

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
www.biotools.eu

SPEEDTOOLS FOOD DNA EXTRACTION KIT

*Diseñado para una extracción rápida y eficiente
de ADN genómico de alimentos
de origen animal o vegetal*

Manual de Uso (Ref. 21.175/6/7)

**ANTES DE USAR ESTE KIT LEA EN SU TOTALIDAD LAS INSTRUCCIONES DE USO
ESPECIALMENTE SI NO ESTÁ FAMILIARIZADO CON EL PROTOCOLO**

SPEEDTOOLS FOOD DNA EXTRACTION KIT

1. DESCRIPCIÓN DEL KIT

SPEEDTOOLS FOOD DNA EXTRACTION KIT permite una rápida y eficiente extracción de ADN genómico de alta calidad a partir de matrices variadas (alimentos de origen vegetal y animal).

Por su composición química (aditivos, grasas, colorantes, estabilizantes, etc.) los alimentos son muestras heterogéneas que incluyen compuestos que pueden interferir tanto en el proceso de extracción como en las posteriores aplicaciones del ADN obtenido. Los métodos de extracción y purificación de estas muestras además de mantener la integridad del ADN, deben eliminar estos inhibidores. Speedtools Food DNA Extraction Kit garantiza la obtención de fragmentos cortos de ADN genómico (< 1 kb) y con rendimiento óptimo a partir de alimentos procesados o de muestras complejas (ej. kétchup o especias) que generalmente contienen un contenido de ADN bajo y/o de mala calidad o degradado. Como consecuencia, para ensayos de amplificación con estos moldes se recomienda seleccionar primers que amplifiquen fragmentos de ADN cortos (80-150 bp).

Previo a comenzar el protocolo del Kit las muestras deben ser homogeneizadas. En el primer paso del protocolo se extrae el ADN de la muestra pre-homogeneizada incubando en el buffer de lisis (Buffer BCF/Proteinase K) que contiene agentes caotrópicos, agentes desnaturalizantes y detergentes; a continuación la mezcla se centrifuga a fin de eliminar contaminantes y desechos celulares del lisado. El sobrenadante se trata con el buffer de unión (Buffer BC4) y etanol para crear las condiciones necesarias de unión del ADN a la columna; el paso de unión del ADN es específico y reversible. Los contaminantes son eliminados mediante sucesivos lavados de la columna con diferentes buffers (Buffer BCQW y Buffer BC5) y el ADN purificado es finalmente eluido de manera específica en un buffer de baja fuerza iónica y pH ligeramente alcalino (Buffer BCE).

2. REACTIVOS INCLUIDOS EN EL KIT

Reactivos	10 Preps Ref. 21.175	50 Preps Ref. 21.176	250 Preps Ref. 21.177
Buffer BCF	12 mL	100 mL	5 x 100 mL
Buffer BC4	10 mL	30 mL	5 x 30 mL
Buffer BC5 (concentrado)	6 mL	12 mL	5 x 12 mL
Buffer BCQW	6 mL	30 mL	5 x 30 mL
Buffer BCE	13 mL	13 mL	5 x 13 mL
Proteinase K (liofilizado)	1.2 mg	6 mg	5 x 6 mg
Proteinase Buffer	1.8 mL	1.8 mL	5 x 1.8 mL
Columnas Speedtools Food (más Collecting Tubes)	10	50	5 x 50
Collecting Tubes (2 mL)	30	150	5 x 150
Protocolo	1	1	5 x 1

3. USO PREVISTO

La tecnología desarrollada para el Kit SPEEDTOOLS FOOD DNA EXTRACTION permite la obtención de ADN genómico de alta calidad a partir de **alimentos de origen vegetal y animal**.

Este kit puede utilizarse para la **purificación de ADN transgénico (GMO-DNA)** y para la extracción de **componentes de origen animal presente en alimentos y piensos**.

El Speedtools Food DNA Extraction kit también permite la extracción de **ADN bacteriano presente en alimentos contaminados**.

