

# BIOTOOLS

BIOTOOLS B&M LABS.S.A.

*Fabricado por:*

BIOTOOLS B&M Labs, S.A.  
Valle de Tobalina - 52 - Nave 39  
28021 Madrid  
España

Tel. (34) 91 710 00 74  
Fax (34) 91 505 31 18  
e-mail: [info@biotools.eu](mailto:info@biotools.eu)  
[www.biotools.eu](http://www.biotools.eu)

## **SPEEDTOOLS PLASMID DNA PURIFICATION KIT**

*preparaciones en pequeña escala de ADN  
plasmídico puro (0.5 - 2 ml de cultivos)*

### **Instrucciones de Uso** (Ref. 21.220/1/2)

**PLEASE READ THE INSTRUCTIONS FOR USE THOROUGHLY BEFORE USING THE KIT,  
ESPECIALLY IF YOU ARE NOT FAMILIAR WITH THE PROTOCOL.**

## 1. EXPLICACIÓN DEL KIT

El Kit **SPEEDTOOLS PLASMID DNA PURIFICATION** permite una rápida y fácil preparación de ADN plasmídico de alta pureza (minipreps). El kit se basa en una lisis alcalina seguido del paso de unión del ADN plasmídico a una membrana de sílica y posterior elución del ADN puro.

En un primer paso se sedimentan las células procedentes de un cultivo bacteriano (0.5-2 ml) y se suspenden en Buffer R. Las células suspendidas se someten a un proceso de lisis alcalina con SDS mediante adicción de Buffer L. El lisado resultante es neutralizado con el Buffer N que además crea las condiciones de unión a la membrana de sílica de la columna. El ADN genómico, proteínas, restos celulares, etc., son sedimentados mediante centrifugación. El ADN plasmídico que se encuentra en el sobrenadante se carga en la columna y se lava con la Solución W. Este sencillo paso de lavado es suficiente para eliminar contaminantes que hayan quedado atrapados en la membrana como sales, metabolitos y componentes celulares. Finalmente el ADN plasmídico se eluye en Buffer E ligeramente alcalino y con baja fuerza iónica.

## 2. CARACTERÍSTICAS DEL KIT

La tecnología desarrollada en el kit **SPEEDTOOLS PLASMID DNA PURIFICATION** permite el aislamiento y purificación de ADN plasmídico. El protocolo así como los reactivos incluidos en el kit han sido optimizados para proporcionar un alto rendimiento y pureza del producto final. El tiempo de preparación se ha reducido al mínimo.

El kit es adecuado para cualquier plásmido siendo el tamaño más efectivo de plásmido < 10 Kb. Se han obtenido buenos resultados con plásmidos de 20 Kb, e incluso con plásmidos de gran tamaño, aunque en estos últimos el rendimiento obtenido es menor.

El ADN plasmídico obtenido es adecuado para múltiples usos como PCR, digestión con enzimas de restricción, marcaje, clonación, secuenciación, etc.

Material de Partida	Rendimiento	Tiempo por Preparación	Ratio A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>
0.5 - 2 ml de cultivo bacteriano	Hasta 20 µg (2 ml culture)	< 15 min/4 preps	1.8-2.1

## 3. CONTENIDO DEL KIT

SPEEDTOOLS PLASMID DNA PURIFICATION KIT			
	10 Preps Ref. 21.220	50 Preps Ref. 21.221	250 Preps Ref. 21.222
BUFFER R Buffer de resuspensión	2 x 2 ml	15 ml	5 x 15 ml
BUFFER L (concentrated) Buffer de lisis	2 x 2 ml	15 ml	5 x 15 ml
BUFFER N Buffer de neutralización	2 x 2 ml	15 ml	5 x 15 ml
Solution W Solución de lavado	10 ml	12 ml	5 x 12 ml
Buffer E Buffer de elución	2 ml	10 ml	5 x 10 ml
BIOTOOLS Binding Column Columnas de unión	10	50	5 x 50
Collecting Tubes (2 ml) Tubos de 2 ml	10	50	5 x 50
Collecting Tubes (1.5 ml) Tubos de 1.5 ml	10	50	5 x 50
Manual	1	1	5 x 1

#### 4. REACTIVOS Y EQUIPO REQUERIDO PERO NO PROVISTO

- Etanol 96-100%
- Centrifuga y microtubos de 1.5 y 2 ml
- Pipetas automáticas y puntas de pipetas
- Vortex

#### 5. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

Los reactivos incluidos en el kit pueden almacenarse a temperatura ambiente (20-25°C) siendo estables hasta su fecha de caducidad impresa en la etiqueta del Kit.

