

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 TISSUE DNA EXTRACTION KIT

***Kit para la Extracción y Purificación de ADN
Genómico a partir de Tejidos, Células, Bacterias,
Hongos y Fluidos Orgánicos***

Instrucciones de Uso (Ref. 21.135/6/7)

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

Índice

INSTRUCCIONES DE USO	1
1. EXPLICACIÓN DEL KIT	3
2. REACTIVOS INCLUIDOS EN EL KIT	3
3. USO PREVISTO	3
4. PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LOS REACTIVOS	4
5. ELUCIÓN DEL ADN	5
6. INSTRUCCIONES DE USO	6
A. PROTOCOLO ESTÁNDAR-para tejido humano o animal y para células en cultivo	6
B. Protocolo para extracción de ADN genómico de colas de rata o ratón	8
C. Protocolo para la purificación de ADN genómico de cultivos bacterianos	9
D. Protocolo para purificación de ADN genómico de levaduras	10
E. Protocolo para extracción de ADN genómico de manchas de sangre seca	11
F. Protocolo para extracción de ADN genómico y viral a partir de muestras de sangre	12
G. Protocolo para la purificación de ADN genómico de raíces de pelo	13
H. Protocolo para extracción de ADN genómico de tejidos embebidos en parafina	13
I. Protocolo para la purificación de ADN genómico de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> o <i>Legionella pneumophila</i> a partir de esputos o lavados broncoalveolares	14
J. Protocolo para extracción de ADN genómico de heces	15
K. Protocolo para extracción de ADN viral a partir de muestras de heces	16
L. Protocolo para la purificación de ADN de cepas de <i>E. Coli</i> productoras de verotoxinas (EHEC) en muestras de comida	17
M. Protocolo para la purificación de ADN genómico de origen bacteriano (ej. <i>Borrelia burgdorferi</i>) a partir de muestras de orina	18
N. Protocolo para la purificación de ADN viral (ej. CMV) de muestras de orina	19
O. Protocolo para la purificación de ADN bacteriano (ej. <i>Chlamydia trachomatis</i>) a partir de muestras de cultivo, de fluidos biológicos o de muestras clínicas	20
P. Protocolo para la purificación de ADN genómico de insectos	20
Q. Protocolo para la purificación de ADN genómico de torundas/bastoncitos con muestras dentales (<i>dental swabs</i>)	21
R. Protocolo para la purificación de ADN genómico de torundas/bastoncitos con muestras bucales (<i>buccal swabs</i>)	22
7. RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS	23
8. INFORMACIÓN SOBRES PEDIDOS	25
9. LIMITACIONES Y GARANTÍA	26

1. EXPLICACIÓN DEL KIT

El Kit SPEEDTOOLS TISSUE DNA EXTRACTION permite una rápida y eficiente extracción de ADN genómico de alta calidad procedente de:

- **Tejidos** – se puede extraer ADN de **muestras embebidas en parafina, pelo** si incluye la raíz, **sangre** fresca o seca de origen humano o animal, etc.
- **Células** – ej. **bacterias, hongos**, etc.
- **Virus ADN**
- **Fluidos Orgánicos** – como **suero, orina, esputos, bastoncitos o torundas impregnadas con muestras** dentales, bucales, etc.
- **Heces**

En un primer paso la muestra se incuba en una solución con proteinasa K/SDS que produce la lisis celular. La adición de etanol y agentes caotrópicos en un segundo paso crea las condiciones necesarias de unión del ADN a las partículas de sílica de la membrana de la columna. El paso de unión del ADN a la membrana de la columna es específico además de reversible. Los contaminantes presentes en la muestra son eliminados mediante sucesivos lavados de la columna con diferentes buffers de lavado. Finalmente el ADN es eluido específicamente en un buffer de baja fuerza iónica y pH ligeramente alcalino.

