

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*

Manual de Uso (Ref. 21.170M/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.

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.

Previo a comenzar el protocolo del Kit las muestras deben ser homogeneizadas. Tras este primer paso el DNA se extrae con los buffers de lisis (Buffer L1 y Buffer L2) que contienen sales caotrópicas, agentes desnaturalizantes y detergentes. Tras la lisis se eliminan los contaminantes y desechos celulares del lisado mediante centrifugación usando los filtros (Filters) suministrados en el kit

Posteriormente se trata el filtrado con el buffer de unión (Buffer B) creándose así las condiciones necesarias para la unión del ADN a la membrana de sílice. Después se cargará la mezcla a una de las columnas proporcionadas con el Kit (Binding Columns). 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 y está listo para usarse en posteriores aplicaciones.

2. REACTIVOS INCLUIDOS EN EL KIT

SPEEDTOOLS PLANT DNA EXTRACTION KIT			
	Ref. 21.170M 10 Preps	Ref. 21.171 50 Preps	Ref. 21.172 250 Preps
Buffer L1 Buffer de Lisis	5 ml	25 ml	125 ml
Buffer L2 Buffer de Lisis	4 ml	20 ml	100 ml
Buffer P Precipitation Buffer	1 ml	10 ml	25 ml
Buffer B Binding Buffer	6 ml	30 ml	125 ml
Buffer W1 Buffer de Lavado 1	6 ml	30 ml	125 ml
Buffer W2 Buffer de Lavado 2	6 ml	25 ml	50 ml
Buffer E Buffer de Elución	13 ml	13 ml	30 ml
RNase A (Liofilizada)	1,5 mg	6 mg	2 x 15 mg
Filters (Filtros)	10	50	250
Binding Columns (Columnas de Unión)	10	50	250
2 ml Collection Tubes Tubos Colectores de 2 ml	20	100	500
PROTOCOLO	1	1	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.

Por preparación se pueden procesar hasta 100 mg de materia fresca vegetal, siendo el tiempo medio de extracción y purificación de ADN de unos 30 minutos. El rendimiento medio obtenido con el kit es de 30 µg (variable en función de la muestra de origen). La pureza del ADN obtenido (ratio A260/A280 entre 1.80 – 1.9) 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 20 mg de plantas desecadas
Rendimiento	1-30 µg (dependiendo de la cantidad y del tipo de material de origen)
A₂₆₀:A₂₈₀	1.8 – 1.9
Volumen de elución	2 x 50 µl
Tiempo	30 min
Tipo de columna	mini

4. CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS DE ORIGEN

Las muestras vegetales pueden ser conservadas en etanol, pueden ser liofilizadas o pueden congelarse. Las muestras vegetales frescas pueden conservarse a 4º durante un día pero deben congelarse para periodos superiores de almacenamiento. 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.

6. PREPARACIÓN DE REACTIVOS E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

NOTA: El Buffer L1, Buffer L2, Buffer B y el Buffer W1 contienen hidrocloreto de guanidina y/o detergentes como el CTAB o el SDS. Utilice guantes de examen desechables, bata de laboratorio y gafas protectoras mientras trabaje con el Kit.

NOTA: El Buffer B y el Buffer W1 contienen hidrocloreto de guanidina que reacciona con la lejía. Evite el contacto directo entre el hidrocloreto de guanidina y el hipoclorito de sodio (lejía) u otros agentes altamente reactivos como ácidos y bases. Tales mezclas pueden producir gases nocivos.

Todos los reactivos incluidos en el kit, pueden almacenarse a temperatura ambiente (20-25°C) siendo estables durante 12 meses desde su fecha de fabricación.

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

I. Buffer L1/L2:

- ✓ Verifique la ausencia de precipitados especialmente tras guardar el reactivo a temperaturas inferiores a 20°. En caso necesario incube el vial durante varios minutos a 30°-40° y mezcle bien hasta que el precipitado se haya disuelto completamente

II. Buffer W2 (Buffer de Lavado 2):

- ✓ **Formato 10 preps:** Añada 24 ml de Etanol Molecular Grade (96-100%) (No suministrado). Mezcle completamente. El buffer será estable a temperatura ambiente (18°-25°) durante al menos un año.
- ✓ **Formato 50 preps:** Añada 100 ml de Etanol Molecular Grade (96-100%) (No suministrado). Mezcle completamente. El buffer será estable a temperatura ambiente (18°-25°) durante al menos un año.
- ✓ **Formato 250 preps:** Añada 200 ml de Etanol Molecular Grade (96-100%). Mezcle completamente. El buffer será estable a temperatura ambiente (18°-25°) durante al menos un año.

