

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 PCR CLEAN-UP KIT

Diseñado para la purificación directa de productos de PCR o de bandas de ADN en geles de agarosa (TAE/TBE)

Manual de Uso (Ref. 21.200/1/2)

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

1. PRINCIPIOS BÁSICOS

SPEEDTOOLS PCR CLEAN-UP KIT permite una rápida y eficiente purificación de ácidos nucleicos a partir de soluciones acuosas (ej. reacciones de PCR), así como a partir de bandas de geles de agarosa o poliacrilamida.

El ADN presente en la muestra, en presencia de BUFFER B que crea las condiciones adecuadas para la interacción, se une a la membrana de sílice de la COLUMNA, de manera específica y reversible. Los contaminantes presentes en la muestra son eliminados lavando la columna con el BUFFER T3 de lavado. El ADN es finalmente eluido de la columna con el BUFFER E, de fuerza iónica baja y pH ligeramente alcalino, o bien utilizando agua bidestilada estéril.

El Speedtools PCR Clean-Up kit permite procesar hasta 200 µL de reacciones de PCR u otras reacciones enzimáticas, o hasta 200 mg de gel de agarosa, en una única etapa utilizando tan sólo dos volúmenes de buffer de unión por volumen de muestra.

Características Generales del Kit	
Volumen de Elución	15-30 µL
Capacidad de Unión de la Columna	25 µg
Recuperación Óptima	<15 µg ^a
Rendimiento	60-90% ^b
Material de Partida	Hasta 200 µL de soluciones acuosas (ej. reacción de PCR) ó hasta 200 mg de geles de agarosa ^c
Tamaño de fragmentos a recuperar	Desde 50 bp hasta ~ 20 kb ^d
Tiempo / Preparación	10 min/ 6 purificaciones a partir de reacciones de PCR 20 min/ 6 extracciones a partir de geles

^aPara fragmentos de 100-500 bp en 30 µL de volumen de elución.

^bDependiendo del tamaño del fragmento y del protocolo de elución utilizado.

^cPara muestras de tamaño superior utilizar un volumen superior de Buffer de Unión y múltiples pases por columna.

^dEste kit está especialmente recomendado para fragmentos de ADN hasta 10-15 kb. Fragmentos de mayor tamaño se pueden purificar con rendimiento menor ya que pueden sufrir daño mecánico durante la elución de la columna (centrifugación).

2. CONTENIDO DEL KIT

Speedtools PCR Clean-Up kit			
	10 Preps Ref. 21.200	50 Preps Ref. 21.201	250 Preps Ref. 21.202
BUFFER B Buffer de Unión con indicador de pH	10 mL	40 mL	5 x 40 mL
BUFFER T3 (concentrado) Buffer de lavado	6 mL	25 mL	5 x 25 mL
BUFFER E Buffer de elución	13 mL	13 mL	5 x 13 mL
BINDING COLUMNS	10	50	5 x 50
COLLECTION TUBES	10	50	5 x 50
PROSPECTO	1	1	5 x 1

3. DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

a. Características del kit

- El Kit posee un uso dual ya que permite la purificación de ADN presente tanto en reacciones de PCR como en bandas de geles de agarosa y poliacrilamida.
- Los primers residuales de la PCR son eliminados mientras que los fragmentos de ADN pequeños (>50 bp) permanecen unidos a la membrana de sílica y son purificados con un alto índice de recuperación (detalles en Sección 5.D).
- El rendimiento es óptimo incluso para mezclas de PCR que contienen coadyuvantes en su composición.
- La unión del ADN a la membrana de la columna es dependiente del pH. El indicador de pH incluido en el Buffer de Unión B asegura condiciones óptimas para la unión con $\text{pH} < 7$ (Sección 3.b).
- El Speedtools PCR Clean-Up kit es compatible tanto con geles de agarosa estándar como de agarosa de bajo punto de fusión (Buffer TAE/TBE).
- El ADN purificado puede utilizarse directamente en aplicaciones como secuenciación automática o detección basada en fluorescencia; hibridación; ligación; restricción, transcripción "in vitro"; marcaje; PCR u otras reacciones enzimáticas.

Usos del kit		
Purificación Directa de Productos de PCR	SI	Sección 5.A
Purificación de ADN a partir de Muestras Líquidas con Elevado Contenido de SDS	SI	Sección 5.B
Purificación de ADN de Cadena Sencilla	SI	Sección 5.C
Eliminación de Fragmentos de ADN Pequeños y Dímeros de Primer	SI	Sección 5.D
Extracción y Purificación de ADN de Geles de Agarosa (estándar o de bajo punto de fusión)	SI	Sección 5.E
Extracción y Purificación de ARN de Geles de Agarosa	SI	Sección 5.F
Extracción y Purificación de ADN de Geles de Poliacrilamida	SI	Sección 5.G

b. Buffer de Unión (Buffer B) con Indicador de pH

El pH óptimo para unir los fragmentos de ADN a la membrana de sílica se encuentra entre 5.0–6.0. El Buffer B posee una capacidad buffer suficiente como para mantener este rango de pH. No obstante, a fin de garantizar que el pH de la mezcla (muestra + Buffer B) sea el idóneo para la unión del ADN a la columna, incluso en muestras con pH elevado o con alta concentración de buffer, el BUFFER B lleva un indicador de pH incorporado. Este indicador no interfiere con la unión del ADN a la columna y es eliminado durante la fase de lavado.