Tabla 1. Características generales del Kit	
Muestra de origen	5-200 mg
Rendimiento	0.1-10 µg
Volumen de Elución	100 µL
Capacidad de Unión	30 µg
Tiempo / Prep	30 min/ 6 preps
Tamaño de fragmentos	>300 bp
Tipo de Columna	mini

4. OBSERVACIONES GENERALES

- **Material de partida:** El protocolo debe de comenzarse con **200 mg** de muestra debido al bajo contenido de ADN presente en los alimentos.
- **Eficiencia del buffer de lisis (Buffer BCF):** La eficiencia del Buffer BCF incluido en el kit ha sido testada con diversas muestras de origen (ver Tabla 2) incluyendo alimentos de origen vegetal y animal y bacterias. Algunas de ellas pueden requerir una adaptación del protocolo estándar, consulte nuestro Departamento Técnico (info@biotools.eu).
- **Extracción de ADN bacteriano** en muestras de alimentos: Para la extracción del ADN de bacterias en alimentos contaminados se recomienda realizar un pre-cultivo de la muestra contaminada en un medio apropiado para la bacteria de interés. Centrifugar una alícuota del cultivo microbiano y aplicar el protocolo de extracción estándar al material recuperado en el pellet.
- **Incubación con RNasa A** (no incluida en el kit): En muestras ricas en ARN se recomienda incluir un tratamiento con RNasa A. Adicionar 10 µL de enzima (solución stock 20 mg/mL) para 550 µL de buffer de lisis e incubar 30 min a temperatura ambiente (en el Paso 2 del protocolo estándar); el tratamiento con RNasa también se puede realizar en el eluato final antes de su utilización.
- **Utilización de colector de vacío** (*manifold*): En los pasos de lavado puede utilizarse un colector de vacío ya que reduce los tiempos de estas fases. Sin embargo, los pasos de unión a la columna y de elución deberán siempre realizarse mediante centrifugación como indica el protocolo estándar.
- **Análisis de GMOs:** Para el análisis de GMO según la legislación vigente se debe analizar más de una concentración de la muestra problema. Si se escala el buffer de lisis se pueden analizar hasta **1-2 g de muestra**. Se recomienda que en el paso 3 del protocolo estándar el tamaño de la alícuota (sobrenadante clarificado) empleada sea de 300 µL. También puede preparar 2 alícuotas como se describe en el protocolo estándar y cargarlas en la columna en diferentes etapas.

Tabla 2. Muestras testadas con resultados positivos

Alimentos de origen vegetal	<ul style="list-style-type: none"> • Productos crudos: maíz, soja, colza, etc. (en harina y en aceite*) • Cacao, productos con chocolate, “nougats” • Cereales de desayuno, muesli, cremas de cacao y de frutos secos • Mermeladas, confituras de frutas, concentrados de frutas • Galletas, cookies y bizcochos • Polen • Lecitina • Especias* • Pan
Alimentos de origen animal	<ul style="list-style-type: none"> • Productos crudos y procesados (carne, salchichas, empanadas)
Productos farmacéuticos	<ul style="list-style-type: none"> • Ingredientes de origen vegetal (ej. almidón) en productos farmacéuticos (pastillas) y en vitaminas (píldoras)
Cosméticos	<ul style="list-style-type: none"> • Ingredientes de origen animal o vegetal en cremas y polvos
Bacterias	<ul style="list-style-type: none"> • Pre-cultivos.

*El protocolo estándar debe de adaptarse consulte nuestro Dept. Técnico (info@biotools.eu)

5. HOMOGENEIZACIÓN Y LISIS DE LAS MUESTRAS

El proceso de lisis es más eficiente si la muestra de partida está pulverizada o correctamente homogeneizada. Para la correcta homogeneización de la muestra se recomienda seguir uno de los siguientes abordajes:

- ✓ Moler la muestra con **mortero en presencia de nitrógeno líquido**.
- ✓ Utilizar un **homogeneizador comercial** (ej. molino de perlas)
- ✓ Utilizar **perlas de acero** de 7 mm de diámetro y **vortex**. En este caso colocar en un tubo plástico de 15 mL 4-5 perlas junto con el material de origen y enfriar el tubo en nitrógeno líquido (no añadir el nitrógeno líquido dentro del tubo). Agitar con **vortex** durante aproximadamente **30 seg.** Repetir las etapas de enfriamiento y agitación hasta que la totalidad de la muestras se quede reducida a un polvo. Congelar el tubo una vez más y remover las perlas haciéndolas rodar suavemente hacia fuera o con la ayuda de un imán.