Antes de comenzar cualquier ensayo con **SPEEDTOOLS PLASMID DNA PURIFICATION KIT** prepare las siguientes soluciones:

##### **Solución de Lavado (Solution W):**

- ✓ **Formato 10 preps:** En este formato la solución se proporciona lista para usar.
- ✓ **Formato 50 preps:** Añada **48 mL** de etanol (96-100%) a la Solución W concentrada y mezcle la solución resultante. Realice una marca en la etiqueta del frasco para indicar que el etanol ha sido añadido.

Asegúrese de que todos los reactivos del kit han sido almacenados a la temperatura correcta. Si existieran precipitados en alguno de los reactivos intente disolverlos mediante calentamiento a temperatura ambiente y mezcle mediante inversión.

## 6. INSTRUCCIONES DE USO

Antes de comenzar con el protocolo prepare el siguiente reactivo Solution W (veáse la sección 5).

PASO	DESCRIPCIÓN		
1	<p><b>SEDIMENTACIÓN DE BACTERIAS Y RESUSPENSION</b></p> <p>Transfiera de <b>0.5 hasta 2 ml de cultivo</b> de una noche <i>E. Coli</i> a un microtubo de centrifuga de 2 ml. <b>Centrifugue a velocidad máxima</b> durante <b>1 min.</b> Elimine el sobrenadante en su totalidad.</p> <p>Resuspenda las células mediante pipeteo o con ayuda del vortex en <b>250 µl de Buffer R.</b> Asegúrese de que todas las células están suspendidas y no quedan sedimentos.</p>		<p>RECOLECTAR CÉLULAS <i>1 min, v. max</i></p> <p>+ 250 µl Buffer R</p>
2	<p><b>LISIS CELULAR</b></p> <p>Añada <b>250 µl de Buffer L</b> y mezcle con cuidado invirtiendo el tubo 5 veces <b>no utilice el vortex.</b> El periodo de lisis debe de ser siempre inferior a 5 min.</p> <p><b>NOTE:</b> <i>el paso de lisis alcalina y precipitación es crítico, la lisis bacteriana no debe durar más de 5 mins. El objetivo de este paso es precipitar el ADN cromosómico y de esta forma separar el ADN cromosómico del ADN plasmídico. Se recomienda no utilizar el vortex pues el estrés mecánico inducido al vortexear el tubo puede dar lugar a "shearing" o ruptura del ADN genómico. El ADN genómico debido a su alto peso molecular precipita en una solución con NaOH/SDS, pero si se ha producido shearing o rupturas permanecen solución y contamina la fracción soluble que contiene el ADN plasmídico.</i></p>		<p>+ 250 µl BUFFER L</p> <p>Mezcle</p>
3	<p><b>CLARIFICACIÓN DEL LISADO</b></p> <p>Añada <b>250 µl de Buffer N</b> y mezcle bien <b>agitando el tubo 4-6 veces.</b> Centrifugue <b>5 mins a velocidad máxima</b> 13,500-16,500 x g.</p>		<p>250 µl BUFFER N</p> <p><i>5 min, 13,500 x g</i></p>
4	<p><b>UNIÓN DEL ADN</b></p> <p>Por cada preparación tome una columna <b>Binding Column</b> e insértela en un tubo colector de 2 ml. <b>Transfiera el sobrenadante</b> clarificado al interior de la columna. <b>Incube 1 min y centrifugue</b> 1 min a 10,000 x g. <b>Elimine el filtrado.</b></p>		<p>CARGUE LA COLUMNA</p> <p>Incube RT 1 min</p> <p><i>1 min, 10,000 x g</i></p>
5	<p><b>LAVADO DE LA MEMBRANA</b></p> <p>Coloque la columna de nuevo en el tubo de 2 ml. Añada <b>750 µl de SOLUTION W</b> en la columna. <b>Centrifugue</b> 1 min a 10,000 x g y <b>elimine el filtrado.</b></p>		<p>750 µl SOLUTION W</p> <p><i>1 min, 10,000 x g</i></p>
6	<p><b>SECADO DE LA MEMBRANA</b></p> <p>Coloque la columna en el tubo de 2 ml. Para eliminar los restos de etanol procedentes de la solución de lavado <b>centrifugue 3 min a velocidad máxima</b> 13,500- 16,500 x g.</p>		<p><i>3 min, 13,500 x g</i></p>
7	<p><b>ELUCIÓN DEL ADN PLASMÍDICO</b></p> <p>Coloque la columna en un tubo nuevo de 1.5 ml. Añada en el centro de la membrana de la columna <b>50-100 µl de buffer E</b> e incube 1 min a temperatura ambiente. Para eluir el ADN plasmídico centrifugue a 10,000 x g durante 1 min.</p> <p><b>NOTA:</b> para <b>incrementar el rendimiento</b> utilice <b>mayor volumen de Buffer E</b> y aumente el tiempo de incubación con el buffer E hasta 10 min. Si quiere <b>aumentar la concentración eluya en menor volumen de Buffer E</b> (el volumen mínimo recomendado es 30 µl).</p> <p>Para transcripción in vitro eluir el ADN en ddH<sub>2</sub>O</p>		<p>+ 50-100 µl BUFFER E</p> <p>Incube 1 min</p> <p><i>1 min, 10,000 x g</i></p>