Al mezclar la muestra (soluciones acuosas o fragmentos de geles de agarosa) con el BUFFER B se pueden presentar tres situaciones:

1. **Color amarillo- pH de la mezcla < 6.0:** pH óptimo para la unión del ADN a la columna y *rendimiento máximo* del protocolo de extracción.
2. **Color verde- pH de la mezcla entre 6.0-7.0:** El porcentaje de ADN unido a la columna será inferior al óptimo y *afectará ligeramente al rendimiento* del proceso de extracción.
3. **Color azul- pH de la mezcla entre > 7.0:** Porcentaje de ADN unido a la columna significativamente inferior al óptimo y *afectará drásticamente al rendimiento* del proceso de extracción.

En caso de visualizar un cambio de color al mezclar la muestra con el Buffer B es altamente recomendable corregir el pH de la solución resultante ajustando a pH < 6 con acetato de sodio 4 M pH 5.0 ó con un volumen pequeño de ácido clorhídrico hasta que le color de la mezcla vire al amarillo.

La presencia del indicador de pH en el Buffer B permite:

- *Visualizar fácilmente las condiciones óptimas* de la muestra para la unión a la columna.
- *Corregir la mezcla* de Buffer B + mtra. si las condiciones no son las idóneas para la unión del ADN a la columna.
- *Identificar la presencia de fragmentos de agarosa no disueltos* durante la extracción de geles.

c. Protocolos de Elución

Para la elución de los ácidos nucleicos de la columna se puede utilizar el BUFFER E (5 mM Tris/HCl, pH 8.5) incluido en el kit; buffer TE pH 8.5; o agua bidestilada estéril pH 8.5.

NOTA: El Buffer TE lleva EDTA en su composición que puede inhibir algunas reacciones en las que se utilice el ADN purificado. Si se escoge la dilución de ADN con agua, asegurarse de que la misma tenga un pH sea >7.

El volumen de elución estándar se encuentra entre **15-30 µL** que representa el mejor compromiso entre el rendimiento y la concentración de ADN óptimos para fragmentos **< 1000 bp**. Con un volumen de elución de 15 µL de Buffer E se obtiene un rendimiento entre **70-95 %** para fragmentos de ADN entre **50-10.000 bp**.

La elución de ADN a partir de **extracción en geles** es entre un **10-20 % menos eficiente** que la elución de ADN purificado a partir de soluciones acuosas.

Cuando se requiera purificar **grandes cantidades de ADN** (5-15 µg) que puedan provenir de reacciones de PCR > 200 µL o de geles de agarosa > 200 mg, utilizar **30 µL** de BUFFER E para la elución del ADN.

Cuando se necesite recuperar el **ADN muy concentrado**, utilizar **< 30 µL** de BUFFER E para la elución. Utilizando < 15 µL de buffer para la elución el rendimiento de la extracción se reduce significativamente, aunque la concentración pueda incrementarse.

El rendimiento de la extracción de fragmentos de ADN grandes (> 5-10 kb) o de ADN a partir de geles de agarosa puede incrementarse aplicando las siguientes modificaciones en el protocolo estándar:

- *Calentar el **Buffer de Elución E** a **70 °C** e incubar la columna con este buffer durante 5 min a 70 °C.*
- *Centrifugar a **30-50 x g** durante **1 min** y luego a **11,000 x g** durante **1 min**.*
- *Realizar **2 ó 3 etapas de elución** con **20-30 µl** de **Buffer de Elución fresco** en cada una de las etapas.*

4. INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO Y PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Todos 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.

NOTA: El BUFFER B contiene en su composición sales caotrópicas que puede resultar nocivas. Utilizar en todo momento guantes y gafas de protección.

Antes de comenzar cualquier protocolo con el **SPEEDTOOLS PCR CLEAN-UP KIT** prepare el BUFFER T3 siguiendo las siguientes instrucciones:

- ✓ **Formato 10 preps:** Añadir **24 mL de etanol** 96-100% al bote de BUFFER T3 concentrado. Realizar una marca identificativa al bote que contiene el Buffer T3 diluido.
- ✓ **Formato 50 preps:** Añadir **100 mL de etanol** 96-100% al bote de BUFFER T3 concentrado. Realizar una marca identificativa al bote que contiene el Buffer T3 diluido.