2. REACTIVOS INCLUIDOS EN EL KIT

SPEEDTOOLS TISSUE DNA EXTRACTION KIT			
Reactivo	10 Preps Ref. 21.135	50 Preps Ref. 21.136	250 Preps Ref. 21.137
Buffer BT1	5 mL	20 mL	5 x 20 mL
Buffer BB3	10 mL	15 mL	5 x 15 mL
Buffer BB5 (concentrado)	6 mL	12 mL	5 x 12 mL
Buffer BBW	6 mL	30 mL	5 x 30 mL
Buffer BBE	13 mL	13 mL	5 x 13 mL
Proteinase K (liofilizado)	6 mg	30 mg	5 x 30 mg
Proteinase Buffer (PB)	1.8 mL	1.8 mL	5 x 1.8 mL
Columnas para unión del ADN (más Collecting Tubes)	10	50	5 x 50
Collecting Tubes	20	100	5 x 100
Protocolo	1	1	5 x 1

3. USO PREVISTO

El método empleado por el Kit permite la obtención de ADN total (genómico y mitocondrial) a partir de tejidos, células y muestras diversas. Además el Kit co-purifica el ADN bacteriano y viral presente en estas muestras.

Las columnas provistas por el Kit poseen una capacidad de unión de ADN genómico de hasta 60 µg. Siendo su rendimiento de 35 µg de ADN genómico de alta pureza, con un ratio A260/A280 de alrededor de 1.70-1.90.

Para la extracción de ADN genómico a partir de bacterias y hongos puede ser necesario emplear para la lisis enzimas adicionales no proporcionado con el Kit. Este manual incluye protocolos detallados para este tipo de muestras.

El ADN obtenido es adecuado para posteriores usos como Southern blotting, PCR en Tiempo Real o reacciones enzimáticas.

El Speedtools Tissue DNA Extraction kit está certificado como **producto de calidad forense**. La calidad forense requiere que el material fungible se encuentre libre de ADN contaminante. El material fungible incluido en este kit es tratado con óxido de etileno para eliminar residuos de ADN amplificable.

Tabla 1: Características Generales del Kit	
Tamaño de la Muestra	< 25 mg tejido/10 ² -10 ⁷ células en cultivo
Rendimiento Medio	20-35 µg
Volumen de Elución	60-100 µL
Capacidad de Unión	60 µg
Tiempo Empleado / prep.	20 min /preparación (una vez lisada la muestra)
Tipo de Columna	Mini spin

4. PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LOS REACTIVOS

NOTA: Los Buffers BB3 y BBW contienen hidrocloreuro de guanidina, utilice en todo momento guantes y gafas de protección.

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.

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

I. **Proteinase K:**

- ✓ **Formato 10 preps:** Reconstituya el tubo liofilizado de Proteinase K añadiendo **260 µL** de Proteinase Buffer (PB).
- ✓ **Formato 50 preps:** Reconstituya el tubo liofilizado de Proteinase K añadiendo **1.35 mL** de Proteinase Buffer (PB).

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

II. **Buffer BB5:**

- ✓ **Formato 10 preps:** Añada **24 mL** de etanol (96-100%) al Buffer BB5 concentrado y mezcle el buffer resultante. Realice una marca en la etiqueta del frasco para indicar que el etanol ha sido añadido.
- ✓ **Formato 50 preps:** Añada **48 mL** de etanol (96-100%) al Buffer BB5 concentrado y mezcle el buffer resultante. Realice una marca en la etiqueta del frasco para indicar que el etanol ha sido añadido.

El Buffer BB5 diluido es estable a temperatura ambiente (18-25°C) durante al menos 12 meses.

NOTA: Los Buffers BT1 y BB3 pueden precipitar a bajas temperaturas formando un precipitado blanco. Disuelva los precipitados blanquecinos incubando el frasco a 50-70°C antes de utilizar.

5. ELUCIÓN DEL ADN

Utilizando el método de extracción estándar se recupera entre un 70-90% del ADN unido a la membrana; a fin de incrementar el rendimiento y/o la concentración del ADN purificado es posible aplicar diferentes modificaciones sobre este protocolo.

A continuación se detallan diferentes procedimientos de elución del ADN:

- **Para obtener mayor rendimiento:** Realice dos pasos de elución con el volumen indicado en el protocolo individual, de esta forma se podrá recuperar entre un 90-100% del ADN unido a la membrana.
- **Para obtener mayor concentración:** Realice un solo paso de elución utilizando un 60% del volumen de elución indicado en el protocolo individual. La concentración de ADN será un 30% superior a la obtenida con la elución estándar y se recuperará alrededor del 80% del ADN unido a la membrana.
- **Para obtener rendimiento y concentración elevados:** Utilice la mitad del volumen de elución indicado en el protocolo individual, incube 3 minutos y centrifugue. Repita esta operación con la otra mitad del volumen de elución. Con esta modificación podrá recuperarse entre el 85-100% del ADN unido a la membrana y la concentración de ADN será superior a la obtenida con el método de elución convencional.
- **Elución a 70 °C:** Para algunas muestras particulares es posible incrementar el rendimiento precalentando el buffer de elución (BBE) a 70 °C.