## 7. RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Problema	Causa Posible y Recomendación
Bajo rendimiento del ADN plasmídico obtenido	<p><b>Solución de lavado incorrecta</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Prepare la solución de lavado siguiendo las instrucciones de la sección 5 del manual. Para que no se evapore el etanol almacene la solución de lavado bien cerrada.</li> </ul> <p><b>Baja eficiencia del paso de elución del ADN</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Añada el Buffer E directamente en el centro de la membrana.</li> </ul> <p><b>Condiciones no óptimas del cultivo bacteriano</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Cambie las condiciones de crecimiento bacteriano (medio, tiempo, etc.).</li> </ul>
Aparece una banda adicional por debajo de la banda de ADN plasmídico supercoiled	<p><b>Banda de desnaturalización del ADN plasmídico supercoiled</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Incorrecta incubación con el buffer de lisis. Si el periodo de incubación con el buffer de lisis L se prolonga en exceso se puede producir desnaturalización del ADN plasmídico supercoiled.</li> </ul>
Contaminación del ADN plasmídico con ADN cromosómico	<p><b>El paso de lisis se realizó de forma incorrecta</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Siga las instrucciones. No utilice el vortex para lisar las células, mezcle con cuidado mediante inversión del tubo.</li> </ul> <p><b>Crecimiento bacteriano excesivo</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Reduzca el tiempo de crecimiento del cultivo bacteriano.</li> </ul>
Problemas en usos posteriores del ADN plasmídico	<p><b>Contaminación con sales</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Lave el ADN plasmídico unido a la columna según se indica en el protocolo.</li> </ul> <p><b>Contaminación con etanol del ADN plasmídico obtenido</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>No reduzca los tiempos de centrifugación si es necesario extiéndalos.</li> </ul> <p><b>Contaminación del ADN con material contaminante o material procedente de la columna</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Para sedimentar las partículas o contaminantes procedentes de la columna centrifugue el ADN plasmídico eluido a velocidad máxima durante 1 min. Tome el ADN plasmídico de la parte superior, en el fondo del tubo se encontrarán los contaminantes o partículas.</li> </ul>

## 8. INFORMACIÓN DE PEDIDOS

SPEEDTOOLS KIT	10 PREPS	50 PREPS	250 PREPS
SPEEDTOOLS DNA EXTRACTION KIT	Ref. 21.130	Ref. 21.131	Ref. 21.132
SPEEDTOOLS TISSUE DNA EXTRACTION KIT	Ref. 21.135	Ref. 21.136	Ref. 21.137
SPEEDTOOLS RNA VIRUS EXTRACTION KIT	Ref. 21.140	Ref. 21.141	Ref. 21.142
SPEEDTOOLS FOOD DNA EXTRACTION KIT	Ref. 21.175	Ref. 21.176	Ref. 21.177
SPEEDTOOLS PLANT DNA EXTRACTION	Ref. 21.170	Ref. 21.171	Ref. 21.172
SPEEDTOOLS TOTAL RNA EXTRACTION KIT	Ref. 21.210	Ref. 21.211	Ref. 21.212
SPEEDTOOLS PCR CLEAN-UP KIT	Ref. 21.200	Ref. 21.201	Ref. 21.202
SPEEDTOOLS PLASMID DNA PURIFICATION KIT	Ref. 21.220	Ref. 21.221	Ref. 21.222