El Buffer T3 diluido es estable a temperatura ambiente (18-25°C) durante al menos 12 meses.





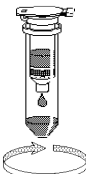
5. PROTOCOLOS

A. Purificación Directa de Productos de PCR

Este protocolo permite **purificar ADN directamente de la PCR** así como **concentrar ADN o remover sales, enzimas y otros residuos de soluciones acuosas** con contenido bajo de SDS (< 0.1%).

Antes de comenzar el protocolo:

- Preparar el Buffer T3 como se indica en la Sección 4
- En caso necesario equilibrar la cantidad necesaria de Buffer E a 70°C


PASO	DESCRIPCIÓN		
1	<p>ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES PARA LA UNIÓN DEL ADN A LA COLUMNA</p> <p>Mezclar 1 VOL de muestra con 2 VOL de BUFFER B. Para volúmenes de muestra <30 µL ajustar el volumen de reacción a 50-100 µL con agua. <i>Si al mezclar la muestra con el Buffer B visualiza un cambio de color, corregir el pH de la mezcla (Sección 3.b)</i></p> <p>Nota: Para eliminar fragmentos de ADN pequeños (ej. dímeros de primer) diluir el BUFFER B (ver Sección 5.D).</p>		<p>1 VOL MUESTRA</p> <p>+</p> <p>2 VOL BUFFER B</p>
2	<p>UNIÓN DE ADN A LA COLUMNA</p> <p>Utilizar una Columna por muestra y colocarla en un Tubo Colector de 2 mL. Cargar la muestra en la columna y centrifugar 30 seg a 11,000 x g. Desechar el filtrado y colocar la Columna nuevamente en su Tubo Colector.</p> <p><i>En caso necesario cargar en la columna el volumen de muestra residual y repetir la centrifugación de la columna.</i></p>		<p>CARGAR LA COLUMNA</p> <p>30 seg, 11,000 x g</p>
3	<p>LAVADO DE LA MEMBRANA DE SILICA</p> <p>Añadir 700 µL de BUFFER T3 diluido. Centrifugar 30 seg a 11,000 x g. Descartar el filtrado y colocar la Columna nuevamente en su Tubo Colector.</p> <p>Nota: A fin de eliminar completamente las sales caotrópicas y mejorar la ratio A_{260}/A_{230} se recomienda repetir el lavado de la columna en las mismas condiciones.</p>		<p>+</p> <p>700 µL BUFFER T3</p> <p>30 seg, 11,000 x g</p> <p>(1 ó 2 lavados)</p>
4	<p>SECADO DE LA MEMBRANA</p> <p>Centrifugar la columna 1 min a 11,000 x g a fin de eliminar los restos de Buffer T3 (evitar que la columna contacte con el filtrado).</p> <p>Nota: Para la remoción completa del etanol incubar la columna a 70°C durante 2-5 min.</p>		<p>1 min, 11,000 x g</p>
5	<p>ELUCIÓN DEL ADN PURIFICADO</p> <p>Colocar la Columna en un tubo de 1.5 mL nuevo. Añadir 15-30 µL BUFFER E. Dispensar el buffer directamente en la membrana de silica de la columna e incubar 1 min a temperatura ambiente.</p> <p>Centrifugar 1 min a 11,000 x g. El eluido contiene el ADN purificado.</p> <p>Nota: El rendimiento de ADN grandes (>1000 bp) puede incrementarse con múltiples etapas de elución y precalentando el Buffer de Elución a 70 °C, e incubando el buffer con la columna durante 5 min (Sección 3.c).</p>		<p>+</p> <p>15-30 µL BUFFER E</p> <p>Incubar 1 min a TA</p> <p>1 min, 11,000 x g</p>

B. Purificación de ADN a partir de Muestras Líquidas con Elevado Contenido de SDS (Buffer BS Ref. 21.203¹, no incluido en el kit)

Este protocolo permite la purificación de **ADN a partir de buffers con un contenido elevado de SDS**, por ejemplo muestras de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).

Antes de comenzar el protocolo:

- Preparar el Buffer T3 como se indica en la Sección 4
- En caso necesario equilibrar la cantidad necesaria de Buffer E a 70°C

PASO	DESCRIPCIÓN		
1	<p>ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES PARA LA UNIÓN DEL ADN A LA COLUMNA</p> <p>Mezclar 1 VOL de muestra con 5 VOL de BUFFER BS.</p> <p><i>Nota: Si el SDS comienza a precipitar agregar 1 VOL de isopropanol o precalentar la muestra a 20-30 °C.</i></p>		<p>1 VOL MUESTRA + 5 VOL BUFFER BS</p>
2	Continuar con el Paso 2 del Protocolo de Purificación Directa de Productos de PCR (Sección 5.A)		


C. Purificación de ADN de cadena sencilla (Buffer BD Ref. 21.204², no incluido en el kit)

La formulación del Buffer de unión o BUFFER B permite la unión de ADN de cadena sencilla (ADNss) si este posee un tamaño > 150 bases; en tanto que oligonucleótidos más cortos, principalmente cebadores, son eliminados de la muestra.