NOTA: Si se utiliza el Buffer BBE de elución a temperatura ambiente el rendimiento será un 20% inferior que si se utiliza precalentado.

El ADN puede eluirse en buffer Tris-EDTA (TE) a $\text{pH} \geq 8$. El buffer TE aumenta la estabilidad del ADN en muestras almacenadas a largo plazo, o en muestras de uso frecuente almacenadas a 4 °C / temperatura ambiente, pues inhibe las ADNasas presentes en la muestra. Sin embargo, la presencia de EDTA (dependiendo de la concentración final) puede interferir en algunas aplicaciones posteriores.

NOTA: El Buffer de elución BBE (Tris/HCl 5 mM, pH 8.5) incluido en el kit no contiene EDTA en su composición.

Para posteriores aplicaciones del ADN purificado y obtención de resultados óptimos se recomienda utilizar el buffer de elución BBE incluido en el kit y almacenar las muestras (especialmente por periodos de tiempo prolongados) a -20°C. Los ciclos frecuentes de congelación/descongelación del ADN no suele afectar a la mayoría de las aplicaciones; una de las excepciones suele ser su uso en reacciones de amplificación de fragmentos largos (>10 kb).

La sensibilidad y/o eficiencia de las aplicaciones pueden verse afectadas por el almacenamiento prolongado del ADN a 4 °C o a temperatura ambiente, así como por múltiples ciclos de congelación/descongelación.

6. INSTRUCCIONES DE USO

A. PROTOCOLO ESTÁNDAR-para tejido humano o animal y para células en cultivo

Antes de comenzar el protocolo:

- Corroborar que el Buffer BB5 y la Proteinase K han sido preparados como se indica en la Sección 4.
- Preparar un incubador o baño de agua a 56 °C y si procede otro a 70 °C.
- Antes de la elución y en caso necesario pre-calentar el Buffer BBE a 70 °C.

PASO	DESCRIPCIÓN		
1	<p>PREPARACIÓN DE LA MUESTRA</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tejido <p>Tome 25 mg de tejido animal o humano. Corte la muestra en pequeñas secciones e introdúzcalas en un tubo de microcentrífuga. Proceda al paso 2.</p> <p><i>Si la lisis de la muestra presenta problemas tritúrela en presencia de nitrógeno líquido o trate la muestra mecánicamente con un homogenizador (Polytron, Ultra Turrax): para homogenizar la muestra añada 50–75 µL de buffer PBS¹ a un tubo de 1.5 mL de centrifuga con 25 mg de tejido.</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Células en cultivo <p>Utilice como máximo un cultivo con 10⁷ células y resuspenda en 200 µL de Buffer BT1. Añada 25 µL Proteinase K y 200 µL de Buffer BB3. Incube a 70 °C durante 10-15 min. Continúe con el paso 4.</p>		<p>PREPARE LA MUESTRA</p>
2	<p>PRE-LISIS</p> <p>Añada 180 µL Buffer BT1 y 25 µL Proteinase K. Mezcle con vortex, asegúrese que la muestra se encuentra embebida completamente en la solución de lisis.</p> <p><i>Si se procesan varias muestras a la vez puede mezclar la solución de Proteinase K y el Buffer BT1 antes de su uso siempre que utilice esta mezcla en un tiempo inferior a 10-15 min: en ausencia de sustrato la Proteinase K en el Buffer BT1 tiende a auto-digerirse.</i></p> <p>Incube a 56 °C hasta conseguir la lisis completa de la muestra (al menos 1–3 h). Mezcle con vortex ocasionalmente durante la incubación o utilice un baño/incubadora con agitación.</p> <p><i>En caso necesario la incubación puede realizarse durante toda la noche. Si se quiere obtener ADN libre de ARN se puede realizar una digestión del ARN: Añada 20 µL de solución de RNase A (10 mg/mL), no incluida en el kit, e incube 5 min a temperatura ambiente.</i></p>		<p>+ 180 µL BUFFER BT1 + 25 µL PROTEINASE K</p> <p>Incube 56 °C 1-3h</p> <p>O bien</p> <p>56 °C O/N Vortex</p>
3	<p>LISIS</p> <p>Mezcle la muestra utilizando vortex. Añada 200 µL Buffer BB3 de lisis y mezcle vigorosamente con vortex (10-20 s) e incube a 70 °C durante 10 min. Vortex brevemente.</p> <p><i>Si se observan partículas insolubles, centrifugue 5 min a alta velocidad (11,000 x g) y transfiera el sobrenadante a un tubo de centrifuga limpio.</i></p>		<p>+ 200 µL BUFFER BB3</p> <p>Vortex e incube 70 °C, 10 min</p>