## 9. LIMITACIONES Y GARANTÍA

A continuación, se citan una serie de advertencias y precauciones de uso. Para una información más completa, recomendamos leer la Hoja de Seguridad (MSDS), disponible en nuestra página Web ([www.biotoools.eu/msds.htm](http://www.biotoools.eu/msds.htm)), o mediante petición a nuestro Dpto. Técnico ([info@biotoools.eu](mailto:info@biotoools.eu)).

1. Producto para uso exclusivo en investigación.
2. La documentación incluida en el kit especifica su uso, deben seguirse fielmente las instrucciones con el fin de obtener ADN de plasmídico de alta calidad.
3. Los componentes del Kit fueron testados de acuerdo a ISO 9001-2001 y EN 13485-2003.
4. El usuario es responsable de la validación del kit para determinados usos particulares, ya que el Kit no ha sido validado para una aplicación particular. El Kit puede ser utilizado en laboratorios de diagnóstico clínico siempre y cuando el laboratorio valide el kit para un sistema determinado de diagnóstico como requieren las normas CLIA'88 en Estados Unidos o las equivalentes en otros países.
5. BIOTOOLS garantiza la conformidad del kit con las especificaciones del producto. Si el kit no estuviera conforme a las mismas sería reemplazado.
6. La obligación de BIOTOOLS y los derechos del comprador bajo esta garantía están limitados: bien al reemplazo por parte de BIOTOOLS de cualquier producto que sea deficiente en fabricación, y que deberá ser retornado a BIOTOOLS (portes pagados), o a opción de BIOTOOLS, devolución del precio de adquisición.
7. BIOTOOLS no se responsabilizará de daños o defectos debidos al transporte. Las reclamaciones por mercancía dañada han de dirigirse al transportista; el seguro de transporte es responsabilidad del cliente.
8. BIOTOOLS no tendrá responsabilidad sobre ningún daño directo, indirecto, consecuencia o incidente resultante del uso, mal uso, resultado del uso o de la incapacidad de uso del kit. Tampoco se responsabiliza de los defectos en productos o componentes no manufacturados por BIOTOOLS, o daños consecuencia de esos productos o componentes exógenos a BIOTOOLS.
9. Ninguna otra garantía de ningún tipo, directa o indirecta, expresa o implícita, incluyendo sin limitación, garantías implícitas de capacidad de comercialización, o adecuación para un propósito determinado, son dadas por BIOTOOLS.
10. La garantía de este boletín, así como las especificaciones y descripciones de este kit que aparecen en el catálogo son los únicos documentos válidos de la garantía del producto. Comunicados escritos u orales por los comerciales, distribuidores o técnicos de BIOTOOLS, excepto declaraciones escritas firmadas por un directivo autorizado de BIOTOOLS, carecen de valor alguno y no forman parte de la garantía de venta.
11. Las indicaciones/aplicaciones del producto están sujetas a cambios por lo cual se recomienda contactar con nuestro servicio técnico para obtener información actualizada de los productos de BIOTOOLS. También puede contactar su comercial o distribuidor local para una información general.
12. Las aplicaciones mencionadas en el boletín o demás documentos de BIOTOOLS tienen un carácter meramente informativo. BIOTOOLS no garantiza que todas las aplicaciones hayan sido testadas en sus laboratorios. Para más información contacte nuestro Departamento Técnico ([info@biotoools.eu](mailto:info@biotoools.eu)).

### Fabricado por:

BIOTOOLS, Biotechnological & Medical Laboratories, S.A. han sido evaluados y certificados en cuanto al cumplimiento de los requisitos de ISO 9001:2008 para las siguientes actividades: investigación y desarrollo de productos de biotecnología, fabricación de productos de biotecnología y fabricación de productos para diagnóstico in vitro (IVDs). Valle de Tobalina – 52 – Nave 39, 28021 Madrid – España

© 2008 BIOTOOLS, Biotechnological & Medical Laboratories, S.A. Todos los derechos reservados.