for RNA extraction from biologicals fluids

1. It does not require the sample homogenization.
2. Add **350 µl of Lysis I Solution to 100 µl of sample**. Shake vigorously with vortex. It is not necessary to filtrate the lysate.
3. Add **350 µl of Ethanol 70 %** to the filtrate obtained in step 2 and mix with vortex or pipette. After addition of ethanol a stringy precipitate may become visible which will not affect the RNA isolation. Be sure to load all of the precipitate on the column.
4. Take one **RNA binding column** plus collection tube and load the lysate. Centrifuge at 8.000xg (**10.000 rpm.**) for **30 seconds**. Place the column in a new collection tube. Maximal loading capacity column is 750 µl. Repeat the procedure if larger volumes are to be processed.
5. Add **350 µl of Membrane Desalting Buffer** and centrifuge at **maximum speed (11.000 xg)** for **1 minute** to dry the membrane. The salts removal will make the following a DNase digestion much more effective. Avoid the column contact with the remaining liquid.
6. Prepare the **DNase reaction mixture** in a sterile microtube, for each isolation, add **10 µl of reconstituted DNase I to 90 µl of DNase I reaction Buffer**. Mix.
7. Apply **95 µl of the DNase reaction mixture** directly onto the centre of the silica membrane of the column. Incubate at **room temperature** for **15 minutes**.
8. Add **200 µl of STOP/DNase I Solution** to the column. Centrifuge at **8.000 xg** for **30 seconds**. Place the column in a new collection tube. This buffer will inactivate the DNase I.
9. Add **600 µl of Wash Solution** to the column. Centrifuge at **8.000 xg** for **30 seconds**. Remove the liquid and place the column back into the collection tube.
10. Add **250 µl of Wash Solution** to the column. Centrifuge for **2 minutes at maximum speed (11.000 x g)** to completely dry the membrane. Place the column into a 1.5 ml microtube (supplied). If for any reason the liquid touches the column after the centrifugation, repeat the process.
11. Elute the RNA in **30 µl of Nuclease-free Water** (supplied), be sure that all the membrane is well soaked. **Incubate for 1 minute at room temperature**. Centrifuge at **maximum speed (11.000 x g)** for **1 minute**.
12. Add again **30 µl of Nuclease-free Water** to the same column, with the same collection tube. Centrifuge at **maximum speed (11.000 x g)** for **1 minute**. Finally it will be obtained **60 µl of RNA**

3.5 Protocolo de extracción de ARN a partir de hasta 10⁹ células bacterianas

1. **Resuspender el pellet bacteriano (cepas Gram -) en 100 µl TE** (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8.0) que contenga **0.2 mg/ ml lisozima**. Agitar mediante vortex vigorosamente e incubar a 37°C durante 10 minutos. Para bacterias **Gram +**, resuspender el pellet en **100 µl TE** (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8.0) que contenga **2 mg/ ml lisozima**. Puede ser necesario optimizar el tiempo de incubación y la concentración de lisozima dependiendo de la cepa bacteriana.
2. Añadir **350 µl de Solución de Lisis I + 3.5 µl de β-mercaptoetanol** a la suspensión y agitar mediante vortex vigorosamente.
3. Reducir la viscosidad y limpiar el lisado por filtración a través de **una columna de filtración**. Colocar la columna de filtración en un tubo de recolección, aplicar el lisado y **centrifugar 1 minuto a 11.000 x g**. Transferir el filtrado a un nuevo tubo de centrifuga. **No agitar el pellet** de desechos celulares que se puede observar en el fondo del tubo de recolección después de la centrifugación.
4. Añadir **350 µl de Etanol 70 %** al filtrado resultante del paso 2 y mezclar por vortex o pipeteo. Después de añadirse el etanol se puede observar un precipitado que no afectará al proceso, asegurarse de cargar todo el precipitado en la columna.
5. Coger una **columna de unión ARN** más su tubo de recolección y añadir el lisado. Centrifugar a **8.000xg (10.000 rpm.)** durante **30 segundos**. Colocar la columna en un nuevo tubo de recolección. La capacidad máxima de la columna es de 750 µl. Repetir el proceso si se utilizan volúmenes mayores.
6. Añadir **350 µl de Tampón de Desalado Membrana** y centrifugar a **máxima velocidad (11.000 xg)** durante **1 minuto** para secar la membrana. La eliminación de las sales producirá una digestión de la DNasa I mucho más efectiva. Evitar el contacto del final de la columna con el líquido a desechar.



