

BIOTOOLS

BIOTOOLS B&M LABS.S.A.

Producido por:

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

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

SPEEDTOOLS PLANT DNA EXTRACTION KIT

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

Manual de Uso (Ref. 21.170/1/2)

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

1. EXPLICACIÓN DEL KIT

SPEEDTOOLS PLANT DNA EXTRACTION KIT permite una rápida y eficiente extracción de ADN genómico de alta calidad procedente de tejidos vegetales y alimentos de origen vegetal (fresco, congelado y desecado).

El Kit combina la eficiencia del buffer de lisis con una innovadora tecnología de unión de ácidos nucleicos a una membrana. Estas importantes ventajas simplifican el número de pasos del kit y reducen manipulaciones con diversos reactivos.

Se recomienda homogenizar la muestra para mejorar la eficiencia del proceso de extracción. En un primer paso la muestra homogenizada se trata con Proteinasa K y el buffer de lisis (Buffer L), que contiene CTAB, enzimas líticas y agentes no-caotrópicos. Tras la lisis se eliminan los contaminantes y desechos celulares del lisado mediante filtración o centrifugación. Posteriormente se trata el filtrado con el buffer de unión (Solution P) creándose así las condiciones necesarias para la unión del ADN a la membrana de la columna. Después se cargará la mezcla a una de las columnas proporcionadas con el Kit. El paso de unión del ADN es específico además de reversible. Los contaminantes presentes en la muestra son eliminados mediante sucesivos lavados de la columna con diferentes buffers (Buffer W1 y Buffer W2). Finalmente el ADN es eluido específicamente de la membrana mediante el empleo del Buffer E.

2. REACTIVOS INCLUIDOS EN EL KIT

SPEEDTOOLS PLANT DNA EXTRACTION KIT			
	Ref. 21.170 10 (2x5) Preps	Ref. 21.171 50 Preps	Ref. 21.172 250 Preps
BUFFER L Buffer de Lisis	2x2 ml	30 ml	5 x 30 ml
SOLUTION P Solución de Unión a la Columna	4 x 1 ml (lista para usar)	4 ml	5 x 4 ml
BUFFER W1 Buffer de Lavado I	2x15 ml (listo para usar)	30 ml	5 x 30 ml
BUFFER W2 Buffer de Lavado II	2x15 ml (listo para usar)	18 ml	5 x 18 ml
PROTEINASE K (lío-filizada)	2x1 vial	1 vial	5 viales
BUFFER E Buffer de Elución	2x2 ml	15 ml	5 x 15 ml
BIOTOOLS PREFILTER Prefiltro	2x5	50	5 x 50
BIOTOOLS BINDING COLUMN Columna de Unión	2x5	50	5 x 50
1.5 ml COLLECTING TUBES Tubos Colectores de 1.5 ml	2x5	50	5 x 50
2 ml COLLECTING TUBES Tubos Colectores de 2 ml	2x10	100	5 x 100
PROTOCOLO	2x1	1	5 x 1

3. USO PREVISTO

Todos los reactivos incluidos en el Kit han sido optimizados para la obtención de ADN de alta pureza a partir de muestras de origen vegetal, proporcionando altos rendimientos.

El kit se basa en una nueva tecnología patentada para la unión de ácidos nucleicos¹ a un soporte sólido o membrana sin emplear agentes caotrópicos de alta toxicidad, ni alta concentración de sales. El uso del buffer de lisis sin agentes caotrópicos en su composición simplifica el proceso de extracción, ahorrando tiempo y pasos de manipulación de reactivos.

Por preparación se pueden procesar hasta 100 mg de materia fresca vegetal, siendo el tiempo medio de extracción y purificación de ADN de unos 20 minutos. El rendimiento medio obtenido con el kit es de 50 µg (variable en función de la muestra de origen). La pureza del ADN obtenido (ratio A260/A280 entre 1.60 – 2.0) permite su uso en posteriores aplicaciones como PCR, análisis RFLP, digestión con enzimas de restricción, secuenciación, clonaje o *Southern blot*.