III. RNase A:

- ✓ **Formato 10 preps:** Añada 150µl H₂O. Mezcle completamente y conserve la RNase A a 4° durante 3 meses como máximo. Para conservarla durante más tiempo haga alícuotas y consérvelas a -20°
- ✓ **Formato 50 preps:** Añada 600µl H₂O. Mezcle completamente y conserve la RNase A a 4° durante 3 meses como máximo. Para conservarla durante más tiempo haga alícuotas y consérvelas a -20°
- ✓ **Formato 250 preps:** (2 x 15mg) Añada 1500µl H₂O a cada vial. Mezcle completamente y conserve la RNase A a 4° durante 3 meses como máximo. Para conservarla durante más tiempo haga alícuotas y consérvelas a -20°




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
- **Etanol Molecular Grade 96-100%**
- Vortex
- Microcentrífuga y tubos
- Agua bidestilada estéril

8. PROTOCOLO ESTÁNDAR PARA LA EXTRACCIÓN DE DNA DE PLANTAS

Antes de comenzar el protocolo prepare un baño/incubadora/termobloque a 65°C. Caliente el Buffer E a 65°C. Prepare el Buffer W2 y la RNase A como se indica en la sección 6.

NOTA: El Speedtools Plant DNA Extraction Kit incluye dos buffers de lisis diferentes. El protocolo estándar incluye el Buffer L1 basado en la técnica del CTAB. Adicionalmente incluimos el Buffer L2 basado en la técnica del SDS que requiere una posterior precipitación de proteínas con el Buffer P. En la mayoría de las especies vegetales ambos sistemas dan un rendimiento óptimo. Se recomienda probar ambos sistemas en paralelo si es la primera vez que se realiza la extracción de DNA de una determinada especie vegetal.

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 como máximo 100mg de muestra fresca o 20mg si se trata de material liofilizado.</p> <p>Continúe con la lisis celular utilizando el Buffer L1 (Paso 2a) o alternativamente Los Buffers L2 y P (paso 2b)</p>		<p>HOMOGENIZACIÓN DE LA MUESTRA (100 mg)</p>
2	<p>LISIS DE LA MUESTRA Y FILTRACIÓN.</p> <p>2a</p> <p>Transfiera el material homogeneizado a un vial. Añada 400 µl de Buffer L1. Mézclelo completamente con Vortex.</p> <p>NOTA: Si la muestra no se puede resuspender fácilmente con 400µl de Buffer L1 se puede añadir más cantidad. En ese caso se tendría que aumentar los volúmenes de RNase A y de Buffer B (Paso 4) de manera proporcional.</p> <p>Añada 10µl de RNase A y mezcle completamente</p> <p>Incube la mezcla durante 10 minutos a 65° (En algunas especies vegetales es ventajoso aumentar el tiempo de incubación entre 30 y 60 minutos)</p> <p>SIGA EL PROTOCOLO EN EL PASO 3</p> <p style="text-align: center;">ALTERNATIVAMENTE</p> <p>2b</p> <p>Transfiera el material homogeneizado a un vial. Y añada 300µl de Buffer L2. Mézclelo completamente con Vortex.</p> <p>NOTA: Si la muestra no se puede resuspender fácilmente con 300µl de Buffer L2 se puede añadir más cantidad. En ese caso se tendría que aumentar los volúmenes de RNase A, Buffer P (Paso 2b) y de Buffer B (Paso 4) de manera proporcional.</p> <p>Añada 10µl de RNase A y mezcle completamente</p> <p>Incube la mezcla durante 10 minutos a 65° (En algunas especies vegetales es ventajoso aumentar el tiempo de incubación entre 30 y 60 minutos)</p> <p>Añada 75µl de Buffer P, mezcle completamente e incube durante 5 minutos en hielo.</p> <p>SIGA EL PROTOCOLO EN EL PASO 3</p>		<p>400 µl BUFFER L1 Vortex</p> <p style="text-align: center;">+</p> <p>10µl RNase A</p> <p>65°C, 10 min.</p>
			<p>300µl BUFFER L2 Vortex</p> <p style="text-align: center;">+</p> <p>10µl RNase A</p> <p>65°C, 10 min.</p> <p style="text-align: center;">+</p> <p>75µl Buffer P</p> <p>5 min. En hielo</p>