7. Preparar la **mezcla de reacción de la DNasa** en un microtubo estéril, para cada extracción, añadir **10 µl de DNasa I** reconstituida y **90 µl de Tampón de Reacción DNasa I**. Mezclar.
8. Aplicar **95 µl de la mezcla de reacción de la DNasa** directamente en el centro de la
9. membrana de sílica de la columna. Incubar a **temperatura ambiente** durante **15 minutos**.
10. Añadir **200 µl Solución STOP/DNasaI** a la columna. Centrifugar a **8.000 xg** durante **30 segundos**. Colocar la columna en un nuevo tubo de recolección. Este tampón inactivará la DNasaI.
11. Añadir **600 µl de Solución de Lavado** a la columna. Centrifugar a **8.000 xg** durante **30 segundos**. Desechar el líquido y colocar de nuevo la columna en el tubo de recolección.
12. Añadir **250 µl de Solución de Lavado** a la columna. Centrifugar **2 minutos** a **máxima velocidad (11.000 x g)** para secar

completamente la membrana. Colocar la columna en un microtubo de 1.5 ml (suministrado). Si por alguna razón, el líquido

toca la columna después de la centrifugación, repetir el proceso.

13. Añadir **30 µl de Agua libre de Nucleasas** (suministrada) en la columna, asegurándose de que queda toda bien empapada. **Incubar 1 minuto a temperatura ambiente**. Centrifugar a **máxima velocidad (11.000 x g)** durante **1 minuto**
14. Añadir de nuevo otros **30 µl de Agua libre de Nucleasas** en la misma columna, manteniendo también el tubo de recolección y centrifugar a **máxima velocidad (11.000 x g)** durante **1 minuto**. En total se obtendrán unos **60 µl de ARN**

3.5 Protocol for RNA extraction from up to 10⁹ bacteria cells

1. *Resuspend the bacteria pellet (Gram - strains) in 100 µl TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8.0) containing 0.2 mg/ml lysozyme. Shake vigorously with vortex and incubate at 37°C for 10 minutes. For Gram + bacteria, resuspend the pellet in 100 µl TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8.0) containing 2 mg/ml lysozyme. It may be necessary to optimize the incubation time and the concentration of lysozyme depending on the bacteria strain.*
2. *Add 350 µl of Lysis I Solution + 3.5 µl of β-mercaptoethanol to the suspension and shake vigorously with vortex.*
3. *Reduce the viscosity and wash the lysate by filtration through a filtration column. Place the filtration column in a collection tube, pour the lysate and centrifuge 1 minute at 11.000 x g. Transfer the filtrate into a new centrifuge tube. Do not shake the pellet from cell debris, which can be observed at the bottom of the collection tube after the centrifugation.*
4. *Add 350 µl of Ethanol 70 % to the filtrated obtained in step 2 and mix with vortex or pipette. After addition of ethanol a stringy precipitate may become visible which will not affect the RNA isolation. Be sure to load all of the precipitate on the column.*
5. *Take one RNA binding column plus collection tube and load the lysate. Centrifuge at 8.000xg (10.000 rpm.) for 30 seconds. Place the column in a new collection tube. Maximal loading capacity column is 750 µl. Repeat the procedure if larger volumes are to be processed.*
6. *Add 350 µl of Membrane Desalting Buffer and centrifuge at maximum speed (11.000 xg) for 1 minute to dry the membrane. The salts removal will make the following a DNase digestion much more effective. Avoid the column contact with the remaining liquid.*
7. *Prepare the DNase reaction mixture in a sterile microtube, for each isolation, add 10 µl of reconstituted DNase I to 90 µl of DNase I reaction Buffer. Mix.*
9. *Apply 95 µl of the DNase reaction mixture directly onto the centre of the silica membrane of the column. Incubate at room temperature for 15 minutes.*
10. *Add 200 µl of STOP/DNase I Solution to the column. Centrifuge at 8.000 xg for 30 seconds. Place the column in a new collection tube. This buffer will inactivate the DNase I.*
11. *Add 600 µl of Wash Solution to the column. Centrifuge at 8.000 xg for 30 seconds. Remove the liquid and place the column back into the collection tube.*
12. *Add 250 µl of Wash Solution to the column. Centrifuge for 2 minutes at maximum speed (11.000 x g) to completely dry the membrane. Place the column into a 1.5 ml microtube (supplied). If for any reason the liquid touches the column after the centrifugation, repeat the process.*
13. *Elute the RNA in 30 µl of Nuclease-free Water (supplied), be sure that all the membrane is well soaked. Incubate for 1 minute at room*

temperature .Centrifuge at maximum speed (11.000 x g) for 1 minute.