Características Generales del Kit	
Tamaño de la muestra de origen	Hasta 100 mg de plantas frescas ó hasta 60 mg de plantas desecadas
Rendimiento	Hasta 50 µg (dependiendo de la cantidad y del tipo de material de origen)
A₂₆₀:A₂₈₀	1.6 – 2.0
Volumen de elución	100 µl
Tiempo	20 min (después de la lisis)
Tipo de columna	mini

4. CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS DE ORIGEN

Las muestras de plantas y/o alimentos de origen vegetal a ser utilizadas como material de origen pueden almacenarse durante 2-3 horas a temperatura ambiente (20-25°C); por periodos de almacenamiento cortos (máximo de una semana) a 4 °C y para un almacenamiento prolongado se recomienda conservar las muestras a -20°C o -80°C. En este último caso, evitar múltiples ciclos de congelación/descongelación previos a la extracción del ADN.

5. RENDIMIENTO DE ADN

La cantidad de ADN purificado a partir de plantas y/o de alimentos de origen vegetal dependerá del material de origen, así como de las condiciones de transporte y de almacenamiento y del tiempo de almacenamiento de esta muestra.

¹La tecnología utilizada así como su aplicación esta protegida por las siguientes patentes: US 6,110,363, US 6,043,354, US 6,037,465, EP 0880535, WO 9728171, WO 9534569, EP 0765335, DE 19506887, DE 10041825.2, WO 0034463.

6. PREPARACIÓN DE REACTIVOS E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

NOTA: *Buffer L, Buffer W1 y Proteinase K incluyen componentes nocivos. Solution P final es fácilmente inflamable e irritante. Utilice guantes de examen desechables, bata de laboratorio y gafas protectoras mientras trabaje con el Kit.*

Los reactivos incluidos en el kit, excepto el vial Proteinase K, pueden almacenarse a temperatura ambiente (20-25°C) siendo estables durante 12 meses desde su fecha de fabricación. La **Proteinasa K liofilizada** debe almacenarse a **2-8°C** pero una vez disuelto la solución se almacenará a **-20°C**.

Antes de comenzar cualquier ensayo con el Kit **SPEEDTOOLS PLANT DNA EXTRACTION** prepare las siguientes soluciones:

I. **Proteinase K:**

- ✓ **Formato 10(2x5) preps:** Reconstituya el tubo liofilizado de Proteinase K añadiendo **250 µL** de agua bidestilada estéril.
- ✓ **Formato 50 preps:** Reconstituya el tubo liofilizado de Proteinase K añadiendo **1 mL** de agua bidestilada estéril.

Almacenar la solución de Proteinasa K a -20°C. La actividad enzimática de la proteinasa K se afecta significativamente si la solución se somete a continuos ciclos de congelación/descongelación. Dividir el vial en alícuotas y almacenarlas a -20°C.

II. **SOLUCIÓN P (Solución de Unión a la Columna):**

- ✓ **Formato 10(2x5) preps:** En este formato la solución se proporciona lista para usar.
- ✓ **Formato 50 preps:** Añada **11 ml de isopropanol (98-100%)** a la Solución de Unión P concentrada incluida en el kit. Mezcle exhaustivamente mediante agitación durante 1 min. Antes de cada uso vuelva a mezclar la solución reiteradas veces por inversión.

III. **BUFFER W1 (Buffer de Lavado I):**

- ✓ **Formato 10(2x5) preps:** En este formato la solución se proporciona lista para usar.
- ✓ **Formato 50 preps:** Añada **30 ml de etanol (96-100%)** al Buffer W1 concentrado incluido en el kit. Mezcle completamente y mantenga bien cerrado el envase.

IV. **BUFFER W2 (Buffer de Lavado II):**

- ✓ **Formato 10(2x5) preps:** En este formato la solución se proporciona lista para usar.
- ✓ **Formato 50 preps:** Añada **42 ml de etanol (96-100%)** al Buffer W2 concentrado incluido en el kit. Mezcle completamente y mantenga bien cerrado el envase.