Para **purificar fragmentos cortos de ADNss** es necesario utilizar un buffer especial, el **BUFFER BD** de unión, no incluido en el Kit (**Figura 1**).

Antes de comenzar el protocolo:

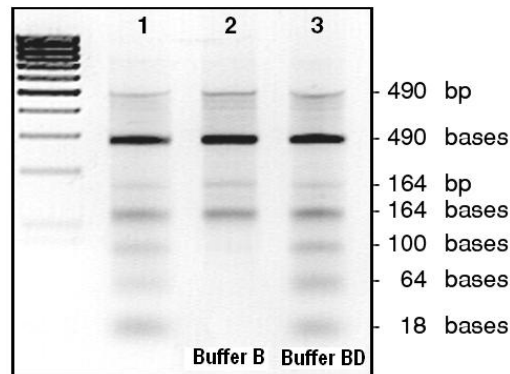
- Preparar el Buffer T3 como se indica en la Sección 4
- En caso necesario equilibrar la cantidad necesaria de Buffer E a 70°C

PASO	DESCRIPCIÓN		
1	<p>ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES PARA LA UNIÓN DEL ADN A LA COLUMNA</p> <p>Mezclar 1 VOL de muestra con 2 VOL de BUFFER BD.</p> <p><i>Si la muestra contiene una concentración de detergente elevada u otras sustancias críticas, duplicar el volumen de BUFFER BD.</i></p>		<p>1 VOL MUESTRA + 2 VOL BUFFER BD</p>
2	Continuar con el Paso 2 del Protocolo de Purificación Directa de Productos de PCR (Sección 5.A)		

¹ BUFFER BS debe solicitarse de forma individual Ref. 21.203

² BUFFER BD debe solicitarse de forma individual Ref. 21.204

Figura 1. Purificación de ADN de doble cadena y cadena sencilla utilizando BUFFER B o BUFFER BD



Fragmentos de PCR obtenidos utilizando primers fosforilados y sin fosforilar y digeridos con λ -Exonucleasa. Las muestras fueron purificadas utilizando diferentes buffers de unión: **Buffer B** o **Buffer BD**, y visualizadas en gel de agarosa TAE 1%. El ADN de doble cadena aparece como bandas de baja intensidad. Las bandas de ADN de cadena sencilla poseen mayor velocidad de migración que las de cadena doble.

Comparando ambos bufferes el **Buffer B** elimina ADNss < 150 bases (carril 2), mientras que el **Buffer BD** permite la unión y por tanto la purificación de oligonucleótidos (carril 3).

D. Eliminación de Fragmentos de ADN pequeños y Dímeros de Primer

El Kit **SPEEDTOOLS PCR CLEAN-UP** permite, utilizando diluciones del Buffer B, garantizar la remoción completa de dímeros de primers o productos de PCR inespecíficos que puedan interferir en reacciones posteriores de secuenciación o clonaje.

Para eliminar fragmentos de ADN de doble cadena > 50 bp se deben realizar diluciones del Buffer B en agua bidestilada estéril al ratio apropiado y continuar con el Paso 2 del protocolo para purificación directa de productos de PCR (Sección 5.A).

La dilución del Buffer B (dependiendo del ratio de la dilución) reduce la unión de los fragmentos pequeños a la columna sin comprometer la eficiencia de unión de los productos de PCR de mayor tamaño (**Figura 2**).

El ratio de dilución a utilizar depende del **tamaño del fragmento de ADN** a purificar así como del **buffer de PCR utilizado** y deberá ser determinada experimentalmente y con anterioridad al ensayo definitivo.

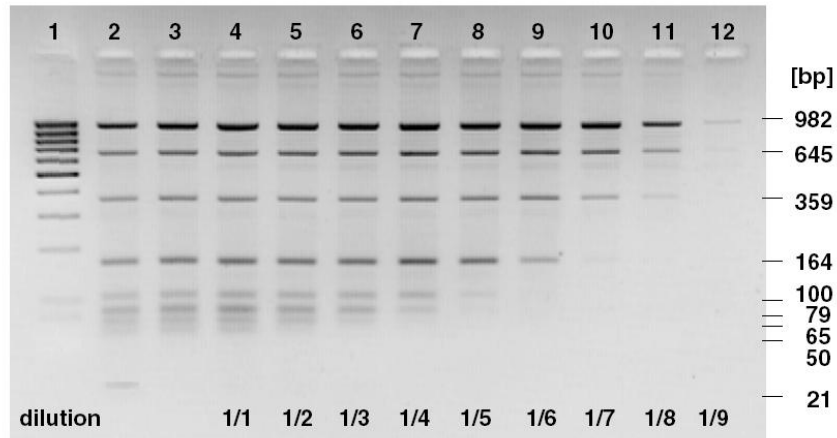
Influencia del tamaño del fragmento de ADN a descartar: Cuanto menor sea el tamaño del fragmento de ADN a eliminar menor será la dilución del Buffer B a realizar.