14. Add again **30 µl of Nuclease-free Water** to the same column, with the same collection tube.

Centrifuge at maximum speed (11.000 x g) for 1 minute. Finally it will be obtained 60 µl of RNA

3.6 Protocolo de extracción de ARN a partir de hasta 10⁸ células de levadura

1. Centrifugar **2-5 ml** de un cultivo YPD de levaduras. Resuspender el pellet en **Tampón sorbitol/liticasa** (50-100 U liticasa o zimolasa en 1M sorbitol/ 100 mM EDTA) e incubar a **30°C durante 30 minutos**. Eliminar los esferoplastos resultantes por centrifugación (1.000 xg) durante 10 minutos. Puede ser necesario la optimización del tiempo de incubación y la concentración de liticasa/zimolasa dependiendo de la cepa de levadura.
2. Añadir **350 µl de Solución de Lisis I + 3.5 µl de β-mercaptoetanol** a la suspensión y agitar mediante vortex vigorosamente.
3. Reducir la viscosidad y limpiar el lisado por filtración a través de **una columna de filtración**. Colocar la columna de filtración en un tubo de recolección, aplicar el lisado y **centrifugar 1 minuto a 11.000 x g**. Transferir el filtrado a un nuevo tubo de centrifuga. **No agitar el pellet** de desechos celulares que se puede observar en el fondo del tubo de recolección después de la centrifugación.
4. Añadir **350 µl de Etanol 70 %** al filtrado resultante del paso 2 y mezclar por vortex o pipeteo. Después de añadirse el etanol se puede observar un precipitado que no afectará al proceso, asegurarse de cargar todo el precipitado en la columna.
5. Coger una **columna de unión ARN** más su tubo de recolección y añadir el lisado. Centrifugar a **8.000xg (10.000 rpm.)** durante **30 segundos**. Colocar la columna en un nuevo tubo de recolección. La capacidad máxima de la columna es de 750 µl. Repetir el proceso si se utilizan volúmenes mayores.
6. Añadir **350 µl de Tampón de Desalado Membrana** y centrifugar a **máxima velocidad (11.000 xg)** durante **1 minuto** para secar la membrana. La eliminación de las sales producirá una digestión de la DNasa I mucho más efectiva. Evitar el contacto del final de la columna con el líquido a desechar.
7. Preparar la **mezcla de reacción de la DNasa** en un microtubo estéril, para cada extracción, añadir **10 µl de DNasa I** reconstituida y **90 µl de Tampón de Reacción DNasa I**. Mezclar.
8. Aplicar **95 µl de la mezcla de reacción de la DNasa** directamente en el centro de la membrana de sílica de la columna. Incubar a **temperatura ambiente** durante **15 minutos**.
9. Añadir **200 µl Solución STOP/DNasaI** a la columna. Centrifugar a **8.000 xg** durante **30 segundos**. Colocar la columna en un nuevo tubo de recolección. Este tampón inactivará la DNasaI.
10. Añadir **600 µl de Solución de Lavado** a la columna. Centrifugar a **8.000 xg** durante **30 segundos**. Desechar el líquido y colocar de nuevo la columna en el tubo de recolección.
11. Añadir **250 µl de Solución de Lavado** a la columna. Centrifugar **2 minutos a máxima velocidad (11.000 x g)** para secar completamente la membrana. Colocar la columna en un microtubo de 1.5 ml (suministrado). Si por alguna razón, el líquido toca la columna después de la centrifugación, repetir el proceso.
12. Añadir **30 µl de Agua libre de Nucleasas** (suministrada) en la columna, asegurándose de que queda toda bien empapada. **Incubar 1 minuto a temperatura ambiente**. Centrifugar a **máxima velocidad (11.000 x g)** durante **1 minuto**
13. Añadir de nuevo otros **30 µl de Agua libre de Nucleasas** en la misma columna, manteniendo también el tubo de recolección y centrifugar a **máxima velocidad (11.000 x g)** durante **1 minuto**. En total se obtendrán unos **60 µl de ARN**