En lo que respecta a la lisis, hay variaciones en el protocolo dependiendo del origen de la muestra:

- ✓ **Lisis de muestras fluidas:** Para lisar muestras fluidas como como *ketchup*, salsas y similares suele ser necesario un volumen superior de buffer de lisis (Buffer BCF); partir de **200 mg** y añadir **500-1000 µL** de **Buffer BCF** y el volumen de **Proteinase K** indicado en el protocolo estándar.
- ✓ **Lisis de muestras pulverizadas:** Para el procesamiento de muestras en polvo higroscópicas se recomienda utilizar un volumen superior de buffer de lisis (Buffer BCF) con objeto que la muestra quede semilíquida y se pueda pipetear. La extracción podrá mejorarse **pre-incubando** la muestra con el Buffer BCF durante **1-2 horas**.

6. PROTOCOLOS DE ELUCIÓN

Es posible adaptar el método y el volumen de elución a las aplicaciones posteriores del ADN obtenido:

- **Alto rendimiento** – Realice *dos pasos* de elución con el volumen indicado en el protocolo estándar (**2 x 100 µL**), combine ambos eluidos y cuantifique la concentración obtenida. Con este protocolo se podrá recuperar entre el **90-100%** de los ácidos nucleicos unidos a la membrana.

- **Alta concentración** – Realice *un paso* de elución con **25-50 µL** de Buffer BCE. Con este protocolo se recupera entre el **60-80%** de los ácidos nucleicos unidos a la membrana y el ADN eluido se recuperara a una concentración superior que con el protocolo de elución convencional.

El **Buffer de Elución BCE** puede ser reemplazado por **Buffer TE** o por **agua**. En caso de realizar la elución del ADN con agua es importante medir previamente el pH y ajustarlo a pH 8-8.5; el pH de agua deionizada suele ser inferior a 7 lo que reduce significativamente la eficiencia de la elución.

7. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

Nota: Los buffers BC4 y BCQW contienen hidrocloreto de guanidina que puede formar compuestos altamente reactivos al combinarse con hipoclorito de sodio. No agregar hipoclorito de sodio o soluciones ácidas sobre los viales que contengan restos de estos buffers. Utilice guantes y gafas de protección durante su manipulación.

- ✓ Los reactivos incluidos en el kit pueden almacenarse a **temperatura ambiente** (18-25 °C) hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta exterior del producto.
- ✓ En caso de visualizar algún precipitado en las botellas de los buffers, incube los buffers a 25-37 °C para **disolver los precipitados** antes de su utilización.

Antes de comenzar el protocolo prepare las siguientes soluciones:

I. Proteinase K:

- ✓ **Formato 10 preps:** Reconstituya el tubo liofilizado de Proteinase K añadiendo **120 µL** de **Proteinase Buffer**.
- ✓ **Formato 50 preps:** Reconstituya el tubo liofilizado de Proteinase K añadiendo **600 µL** de **Proteinase Buffer**.

*La solución de Proteinase K es estable durante **6 meses** a -20°C.*

II. Buffer BC5:

- ✓ **Formato 10 preps:** Añada **24 mL de etanol 96-100%** al Buffer BC5 concentrado. Marcar la etiqueta para indicar que el etanol ha sido añadido.
- ✓ **Formato 50 preps:** Añada **48 mL de etanol 96-100%** al Buffer BC5 concentrado. Marcar la etiqueta para indicar que el etanol ha sido añadido.