Influencia del buffer de PCR: El efecto del buffer de PCR en el rendimiento de la purificación es más complejo. Ciertos tampones contienen detergentes como Tween o adyuvantes como la betaína que disminuyen la temperatura de *melting* del ADN molde. Estos componentes de reacción, frecuentes en reacciones de PCR de alta fidelidad de copia o en amplificaciones de fragmentos de ADN largos, suelen disminuir la eficiencia de unión del ADN a la membrana de silica y deberán contemplarse al realizar las diluciones pertinentes del Buffer de Unión B.

Para cada fragmento de ADN >50 bp que quiera eliminar así como para cada sistema de PCR, se deberá determinar experimentalmente el ratio de dilución del BUFFER B a aplicar. *Como regla general si en la composición del buffer de reacción no se incluyen adyuvantes, para eliminar fragmentos de ADN pequeños (< 100 bp), añadir de 3 a 5 VOL de AGUA a 1 VOL de BUFFER B. En caso de que el buffer de PCR incluya coadyuvantes, añadir 1 a 3 VOL de AGUA por 1 VOL de BUFFER B.*

La **Figura 2** muestra los resultados obtenidos utilizando el BUFFER B puro y diluido. Cuando se utilizó BUFFER B sin diluir (carril 3) o una dilución del buffer 1/2 en agua (carril 4) el rendimiento para todos los fragmentos de PCR fue del 100%. Para diluciones mayores del Buffer de Unión se observa una pérdida de las bandas de tamaño inferior. La dilución 1/5 del BUFFER B (carril 8) en agua fue suficiente para remover los dímeros de primers en su totalidad y purificar bandas \geq 164 bp con un rendimiento >90%.

Figura 2. Purificación de productos de PCR utilizando diversas diluciones del BUFFER B.



Carril 1: 100 bp Ladder Marker (BIOTOOLS Ref. 31.006)

Carril 2: Muestra (primer de 21 bases, 50, 65, 79, 100, 164, 359, 645 y 982 bp)

Carril 3: Purificación empleando Buffer B sin diluir

Carriles 4-12: Purificación empleando el BUFFER B diluido 1-9 volúmenes con agua bidestilada estéril.

Extracción y Purificación de Ácidos Nucleicos a Partir de Geles de Agarosa

Buffer de electroforesis: El kit SPEEDTOOLS PCR CLEAN-UP es compatible con los tampones de electroforesis TAE y TBE. Sin embargo, cuando se pretende purificar ADN a partir de gel el buffer TAE resulta el idóneo porque al no interactuar con la agarosa incrementa el rendimiento del método.

Condiciones de electroforesis: La temperatura del gel durante la electroforesis debe de ser baja a fin de mejorar la resolución y evitar la desnaturalización del ADN durante la migración. Para garantizar estas condiciones es importante utilizar buffer fresco, migrar el gel al menor voltaje posible (< 60 V) y reducir el tiempo de migración (detener la migración cuando la banda de interés se encuentre suficientemente separada como para efectuar el corte).

Exposición del gel a la luz UV: Minimizar el tiempo de exposición del gel a los rayos UV a fin de prevenir el daño en el ácido nucleico. El usuario deberá utilizar guantes y máscara facial para proteger la piel y los ojos de la exposición a los rayos.

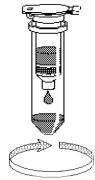
Corte del gel: Remover todo el excedente de gel utilizando la menor cantidad posible. Hasta **200 mg de agarosa** podrán ser disueltos con **400 µL de Buffer B** y purificarse a través de la columna en una única etapa. Cantidades superiores de gel podrán ser utilizadas siempre que se respete la proporcionalidad de gel y Buffer B, además de realizar el pase por columna en varias etapas. El porcentaje de agarosa recomendado para la purificación posterior del ADN se encuentra entre **0.7- 1.0 %**.