3.6 Protocol for RNA extraction from up to 10⁸ yeast cells

1. Centrifuge **2-5 ml** of a YPD yeast culture. Resuspend the pellet **sorbitol/lyticase Buffer** (50-100 U lyticase or zymolase 1M sorbitol/ 100 mM EDTA) and incubate at **30°C for 30 minutes**. Remove the resultant spheroplastes by centrifugation (1.000 xg) for 10 minutes. It may be necessary o optimize the incubation time and the concentration of lyticase/zymolase depending on the yeast strain.
2. Add **350 µl of Lysis I Solution + 3.5 µl of β-mercaptoethanol** to the suspension and shake vigorously with vortex.
3. Reduce the viscosity and wash the lysate by filtration through a **filtration column**. Place the filtration column in a collection tube, pour the lysate and **centrifuge 1 minute at 11.000 xg**. Transfer the filtrate to a new centrifuge. **Do not shake the pellet** from cell debris which can be observed in the bottom of the collection tube after the centrifugation.



4. Add **350 µl of Ethanol 70 %** to the filtrate obtained in step 2 and mix with vortex or pipette. After addition of ethanol a stringy precipitate may become visible which will not affect the RNA isolation. Be sure to load all of the precipitate on the column.
5. Take one **RNA binding column** plus collection tube and load the lysate. Centrifuge at 8.000xg (**10.000 rpm.**) for **30 seconds**. Place the column in a new collection tube. Maximal loading capacity column is 750 µl. Repeat the

procedure if larger volumes are to be processed.

6. Add **350 µl of Membrane Desalting Buffer** and centrifuge at **maximum speed (11.000 xg)** for **1 minute** to dry the membrane. The salts removal will make the following a DNase digestion much more effective. Avoid the column contact with the remaining liquid.
7. Prepare the **DNase reaction mixture** in a sterile microtube, for each isolation, add **10 µl of reconstituted DNase I** to **90 µl of DNase I reaction Buffer**. Mix.
8. Apply **95 µl of the DNase reaction mixture** directly onto the centre of the silica membrane of the column. Incubate at **room temperature** for **15 minutes**.
9. Add **200 µl of STOP/DNase I Solution** to the column. Centrifuge at **8.000 xg** for **30 seconds**. Place the column in a new collection tube. This buffer will inactivate the DNase I.

10. Add **600 µl of Wash Solution** to the column. Centrifuge at **8.000 xg** for **30 seconds**. Remove

the liquid and place the column back into the collection tube.

11. Add **250 µl of Wash Solution** to the column. Centrifuge for **2 minutes at maximum speed (11.000 x g)** to completely dry the membrane. Place the column into a 1.5 ml microtube (supplied). If for any reason the liquid touches the column after the centrifugation, repeat the process.
12. Elute the RNA in **30 µl of Nuclease-free Water** (supplied), be sure that all the membrane is well soaked. **Incubate for 1 minute at room temperature**. Centrifuge at **maximum speed (11.000 x g)** for **1 minute**.
13. Add again **30 µl of Nuclease-free Water** to the same column, with the same collection tube. Centrifuge at **maximum speed (11.000 x g)** for **1 minute**. Finally it will be obtained **60 µl of RNA**

3.7 Protocolo para el “Clean-Up” de ARN de mezcla de reacciones

1. La homogenización no necesaria.
2. Añadir **2.5 volúmenes de Solución de Lisis I** por **1 volumen** de muestra y agitar mediante vortex. La máxima capacidad de la columna es de 750 µl, repetir el proceso si se procesan volúmenes superiores.
3. La filtración no es necesaria.
4. Añadir la misma cantidad de etanol 70% al lisado y agitar mediante vortex.
5. Coger una **columna de unión ARN** más su tubo de recolección y añadir el lisado. Centrifugar a **8.000xg (10.000 rpm.)** durante **30 segundos**. Colocar la columna en un nuevo tubo de recolección. La capacidad máxima de la columna es de 750 µl. Repetir el proceso si se utilizan volúmenes mayores.
6. Añadir **350 µl de Tampón de Desalado Membrana** y centrifugar a **máxima velocidad (11.000 xg)** durante **1 minuto** para secar la membrana. La eliminación de las sales producirá una digestión de la DNasa I mucho más efectiva. Evitar el contacto del final de la columna con el líquido a desechar.
7. Preparar la **mezcla de reacción de la DNasa** en un microtubo estéril, para cada extracción, añadir **10 µl de DNasa I** reconstituida y **90 µl de Tampón de Reacción DNasa I**. Mezclar.
8. Aplicar **95 µl de la mezcla de reacción de la DNasa** directamente en el centro de la membrana de sílica de la columna. Incubar a **temperatura ambiente** durante **15 minutos**.
9. Añadir **200 µl Solución STOP/DNasaI** a la columna. Centrifugar a **8.000 xg** durante **30 segundos**. Colocar la columna en un nuevo tubo de recolección. Este tampón inactivará la DNasaI.
10. Añadir **600 µl de Solución de Lavado** a la columna. Centrifugar a **8.000 xg** durante **30 segundos**. Desechar el líquido y colocar de nuevo la columna en el tubo de recolección.
11. Añadir **250 µl de Solución de Lavado** a la columna. Centrifugar **2 minutos a máxima velocidad (11.000 x g)** para secar completamente la membrana. Colocar la columna en un microtubo de 1.5 ml (suministrado). Si por alguna razón, el líquido