*Almacenar el Buffer BC5 a temperatura ambiente (18-25°C); el buffer diluido conservado a esta temperatura es estable durante **al menos 12 meses**.*

8. EQUIPOS Y REACTIVOS NECESARIOS Y NO PROVISTOS




Trabaje en el laboratorio con una bata, guantes de examen y gafas protectoras.





- Equipo apropiado para homogenizar la muestra en caso de que sea necesario
- Microcentrífuga
- Baño de agua/incubadora
- Vortex
- **Etanol 96-100%**
- Microtubos de 1.5 mL y 2 mL
- Solución de RNase (20 mg/mL)

9. INSTRUCCIONES DE USO

Antes de comenzar el protocolo:

- Corroborar que el Buffer BC5 y la Proteinase K han sido correctamente preparados (ver Sección 7)
- Preparar un incubador o baño de agua a 65°C.
- Precalear el Buffer de Lisis BCF a 65°C y el Buffer de Elución BCE a 70°C.

PASO	DESCRIPCIÓN		
1	<p>HOMOGENIZACIÓN DE LA MUESTRA</p> <p>Homogenice alrededor de 200 mg de muestra con un homogenizador comercial.</p> <p><i>La muestra debe quedar en formato polvo para que la lisis sea efectiva.</i></p>		HOMOGENIZAR LA MUESTRA (200 mg)
2	<p>LISIS</p> <p>Transfiera el material homogenizado a un Collecting tube de 2 mL y añada 550 µL Buffer BCF (precalentado a 65°C). Mezcle con vortex durante 15 seg y añada 10 µL Proteinase K y mezcle nuevamente con vortex durante 2-3 seg.</p> <p><i>Si el volumen del buffer de lisis no es suficiente para disolver la muestra añada un volumen adicional de Buffer BCF y Proteinasa K de forma proporcional hasta que la muestra quede totalmente resuspendida.</i></p> <p>Incube a 65°C durante 30 min. Centrifugue el lisado 10 min a >10,000 x g para sedimentar los contaminantes y desechos celulares.</p> <p>Opcional: Si la obtención de ADN libre de ARN es crucial para sus aplicaciones posteriores, en esta fase del protocolo deberá realizar una digestión con RNasa (no proporcionada con el kit). Después de la incubación a 65 °C, adicionar 10 µL de RNase A (20 mg/µL) para 550 µL de Buffer de Lisis, mezclar exhaustivamente e incubar 30 min a temperatura ambiente. Continuar con el protocolo en el paso de centrifugación.</p>		<p>+ 550 µL BCF (calentado 65°C)</p> <p>Mix + 10 µL Proteinase K</p> <p>Mix</p> <p>Incube 65°C, 30 min</p> <p>10 min, >10,000 x g</p>
3	<p>ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DE UNIÓN A LA COLUMNA</p> <p>Transfiera el sobrenadante a un tubo de centrifuga de 2 mL. Añada 1 VOL Buffer BC4 + 1 VOL etanol (96-100%). Mezcle con vortex durante 30 seg.</p>		<p>SOBRENADANTE</p> <p>+ 1 vol BC4 + 1 vol ETANOL</p> <p>Vortex</p>
4	<p>UNIÓN DEL ADN A LA COLUMNA</p> <p>Para cada preparación utilice una Speedtools Food Column con su Collecting tube (incluido en la columna). Cargue la mezcla en la columna. Centrifugue 1 min a 11,000 x g. Descarte el eluido y coloque la columna nuevamente en el Collecting tube.</p>		<p>Cargue la mezcla en una columna</p> <p>1 min, 11,000 x g</p>