E. Extracción y Purificación de ADN de Geles de Agarosa

Antes de comenzar el protocolo:

- Preparar el Buffer T3 como se indica en la Sección 4
- En caso necesario equilibrar la cantidad necesaria de Buffer E a 70°C
- Preparar un incubador o baño de agua a 50°C

PASO	DESCRIPCIÓN		
1	<p>CORTE DE LA BANDA</p> <p>Cortar la banda del gel utilizando un bisturí estéril e introducirla en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL. Minimizar al máximo el volumen de gel a incluir.</p> <p>No olvidar determinar el peso de la banda cortada</p> <p>Nota: Minimizar el tiempo de exposición a los rayos UV.</p>		CORTAR BANDA
2	<p>LISIS DEL GEL</p> <p>Por cada 100 mg de gel de agarosa < 2% añadir 200 µL BUFFER B.</p> <p><i>Si al mezclar la muestra con el Buffer B visualiza un cambio de color, corregir el pH de la mezcla (Sección 3.b)</i></p> <p>Incubar durante 5-10 min a 50°C. Vortexear cada 2-3 min hasta que el gel se disuelva completamente.</p> <p>Nota: Para geles de agarosa > 2%, duplicar el volumen de BUFFER B.</p>		<p>100 mg gel</p> <p>+</p> <p>200 µL BUFFER B</p> <p>50°C, 5-10 min</p>
3	<p>UNIÓN DE ADN A LA COLUMNA</p> <p>Utilizar una Columna por muestra y colocarla en un Tubo Colector de 2 mL. Cargar cuidadosamente la muestra en la columna (hasta 700 µL).</p> <p>Centrifugar 30 seg a 11,000 × g. Desechar el filtrado y colocar la Columna nuevamente en su Tubo Colector.</p> <p><i>En caso necesario cargar en la columna el volumen de muestra residual y repetir la centrifugación de la columna.</i></p>		<p>CARGAR LA COLUMNA</p> <p>30 seg, 11,000 × g</p>
4	<p>LAVADO DE LA MEMBRANA DE SILICA</p> <p>Añadir 700 µL de BUFFER T3. Centrifugar 30 seg a 11,000 × g. Descartar el filtrado y colocar la Columna nuevamente en el Tubo Colector.</p> <p>Nota: A fin de eliminar completamente las sales caotrópicas y mejorar la ratio A_{260}/A_{230} se recomienda repetir el lavado de la columna en las mismas condiciones.</p>		<p>+</p> <p>700 µL BUFFER T3</p> <p>30 seg, 11,000 × g</p> <p>(1 ó 2 lavados)</p>
5	<p>SECADO DE LA MEMBRANA</p> <p>Centrifugar la columna 1 min a 11,000 × g a fin de eliminar los restos de Buffer T3 (evitar que la columna contacte con el filtrado).</p> <p>Nota: Para la remoción completa del etanol incubar la columna a 70°C durante 2-5 min.</p>		<p>1 min, 11,000 × g</p>

6	<p>ELUCIÓN DEL ADN PURIFICADO</p> <p>Colocar la Columna en un tubo de 1.5 mL nuevo. Añadir 15-30 µL BUFFER E. Dispensar el buffer directamente en la membrana de silica de la columna e incubar 1 min a temperatura ambiente.</p> <p>Centrifugar 1 min a 11,000 x g. El eluido contiene el ADN purificado.</p> <p>Nota: El rendimiento de fragmentos de ADN grandes (>1000 bp) puede incrementarse con múltiples etapas de elución y precalentando el Buffer de Elución a 70 °C e incubando la columna con el buffer durante 5 min (Sección 3.c).</p>		<p>+ 15-30 µL BUFFER E</p> <p>Incubar 1 min a TA</p> <p><i>1 min, 11,000 x g</i></p>
----------	---	---	--

F. Extracción y Purificación de ARN de Geles de Agarosa (Buffer BD Ref. 21.204³, no incluido en el kit)

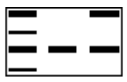

Para poder extraer el ARN del gel, la muestra de ARN deberá ser migrada en gel de agarosa **sin formaldehído o glioxal** utilizando buffer de carga con agentes desnaturalizantes. El formaldehído y el glioxal además de inactivar RNasas y desnaturalizar el ARN, modifican el ARN extraído y éste no puede trabajar correctamente en reacciones enzimáticas posteriores como RT-PCR o transcripción "in vitro". Por otra parte, estos agentes desnaturalizantes reducen el rendimiento de la extracción.

En ausencia de formaldehído el ARN es muy sensible a la degradación por RNasas, extremar las precauciones durante la manipulación de la muestra: utilizar guantes y asegurarse de que el equipamiento y las soluciones a utilizar se encuentren libres de contaminación con RNasas (particularmente la agarosa y el buffer de electroforesis); migrar el gel a voltaje bajo durante el menor tiempo posible en ambiente fresco.