toca la columna después de la centrifugación, repetir el proceso.

12. Añadir **30 µl de Agua libre de Nucleasas** (suministrada) en la columna, asegurándose de que queda toda bien empapada. **Incubar 1 minuto a temperatura ambiente.** Centrifugar **a máxima velocidad (11.000 x g)** durante **1 minuto**

13. Añadir de nuevo otros **30 µl de Agua libre de Nucleasas** en la misma columna, manteniendo también el tubo de recolección y centrifugar **a máxima velocidad (11.000 x g)** durante **1 minuto**. En total se obtendrán unos **60 µl de ARN**

3.7 Protocol for RNA Clean-up from reaction mixtures

1. *The homogenization is not necessary.*
2. *Add 2.5 volumes of Lysis I Solution per 1 volume of sample and shake with vortex. . Maximal loading capacity column is 750 µl. Repeat the procedure if larger volumes are to be processed.*
3. *The filtration is not necessary.*
4. *Add the same quantity of 70% ethanol to the lysate and shake with vortex.*
5. *Take one RNA binding column plus collection tube and load the lysate. Centrifuge at 8.000xg (10.000 rpm.) for 30 seconds. Place the column in a new collection tube. Maximal loading capacity column is 750 µl. Repeat the procedure if larger volumes are to be processed.*
6. *Add 350 µl of Membrane Desalting Buffer and centrifuge at maximum speed (11.000 xg) for 1 minute to dry the membrane. The salts removal will make the following a DNase digestion much more effective. Avoid the column contact with the remaining liquid.*
7. *Prepare the DNase reaction mixture in a sterile microtube, for each isolation, add 10 µl of reconstituted DNase I to 90 µl of DNase I reaction Buffer. Mix.*
8. *Apply 95 µl of the DNase reaction mixture directly onto the centre of the silica membrane of the column. Incubate at room temperature for 15 minutes.*
9. *Add 200 µl of STOP/DNase I Solution to the column. Centrifuge at 8.000 xg for 30 seconds. Place the column in a new collection tube. This buffer will inactivate the DNase I.*
10. *Add 600 µl of Wash Solution to the column. Centrifuge at 8.000 xg for 30 seconds. Remove the liquid and place the column back into the collection tube.*
11. *Add 250 µl of Wash Solution to the column. Centrifuge for 2 minutes at maximum speed (11.000 x g) to completely dry the membrane. Place the column into a 1.5 ml microtube (supplied). If for any reason the liquid touches the column after the centrifugation, repeat the process.*
12. *Elute the RNA in 30 µl of Nuclease-free Water (supplied), be sure that all the membrane is well soaked. Incubate for 1 minute at room temperature .Centrifuge at maximum speed (11.000 x g) for 1 minute.*
13. *Add again 30 µl of Nuclease-free Water to the same column, with the same collection tube. Centrifuge at maximum speed (11.000 x g) for 1 minute. Finally it will be obtained 60 µl of RNA*