¹ Buffer PBS estéril: disolver 8 g de NaCl; 0.2 g de KCl; 1.44 g de Na₂HPO₄; 0.24 g de KH₂PO₄ en 800 mL H₂O, ajustar el pH a 7.4 con HCl y añadir H₂O hasta llegar a un volumen de 1 L. Autoclavar el Buffer PBS.

<p>4</p>	<p>ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES PARA LA UNIÓN DEL ADN A LA COLUMNA</p> <p>Añada al lisado 210 µL etanol (96-100%) y mezcle exhaustivamente con vortex.</p> <p><i>Antes de adicionar el etanol dejar reposar el lisado a temperatura ambiente.</i></p> <p><i>El lisado adquirirá un aspecto filamentosos estos precipitados no interfieren en el proceso de purificación. En el siguiente paso asegúrese de cargar todo el lisado, incluido los precipitados, en la columna.</i></p>		<p>+ 210 µL ETANOL</p> <p>Vortex</p>
<p>5</p>	<p>UNIÓN DEL ADN</p> <p>Utilice una columna para cada muestra. Coloque la columna en un Collecting tube de 2 mL y cargue el lisado. Centrifugue 1 min a 11,000 x g. Descarte el filtrado y coloque la columna nuevamente en el Collecting tube.</p> <p><i>Si la muestra no pasa en su totalidad por la columna, repita el paso de centrifugación. Descarte el tubo con el filtrado.</i></p>		<p><i>Cargar lisado en la columna</i></p> <p>1 min, 11,000 x g</p>
<p>6</p>	<p>LAVADOS DE LA MEMBRANA DE SÍLICA</p> <ul style="list-style-type: none"> • Lavado 1 Añada 500 µL Buffer BBW. Centrifugue 1 min a 11,000 x g. Descarte el filtrado y coloque la columna nuevamente en el Collecting tube. • Lavado 2 Añada 600 µL Buffer BB5. Centrifugue 1 min a 11,000 x g. Descarte el filtrado y coloque la columna nuevamente en el Collecting tube. 		<p>+ 500 µL BUFFER BBW</p> <p>1 min, 11,000 x g</p> <p>+ 600 µL BUFFER BB5</p> <p>1 min, 11,000 x g</p>
<p>7</p>	<p>SECADO DE LA MEMBRANA DE SÍLICA</p> <p>Centrifugue la columna 1 min a 11,000 x g.</p> <p><i>En este paso se elimina el etanol residual.</i></p>		<p>1 min, 11,000 x g</p>
<p>8</p>	<p>ELUCIÓN DE ADN PURO</p> <p>Transferir la columna a un microtubo de 1.5 mL y añada 100 µL Buffer BBE directamente en la membrana. Incube 1 min a temperatura ambiente. Centrifugue 1 min a 11,000 x g.</p> <p><i>Para protocolos de elución alternativos véase Sección 5.</i></p>		<p>+ 100 µL BUFFER BBE</p> <p>Incube TA 1 min</p> <p>1 min, 11,000 x g</p>

B. Protocolo para extracción de ADN genómico de colas de rata o ratón

Antes de comenzar el protocolo:



- Corroborar que el Buffer BB5 y la Proteinase K han sido preparados como se indica en la Sección 4.
- Preparar un incubador o baño de agua a 56 °C.
- Antes de la elución y en caso necesario pre-calentar el Buffer BBE a 70 °C.