Equilibre los componentes del Kit a temperatura ambiente. Si existiera un precipitado en algunas de las soluciones caliente ligeramente el envase.

7. EQUIPOS Y REACTIVOS NECESARIOS Y NO PROVISTOS

- Equipo apropiado para homogenizar la muestra en caso de que sea necesario ej. mortero, homogeneizadores comerciales, bolas de acero, etc.
- Baño de agua / Incubadora / Termobloque
- **Isopropanol 98-100%**
- **Etanol 96-100%**
- Vortex
- Microcentrífuga y tubos
- Agua bidestilada estéril
- Opcional: RNase A (10 mg/ml)

8. PROTOCOLO ESTÁNDAR PARA LA EXTRACCIÓN DE DNA DE PLANTAS Y DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Antes de comenzar el protocolo prepare un baño/incubadora/termobloque a 65°C. Equilibre el Buffer E a 65°C. Prepare la solución de Proteinasa K, la Solución P, el Buffer W1 y el Buffer W2 como se indica en la sección 6.

PASO	DESCRIPCIÓN		
1	<p>HOMOGENIZACIÓN DE LA MUESTRA</p> <p><i>El protocolo de lisis es más efectivo si el material de partida está pulverizado: homogeneice la muestra de forma manual o utilizando un homogeneizador comercial.</i></p> <p>Homogeneice alrededor de 60 mg de muestra. Si el material de partida contiene un elevado contenido de agua ej. algas, frutas, etc. puede emplearse hasta 120-180 mg de materia fresca.</p>		HOMOGENIZACIÓN DE LA MUESTRA (60 mg)
2	<p>LISIS DE LA MUESTRA Y FILTRACIÓN</p> <p>Transfiera el material homogeneizado a un tubo de reacción de 1.5 ml. Añada 400 µl Lysis Buffer L y 20 µl Proteinase K. Vortex brevemente e incube 30 min a 65°C con agitación continua.</p> <p>Para cada preparación utilice un Prefiltro. Coloque este filtro en un tubo colector "Collecting Tube" de 2 ml. Cargue el lisado en el filtro y centrifugue 1 min a 12,000 rpm. Descarte el Prefiltro y conserve el filtrado.</p> <p><i>Si quiere eliminar el ARN presente en el filtrado añada 40 µl of RNase A (10 mg/ml), vortex brevemente e incube 5 min a temperatura ambiente.</i></p>	 	+ 400 µl BUFFER L 20µl PROTEINASEK Vortex 65°C, 30 mi con agitación Transferir lisado a un Prefiltro 1 min, 12,000 rpm
3	<p>ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DE UNIÓN DEL ADN A LA COLUMNA</p> <p>Añada 200 µl Solution P a cada tubo con el filtrado y mezcle utilizando un vortex.</p>		+ 200 µl SOLUTION P vortex
4	<p>UNIÓN DEL ADN</p> <p>Coloque una Columna de unión en un nuevo tubo de 2 ml. Transfiera la mezcla del lisado en la columna e incube durante 1 min. Centrifugue 1 min a 12,000 rpm. Descarte el filtrado y coloque la columna de nuevo en el tubo colector.</p>	 	CARGUE LA MEZCLA EN UNA Columna de Unión 1 min, 12,000 rpm
5	<p>LAVADO</p> <p>1^{er} Lavado</p> <p>Añada 550 µl Buffer W1. Centrifugue 1 min at 12,000 rpm. Descarte el filtrado y coloque la columna de nuevo en el tubo colector.</p> <p>2^{do} Lavado y 3^{er} Lavado</p> <p>Añada 550 µl Buffer W2. Centrifugue 1 min at 12,000 rpm. Descarte el filtrado y coloque la columna de nuevo en el tubo colector. Repita el paso de lavado. Para eliminar el etanol residual de la columna centrifugue 2 min a 12,000 x g. Descarte el eluido.</p>	 	+ 550 µl BUFFER W1 1 min, 12,000 rpm + 550 µl BUFFER W2 1 min, 12,000 rpm + 550 µl BUFFER W2 1 min, 12,000 rpm 2 min, 12,000 rpm
6	<p>ELUCIÓN DEL ADN PURO</p> <p>Coloque la columna en un tubo colector de 1.5 ml. Añada 100 µl de Buffer E precalentado a (65°C). Dispense el Buffer E directamente sobre la membrana. Incube 3 min a temperatura ambiente. Centrifugue 1 min a 10,000 rpm. El eluido contiene el ADN puro procedente de la muestra.</p> <p><i>NOTA: El volumen mínimo de elución del Buffer E es de 50 µl. Si se espera obtener un alto contenido de ADN el volumen de buffer de elución puede incrementarse de 100-200 µl.</i></p>	 	100 µl BUFFER E (65°C) Incube 3 min a TA 1 min, 10,000 rpm

9. RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Problema	Posible causa y sugerencias
Columna obturada	<p>Lisis insuficiente y/o demasiado material de partida</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aumente el tiempo de lisis • Aumente el tiempo y velocidad de centrifugación • Reduzca la cantidad de muestra inicial
Baja concentración de ADN extraído	<p>Lisis insuficiente</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aumente el tiempo de lisis • Reduzca la cantidad de material de partida. Si la columna se sobrecarga se reducirá el rendimiento obtenido • No olvide añadir al lisado Proteinase K <p>Elución incompleta</p> <ul style="list-style-type: none"> • Prolongue 5-10 min el tiempo de incubación con el buffer de elución E • Repita el paso de elución de nuevo • Incremente el volumen del buffer de elución E <p>El lisado no se ha mezclado bien con la solución de unión</p> <ul style="list-style-type: none"> • Antes de transferir el lisado a la columna mezcle bien el lisado con la solución P pipeteando arriba y abajo o mezclando con un vortex
Baja concentración de ADN extraído	<p>Demasiado volumen de Buffer de Elución (Buffer E)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Eluya el ADN en menor volumen de buffer E
ADN degradado o « shared »	<p>Almacenamiento incorrecto de la muestra o material antiguo</p> <ul style="list-style-type: none"> • Asegúrese que el material de partida es fresco o se ha almacenado correctamente. Evite congelar y descongelar la muestra repetidas veces • Las muestras antiguas suelen contener ADN degradado. Evite ciclos continuados de congelación y descongelación de la muestra
Contaminación del ADN extraído con ARN	<ul style="list-style-type: none"> • Realice una digestión del eluido con RNase A (no incluida en el kit)
El ADN obtenido no funciona bien en aplicaciones posteriores	<p>Presencia de etanol en el eluido</p> <ul style="list-style-type: none"> • Antes de pasar al paso de elución del ADN asegúrese que no quedan restos de etanol procedentes de los buffers de lavado. Aumente el tiempo de centrifugación. <p>Existencia de sales en el eluido</p> <ul style="list-style-type: none"> • Asegúrese que los buffers de lavado se encuentran a temperatura ambiente. Verifique que no existan precipitados en los buffers. Si observa material precipitado, antes de su utilizar caliente ligeramente el buffer para solubilizarlo

10. INFORMACIÓN DE PEDIDOS

SPEEDTOOLS KIT	10(2x5) 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

11. 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), o mediante petición a nuestro Dpto. Técnico (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 planta de alta calidad. 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.
3. BIOTOOLS garantiza la conformidad del kit con las especificaciones del producto. Si el kit no estuviera conforme a las mismas sería reemplazado.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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 de BIOTOOLS, carecen de valor alguno y no forman parte de la garantía del contrato de venta.
9. 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.
10. 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).

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

© 2009 BIOTOOLS, Biotechnological & Medical Laboratories, S.A. Todos los derechos reservados.