4. GUIA DE PROBLEMAS Y POSIBLES SOLUCIONES TROUBLESHOOTING

- | | |
|---|---|
| <ol style="list-style-type: none">1. ARN degradado o no se obtiene ARN<ol style="list-style-type: none">1.1. Intentar crear una zona de trabajo con un ambiente libre de RNasas, se puede utilizar para limpiar las superficies y material el RNasa Remove (Ref.RD056). Cambiar de guantes frecuentemente. Se recomienda el uso de tubos estériles y que estén cerrados siempre que se pueda durante el proceso2. Baja calidad o poca cantidad del ARN obtenido<ol style="list-style-type: none">2.1. Reactivos no reconstituidos adecuadamente. Añadir la cantidad indicada de agua libre de nucleasas al vial de la DNasaI y etanol a la Solución de lavado concentrada.2.2. La muestra y reactivos no han sido mezclados completamente | <ol style="list-style-type: none">2.3. No se ha añadido etanol después de la lisis. La unión del ARN a la membrana de sílica es sólo efectiva en presencia de alcohol2.4. Conservar todos los componentes del kit como se indica. El almacenamiento a bajas temperaturas puede producir precipitación de sales |
|---|---|

1. Degraded RNA or not RNA obtaining

1.1. *Try to create an RNase-free area inside your lab. You can use RNase Remove (Ref.RD056) for cleaning the material and surfaces. Change gloves frequently. It is recommended to use sterile tubes and to keep them close when possible during the process.*

2. Low quality or low quantity of RNA obtained

2.1. *Reagents not correctly reconstituted. Add the indicated quantity of nuclease-free water to the DNase I vial and Ethanol to the concentrated wash Solution.*

2.2. *The samples and the reagents have not been completely mixed.*

2.3. *The ethanol has not been added after the lysis. The RNA will only bind to the silica membrane under the presence of alcohol*

2.4. *Store the kit components as indicated in the protocol. Low temperature storages can cause salts precipitation.*

2.5. *Keep the containers correctly closed to prevent evaporation*



2.5. Mantener los envases bien cerrados para prevenir la evaporación o contaminación

2.6. La muestra no ha sido conservada apropiadamente. Siempre que se pueda utilizar material fresco, sino es posible, congelar la muestra en Ni líquido y mantenerlas a -70°C hasta añadir la Solución de Lisis.

2.7. Insuficiente homogenización del material inicial, siempre pulverizar las muestras en presencia de Ni Líquido. Utilizar las columnas de filtración.

3. Sobrecarga de la membrana

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

4. Contaminación con ADN genómico

4.1. DNasa I no activa. Reconstituir y almacenar la DNasa I según las instrucciones proporcionadas.

4.2. Pipetear la solución de la DNasa I directamente en el centro de la membrana de sílica.

4.3. Reducir la cantidad de material inicial utilizado.

5. Bajo rendimiento del ARN en las siguientes aplicaciones o experimentos

5.1. La solución de lavado que contiene etanol no ha sido eliminada completamente. Asegurarse que el final de la columna no contacta con el líquido después del 2° lavado.

5.2. Comprobar que la solución de lavado ha sido equilibrada a temperatura ambiente antes de usar. Lavar a bajas temperaturas produce un descenso en la eficiencia de eliminar las sales.

- 2.6. *The sample hasn't been correctly preserved. Use, if possible, fresh material. If it is not possible, freeze the sample in liquid Nitrogen and store them at -70°C until you add the Lysis Solution*
- 2.7. *The initial material hasn't been enough homogenized. Always spray the samples in presence of liquid Nitrogen. Use the filtration columns.*
3. **Overloaded membrane**
 - 3.1. *Too much initial material has been used. An overloaded membrane can lead to a low yield. Reduce the sample quantity or use a bigger quantity of Lysis Solution.*
4. **Contamination with Genomic DNA**
 - 4.1. *Not active DNase I. Reconstitute and store the DNase I according to the supplied instructions.*
 - 4.2. *Pipette the DNase I solution directly on the centre of the silica membrane.*
 - 4.3. *Reduce the sample starting quantity.*
5. **Low RNA yield in following applications or experiments**
 - 5.1. *The Wash solution that contains ethanol has not been completely removed. Be sure that the end of the column does not touch the liquid after 2nd wash.*
 - 5.2. *Check that the Wash solution has been balanced at room temperature before use. Washing at low temperatures produces a decrease on the salt removal efficiency.*

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAPHY

- Martin, A., Adam, H., Díaz-Mendoza, M., Żurczak, M., González-Schain, N. D., & Suárez-López, P. (2009). Graft-transmissible induction of potato tuberization by the microRNA miR172. *Development*, 136(17), 2873-2881.
- Escames, G., López, L. C., Ortiz, F., López, A., García, J. A., Ros, E., & Acuña-Castroviejo, D. (2007). Attenuation of cardiac mitochondrial dysfunction by melatonin in septic mice. *FEBS Journal*, 274(8), 2135-2147.