<p>5</p>	<p>LAVADOS DE LA MEMBRANA</p> <p>1^{er} Lavado Añada 400 µL Buffer BCQW a la columna. Centrifugue 1 min a 11,000 x g. Descarte el eluido y coloque la columna nuevamente en el Collecting tube.</p> <p>2^{do} Lavado Añada 700 µL Buffer BC5 a la columna. Centrifugue 1 min a 11,000 x g. Descarte el eluido y coloque la columna nuevamente en el Collecting tube.</p> <p>3^{er} Lavado Añada 200 µL Buffer BC5 en la columna. Para eliminar totalmente el Buffer BC5 centrifugue 2 min a 11,000 x g. Descarte el eluido. <i>La presencia de etanol residual del Buffer BC5 puede inhibir reacciones posteriores con el ADN.</i></p>	 	<p>+ 400 µL BCQW 1 min, 11,000 × g</p> <p>+ 700 µL BC5 1 min, 11,000 × g</p> <p>+ 200 µL BC5 2 min, 11,000 × g</p>
<p>6</p>	<p>ELUCIÓN DEL ADN</p> <p>Coloque la Speedtools Food Column en un tubo de centrifuga de 1.5 mL nuevo. Añada 100 µL Buffer BCE (precalentado a 70°C) directamente en la membrana. Incube 5 min a temperatura ambiente. Centrifugue 1 min a 11,000 x g. El eluido contiene el ADN purificado de la muestra. <i>Para protocolos de elución alternativos ver Sección 6.</i></p>	 	<p>+ 100 µL BCE (calentado 70°C)</p> <p>Incube 5 min TA</p> <p>1 min, 11,000 × g</p>

10. RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Problema	Posible causa y sugerencias
El rendimiento obtenido es bajo	<p>Homogenización de la muestra insuficiente</p> <ul style="list-style-type: none"> Para la mayoría de muestras se recomienda homogenizar con perlas de acero o con otro tipo de perlas. También pueden emplearse homogeneizadores comerciales. <p>Lisis incompleta</p> <ul style="list-style-type: none"> Para obtener mayores rendimientos se puede incrementar el tiempo de incubación con el buffer de lisis (incubar toda la noche). <p>La muestra posee un elevado contenido de ARN</p> <ul style="list-style-type: none"> Tratar con RNase A después de la lisis a 65°C (ver paso 2 del protocolo). Si el tratamiento no resultara efectivo, realizar el tratamiento con RNasa A sobre el lisado clarificado (después de la centrifugación). En ambos casos, incubar la muestra con RNase A durante 30 min a 37°C. <p>Elución insuficiente del ADN unido a la columna</p> <ul style="list-style-type: none"> El ADN puede eluirse en un volumen elevado de buffer de elución (hasta 300 µL) o repitiendo el paso de elución hasta tres veces (100 µL de buffer en cada etapa). El buffer de elución debe precalentarse a 70°C. Revise el pH del buffer de elución, este debe ser ligeramente alcalino 8.0-8.5. Para asegurarse que emplea el pH correcto, utilice el Buffer BCE suministrado con el Kit.
El ADN obtenido está degradado	<p>Muestra contaminada con DNase</p> <ul style="list-style-type: none"> Revise posibles contaminaciones en pipetas y en el área de trabajo. <p>La velocidad de centrifugación empleada es muy alta</p> <ul style="list-style-type: none"> Centrifugue a la velocidad indicada en el protocolo. El empleo de altas velocidades así como periodos prolongados de vortex pueden producir ruptura del ADN.
La calidad del ADN es insuficiente	<p>Presencia de contaminantes que degradan el ADN en la muestra de origen (ej. compuestos fenólicos, metabolitos)</p> <ul style="list-style-type: none"> Repita el paso de lavado con el Buffer BCQW.

11. 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 KIT	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

12. LIMITACIONES Y GARANTÍA

1. Producto para uso exclusivo en investigación y en análisis *in vitro*.
2. El kit no ha sido diseñado para identificar un determinado microorganismo o para uso clínico.
3. Es responsabilidad del usuario verificar la validez de uso del kit para una aplicación específica, pues el kit no ha sido validado para un determinado organismo o tipo de alimentos.
4. La documentación incluida en el kit especifica su uso, deben seguirse fielmente las instrucciones con el fin de obtener ADN de alta calidad.
5. BIOTOOLS garantiza la conformidad del kit con las especificaciones del producto.
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 de mercancías 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 del contrato 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@biotools.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.