<p>3</p>	<p>FILTRADO Y ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DE UNIÓN DEL ADN</p> <p>Ponga un filtro (Filter - violeta) sobre un tubo colector de 2ml (Collection Tube) y transfiera el lisado a la columna. Centrifugue durante 2 minutos a 11,000g. Descarte el Filtro y reserve el filtrado.</p> <p>Si no ha pasado todo el lisado a través del filtro repita el proceso de centrifugado.</p> <p>Añada 450µl de Buffer B al filtrado y mezcle completamente mediante pipeteo o con vortex</p>		<p>CARGUE EL LISADO EN UN FILTRO</p> <p>2 min 11,000g</p> <p>+</p> <p>450µl BUFFER B</p>
<p>4</p>	<p>UNIÓN DEL ADN</p> <p>Coloque una Columna de unión (Binding Column - verde) en un nuevo tubo colector de 2 ml (Collection Tube) y transfiera un máximo de 700µl de muestra.</p> <p>Centrifugue 1 min a 11,000g y descarte el filtrado</p> <p>La capacidad máxima de la columna de unión son 700ul de muestra. Para volúmenes superiores repita el proceso</p>		<p>CARGUE 700ul DE MUESTRA EN UNA COLUMNA DE UNIÓN (Binding Column)</p> <p>1 min, 11,000g</p>
<p>5</p>	<p>LAVADO</p> <p>1^{er} Lavado</p> <p>Añada 400 µl de Buffer W1 a la Columna de Unión (Binding Column). Centrifugue 1 min at 11,000g. Descarte el filtrado y coloque la columna de nuevo en el tubo colector.</p> <p>2^{do} Lavado</p> <p>Añada 700 µl de Buffer W2 a la Columna de Unión. Centrifugue 1 min at 11,000g. Descarte el filtrado y coloque la columna de nuevo en el tubo colector.</p> <p>3^{er} Lavado</p> <p>Añada 200 µl de Buffer W2 a la Columna de Unión . Centrifugue 2 min at 11,000g para eliminar el Buffer W2 y secar la membrana de sílice completamente. Descarte el eluido.</p>		<p>+</p> <p>400 µl BUFFER W1 1 min, 11,000g</p> <p>+</p> <p>700 µl BUFFER W2 1 min, 11,000g</p> <p>+</p> <p>200 µl BUFFER W2 2 min, 11,000g</p>
<p>6</p>	<p>ELUCIÓN DEL ADN PURO</p> <p>Coloque la Columna de Unión en un vial de 1.5 ml (no suministrado). Añada 50 µl de Buffer E precalentado a (65°C). Dispense el Buffer E directamente sobre la membrana. Incube 5 min a 65°. Centrifugue 1 min a 11,000g.</p> <p>Repita este mismo paso con otros 50µl de Buffer E (precalentado a 65°) y eluya en el mismo vial. El eluido contiene el ADN puro procedente de la muestra.</p> <p>NOTA: El Buffer E no contiene EDTA. Si se observa degradación del DNA posterior a su conservación, ajuste EDTA en el Buffer E a una concentración 1mM antes del proceso de elución</p>		<p>50 µl BUFFER E (65°C)</p> <p>Incube 5 min a 65°</p> <p>1 min, 11,000g</p> <p>Repita el Proceso</p>

9. RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Problema	Posible causa y sugerencias
Columna o Filtro obturado	<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 • Añada más cantidad de Buffer L1 o L2
Baja concentración de ADN extraído	<p>Lisis insuficiente</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aumente el tiempo de lisis • Añada más cantidad de Buffer L1 o L2 • Pruebe en paralelo el sistema de lisis del Buffer L1 y del Buffer L2 • Reduzca la cantidad de material de partida. Si la columna se sobrecarga se reducirá el rendimiento obtenido <p>Homogeneización insuficiente</p> <ul style="list-style-type: none"> • El proceso de lisado es más efectivo si el material de partida está pulverizado: homogeneice la muestra de forma manual o utilizando un homogeneizador comercial <p>Elución incompleta</p> <ul style="list-style-type: none"> • Prolongue 5-10 min el tiempo de incubación con el buffer E • Repita el paso de elución de nuevo • Incremente el volumen del buffer E <p>Volumen insuficiente de Buffer B</p> <ul style="list-style-type: none"> • Si ha utilizado mayor volumen de Buffer L1 o L2 incremente proporcionalmente el volumen de Buffer B <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 <p>Contaminación de la muestra con DNAsa</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ajuste el Buffer E a 1mM EDTA <p>Velocidad de Centrifugado muy alta</p> <ul style="list-style-type: none"> • Centrifugue a una velocidad máxima de 11,000g.
El ADN obtenido no funciona bien en aplicaciones posteriores	<p>Presencia de etanol en el eluido</p> <ul style="list-style-type: none"> • Asegúrese que los dos últimos lavados se realizan con Buffer W2 y que la membrana se ha secado completamente siguiendo el protocolo.

10. INFORMACIÓN DE PEDIDOS

SPEEDTOOLS KIT	10(2x5) PREPS	50 PREPS	250 PREPS
SPEEDTOOLS DNA EXTRACTION KIT	Ref. 21.130M	Ref. 21.131	Ref. 21.132
SPEEDTOOLS TISSUE DNA EXTRACTION KIT	Ref. 21.135M	Ref. 21.136	Ref. 21.137
SPEEDTOOLS RNA VIRUS EXTRACTION KIT	Ref. 21.140M	Ref. 21.141	Ref. 21.142
SPEEDTOOLS FOOD DNA EXTRACTION KIT	Ref. 21.175M	Ref. 21.176	Ref. 21.177
SPEEDTOOLS PLANT DNA EXTRACTION KIT	Ref. 21.170M	Ref. 21.171	Ref. 21.172
SPEEDTOOLS TOTAL RNA EXTRACTION KIT	Ref. 21.210M	Ref. 21.211	Ref. 21.212
SPEEDTOOLS PCR CLEAN-UP KIT	Ref. 21.200M	Ref. 21.201	Ref. 21.202
SPEEDTOOLS PLASMID DNA PURIFICATION KIT	Ref. 21.220M	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 (technicalsupport@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 (technicalsupport@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 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.