PASO	DESCRIPCIÓN		
1	<p>PREPARACIÓN DE LA MUESTRA</p> <p>Corte dos secciones de 0.6 cm de la cola del ratón o una sección de 0.6 cm de cola de rata e introdúzcalos en un tubo de 1.5 mL.</p>		2 SECCIONES (2x 0.6 cm)
	<p>PRE-LISIS</p> <p>Añada 180 µL Buffer BT1 y 25 µL Proteinase K. Vortex la muestra e incube a 56 °C durante toda la noche o hasta que la lisis sea completa.</p> <p><i>El tiempo de lisis puede ser reducido considerablemente (hasta 1 h de incubación) incorporando un paso de digestión mecánica del tejido previo a la lisis.</i></p> <p>Mezcle con vortex ocasionalmente durante el periodo de incubación o utilice un baño/incubadora con agitación. Para eliminar restos de hueso o de pelo, centrifugue 5 min a 11,000 x g. Transfiera 200 µL del sobrenadante a un tubo nuevo.</p> <p><i>Si se procesan varias muestras a la vez puede mezclar la solución de Proteinase K y el Buffer BT1 antes de su uso siempre que utilice esta mezcla en un tiempo inferior a 10-15 min: en ausencia de sustrato la Proteinase K en el Buffer BT1 tiende a auto-digerirse.</i></p>		<p>+ 180 µL BUFFER BT1 + 25 µL PROTEINASE K</p> <p>Incube 56 °C, overnight Vortex</p> <p>Transfiera 200 µL</p>
3	<p>LISIS</p> <p>Añada al lisado 200 µL Buffer BB3. Mezcle exhaustivamente con vortex.</p> <p><i>El Buffer BB3 y el etanol (ver Paso 4) pueden ser premezclados antes de añadir al lisado.</i></p>		<p>+ 200 µL BUFFER BB3 Vortex</p>
4	<p>ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES PARA LA UNIÓN DEL ADN A LA COLUMNA</p> <p>Añada al lisado 210 µL etanol (96-100%) y mezcle exhaustivamente con vortex.</p>		<p>+ 210 µL ETANOL</p> <p>Vortex</p>
5	Continuar a partir del Paso 5 del Protocolo Estándar.		

C. Protocolo para la purificación de ADN genómico de cultivos bacterianos

Antes de comenzar el protocolo:



- Corroborar que el Buffer BB5 y la Proteinase K han sido preparados como se indica en la Sección 4.
- Preparar incubadores o baños de agua a 56 °C y a 70 °C.
- Antes de la elución y en caso necesario pre-calentar el Buffer BBE a 70 °C.

PASO	DESCRIPCIÓN		
1	<p>PREPARACIÓN DE LA MUESTRA</p> <p>Utilizar un volumen máximo de 1 mL de cultivo bacteriano. Centrifugue 5 min a 8,000 x g y elimine el sobrenadante.</p> <p><i>El volumen de cultivo dependerá de diferentes factores como la cepa de bacteriana inoculada, de la densidad del cultivo, o del medio de cultivo utilizado.</i></p>		<p>CULTIVO BACTERIANO (1 mL máximo)</p> <p>5 min, 8,000 x g</p>
2	<p>PRE-LISIS</p> <p>Resuspenda el pellet en 180 µL Buffer BT1 con la ayuda de una pipeta.</p> <p>Añada 25 µL de Proteinase K. Mezcle exhaustivamente con vortex e incube a 56 °C hasta conseguir la lisis completa de la muestra (al menos 1–3 h). Mezcle con vortex ocasionalmente durante la incubación o utilice un baño/incubadora con agitación. <i>En caso necesario la incubación puede realizarse durante toda la noche.</i></p> <p><i>Sí se quiere obtener ADN libre de ARN realice una digestión del ARN: Añada 20 µL de solución de RNase A (10 mg/mL), no incluida en el kit, e incube 5 min a temperatura ambiente.</i></p> <p><i>Para cepas de bacterias difíciles de lisar (ej. bacterias Gram positivas) sustituya la lisis con Buffer BT1 por una lisis enzimática con lisozima o lisostafina. Resuspenda el pellet de bacterias en Buffer Tris-HCl 20 mM; EDTA 2 mM; Tritón X-100; pH 8 suplementado con lisozima 20 mg/mL o lisostafina 0.2 mg/mL e incube a 37 °C r durante 30-60 min. Añada 25 uL de Proteinase K e incube a 56 °C hasta conseguir la lisis completa de la muestra.</i></p>		<p>PELLET + 180 µL BUFFER BT1 + 25 µL PROTEINASE K</p> <p>Vortex Incube 56 °C, 1-3 h/overnight</p>
3	Continuar a partir del Paso 3 del Protocolo Estándar.		