Nota: El ARN migrado en geles no desnaturalizantes puede formar estructuras secundarias y alterar su migración,

Antes de comenzar el protocolo:

- Preparar el Buffer T3 como se indica en la Sección 4
- En caso necesario equilibrar la cantidad necesaria de Buffer E a 70°C
- Preparar un incubador o baño de agua a 50°C

PASO	DESCRIPCIÓN		
1	<p>CORTE DE LA BANDA</p> <p>Cortar la banda del gel utilizando un bisturí estéril e introducirla en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL. Minimizar al máximo el volumen de gel a incluir.</p> <p>No olvidar determinar el peso de la banda cortada</p> <p>Nota: Minimizar el tiempo de exposición a los rayos UV.</p>		CORTAR BANDA
2	<p>LISIS DEL GEL</p> <p>Por cada 100 mg de gel de agarosa < 2% añadir 200 µL BUFFER BD.</p> <p>Incubar durante 5-10 min a 50°C. Vortexear cada 2-3 min hasta que el gel se disuelva completamente.</p> <p>Nota: Para geles de agarosa > 2%, duplicar el volumen de BUFFER BD.</p>		<p>100 mg gel + 200 µL BUFFER BD</p> <p>50°C, 5-10 min</p>
3	<p>Continuar a partir del Paso 3 del protocolo de purificación de ADN de geles de agarosa (5.E).</p>		

³ BUFFER BD debe solicitarse de forma individual Ref. 21.204

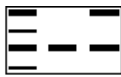



G. Extracción y Purificación de ADN de Geles de Poliacrilamida

En los geles de poliacrilamida los monómeros de acrilamida se encuentran covalentemente unidos en una reacción química, con lo cual el gel no puede ser fácilmente disuelto como los geles de agarosa para proceder con la extracción del ADN atrapado en ellos.

Los geles de poliacrilamida deberán ser aplastados y disueltos. Los geles se deberán romper en pequeños trozos que se incuban en un **Buffer de Difusión** para que el ADN pueda ser difundido pasivamente hacia fuera del gel y así proceder a su purificación.

Antes de comenzar el protocolo:

- Preparar el Buffer T3 como se indica en la Sección 4
- En caso necesario equilibrar la cantidad necesaria de Buffer E a 70°C
- Preparar un incubador o baño de agua a 50 ó 37°C
- Preparar **Buffer de difusión** (Acetato de amonio 500 mM pH 8.0, SDS 0.1 %, EDTA 1 mM, acetato de magnesio 10 mM).

PASO	DESCRIPCIÓN		
1	<p>CORTE DE LA BANDA</p> <p>Cortar la banda del gel con ayuda de un bisturí estéril e introducirla en un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL. Minimizar al máximo el volumen de gel a incluir.</p> <p>No olvidar determinar el peso de la banda cortada</p> <p>Nota: Minimizar el tiempo de exposición a los rayos UV.</p>		CORTAR BANDA
2	<p>RUPTURA MECÁNICA DEL GEL</p> <p>Romper el gel utilizando una punta de pipeta hasta deshacerlo; cuanto más pequeños sean los trozos de gel residuales, mejor será el rendimiento de la extracción del ADN.</p>		ROMPER EL GEL
3	<p>EXTRACCIÓN DEL ADN</p> <p>Añadir 200 µL de Buffer de dilución por cada 100 mg de gel troceado. Asegurarse que los trozos de gel queden totalmente sumergidos en el buffer.</p> <p>Incubar 30-60 min a 50 °C, o toda la noche a 37 °C.</p>		<p>100 mg de gel troceado + 200 µL Buffer de dilución</p> <p>30-60 min a 50 °C</p>
4	<p>REMOCIÓN DE POLIACRILAMIDA</p> <p>Centrifugar 1 min a 14,000 x g y transferir el sobrenadante a un tubo de centrifuga limpio.</p> <p><i>Alternativamente, transferir la mezcla a una columna de unión y centrifugar 1 min a 14,000 x g para retener el gel en la columna. En este caso el ADN se encontrará en el material eluido de la columna.</i></p> <p>Opcional: Para incrementar el rendimiento repetir los pasos 3 y 4 y combinar los sobrenadantes o los eluidos.</p>		<p>1 min, 14,000 x g</p> <p>O bien</p> <p>Cargar en columna Y</p> <p>1 min, 14,000 x g</p>
5	<p>AJUSTAR LAS CONDICIONES DE UNIÓN A LA COLUMNA</p> <p>Mezclar 1 VOL de muestra con 2 VOL de BUFFER B.</p> <p><i>Si al mezclar la muestra con el Buffer B visualiza un cambio de color, corregir el pH de la mezcla (Sección 3.b)</i></p> <p>Nota: Para incrementar el rendimiento de pequeños fragmentos de ADN (< 50 bp) adicionar 2 VOL de etanol.</p>		<p>1 VOL muestra + 2 VOL BUFFER B</p>
6	<p>Continuar a partir del Paso 3 del protocolo de purificación directa de productos de PCR (5.A).</p>		

6. RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Problema	Posibles causas y sugerencias
Bajo rendimiento de ADN	<p>Los reactivos no han sido preparados correctamente</p> <p>Añadir el volumen indicado de etanol 96-100% al BUFFER T3 concentrado.</p> <p>Mezcla de unión (mtra. + Buffer B) pH no óptimo</p> <ul style="list-style-type: none"> Si el Buffer B cambia de color al adicionar la muestra, corregir el pH incorporando acetato de sodio 4M pH 5.0 ó un volumen pequeño de HCl hasta que la mezcla vire al color amarillo (Sección 3.b). <p>Disolución incompleta del gel</p> <ul style="list-style-type: none"> El Buffer B con indicador de pH permite visualizar residuos de gel sin disolver. Aumentar el tiempo de incubación a 50 °C o añadir dos volúmenes de BUFFER B. Agitar con vortex el tubo cada 2 min durante el periodo de incubación a 50°C. <p>La columna no se ha secado completamente</p> <ul style="list-style-type: none"> Para eliminar los restos de etanol del BUFFER T3 centrifugar 5 min a 11,000 x g o incubar la columna 2-5 min a 70°C. La presencia de etanol en la muestra se puede detectar al cargar un gel ya que la muestra flota saliéndose del pocillo. Evitar en todo momento el contacto de la columna con el filtrado. <p>Elución incompleta</p> <ul style="list-style-type: none"> Para eluir grandes cantidades de ADN (> 5 µg), fragmentos de gran tamaño (> 1000 bp), o ADN de geles, eluir en varias etapas con BUFFER E, pre-calentar el buffer a 70 °C e incubar la membrana con el Buffer E durante 5 min antes de centrifugar (Sección 3.c).
Lisis incompleta de los geles	<p>Alto contenido en agarosa</p> <ul style="list-style-type: none"> Para geles de agarosa concentrados, duplicar el volumen de BUFFER B. <p>Tiempo y/o temperatura de lisis insuficientes</p> <ul style="list-style-type: none"> Revisar la temperatura de incubación. Si el peso del gel es elevado, prolongar el tiempo de incubación hasta 20 minutos. Mezclar con vortex cada 2 min y verificar que el gel se ha disuelto completamente antes de la fase de unión a la columna. Si los fragmentos de gel son grandes, seccionarlos antes de la adicción del BUFFER B.
Bajo rendimiento del ADN obtenido en espectrofotómetro de NanoDrop®	<p>Trazas de partículas de sílice en el ADN purificado</p> <ul style="list-style-type: none"> Asegurarse de que no quedan partículas de sílice en la muestra centrifugando > 2min a 11,000 x g y recogiendo el sobrenadante con precaución. <p>Restos de sales caotrópicas (baja ratio A_{260}/A_{230})</p> <ul style="list-style-type: none"> Realizar dos pasos de lavado de la columna con el BUFFER T3 para eliminar completamente cualquier traza del BUFFER B.
Mal funcionamiento del ADN obtenido en secuenciación, análisis de restricción o reacciones de ligación	<p>Restos de etanol en el ADN purificado (BUFFER T3)</p> <ul style="list-style-type: none"> Antes de eluir el ADN de la columna centrifugar 5 min a 11,000 x g y/o incubar la columna 5-10 min a 70°C a fin de eliminar completamente restos del BUFFER T3. La presencia de etanol en la muestra se puede detectar al cargar un gel ya que la muestra flota, saliéndose del pocillo. Evitar el contacto de la columna con el filtrado. <p>Restos de sales caotrópicas</p> <ul style="list-style-type: none"> Realizar dos pasos de lavado de la columna con el BUFFER T3 para eliminar completamente cualquier traza del BUFFER B. <p>Elución de ADN con buffers diferentes al BUFFER E ej. Buffer TE (Tris/EDTA)</p> <ul style="list-style-type: none"> El EDTA puede inhibir reacciones posteriores con el ADN purificado (ej. reacciones de secuenciación). En estos casos se recomienda repetir la purificación del ADN utilizando agua bidestilada estéril o BUFFER E para la fase de elución. <p>Cantidad insuficiente de ADN para realizar la reacción de secuenciación</p> <ul style="list-style-type: none"> Antes de realizar la reacción de secuenciación cuantificar el ADN mediante electroforesis en gel de agarosa. <p>ADN dañado por la exposición a los rayos UV</p> <ul style="list-style-type: none"> Reducir al mínimo el tiempo de exposición de la muestra a los rayos UV cuando se realiza el corte de la banda de ADN en el gel.

7. INFORMACIÓN SOBRE 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

8. LIMITACIONES Y GARANTÍA

1. Producto para uso exclusivo en investigación en análisis *in vitro*.
2. El kit no ha sido diseñado para uso clínico (diagnóstico, terapia u otros usos no específicamente contemplados) o para identificar un determinado microorganismo.
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 microorganismo o tipo de células.
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:

Los laboratorios de 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.