D. Protocolo para purificación de ADN genómico de levaduras

Antes de comenzar el protocolo:

- Corroborar que el Buffer BB5 y la Proteinase K han sido preparados como se indica en la Sección 4.
- Preparar EDTA 10 mM pH 8.0.
- Preparar el buffer sorbitol y la enzima lyticasa o zimolasa (no proporcionadas con el kit) para la fase de pre-lisis de la muestra.
- Preparar incubadores o baños de agua a 30 °C; a 56 °C y a 70 °C.
- Antes de la elución y en caso necesario pre-calentar el Buffer BBE a 70 °C.

PASO	DESCRIPCIÓN		
1	<p>PREPARACIÓN DE LA MUESTRA</p> <p>Recoja las células correspondientes a 3 mL de medio de cultivo de levaduras ($OD_{600} \leq 10$), centrifugue 10 min a 5,000 x g. Lave el pellet celular con 1 mL de EDTA 10 mM, pH 8 y centrifugue nuevamente 10 min a 5,000 x g para recoger las células.</p>		<p><i>CULTIVO EN YPD</i> ($OD_{600} < 10$)</p> <p>10 min, 5,000 x g</p> <p>Lave las células con EDTA 10 mM, pH 8</p>
2	<p>PRE-LISIS</p> <p>Resuspenda el pellet en 600 µL de buffer sorbitol². Añada 50 U lyticasa o zimolasa³. Incube a 30 °C durante 30 min. Este paso tiene por objeto romper la pared celular del hongo y crear esferoplastos (visibles al microscopio). Centrifugue la mezcla a 2,000 x g durante 10 min, descarte el sobrenadante y resuspenda el pellet que contiene los esferoplastos en 180 µL de Buffer BT1.</p> <p>Añada 25 µL Proteinase K y mezcle exhaustivamente con vortex. Incube a 56 °C hasta conseguir una lisis completa (1-3 h). Mezcle con vortex ocasionalmente durante el periodo de incubación o use un baño/incubadora con agitación. <i>En caso necesario la incubación puede realizarse durante toda la noche.</i></p> <p><i>Si se quiere obtener ADN libre de ARN realice una digestión del ARN: Añada 20 µL de solución de RNase A (20 mg/mL), no incluida en el kit, e incube 5 min a temperatura ambiente.</i></p>		<p><i>PELLET</i> 600 µL buffer sorbitol + 50 U lyticasa/zimolasa Incube a 30 °C, 30 min</p> <p>10 min, 2,000 x g + 180 µL BUFFER BT1 + 25 µL PROTEINASE K</p> <p>Incube 56 °C, 1-3 h/overnight Vortex</p>
3	Continuar a partir del Paso 3 del Protocolo Estándar.		

² Buffer sorbitol: sorbitol 1.2 M; CaCl₂ 10 mM; Tris-HCl 0.1 M, pH 7.5; β-Mercaptoetanol 35 mM


³ Dependiendo de la calidad de las enzimas se utilizará 5-200 U de lyticasa o de zimolasa

E. Protocolo para extracción de ADN genómico de manchas de sangre seca

Este protocolo está recomendado para Guthrie cards o tarjetas similares (ej. NucleoCards, FTA® cards, Guthrie cards, entre otras).

Antes de comenzar el protocolo:




- Corroborar que el Buffer BB5 y la Proteinase K han sido preparados como se indica en la Sección 4.
- Preparar incubadores o baños de agua a 94 °C y a 56 °C.
- Antes de la elución y en caso necesario pre-calentar el Buffer BBE a 70 °C.

PASO	DESCRIPCIÓN		
1	<p>PREPARACIÓN DE LA MUESTRA</p> <p>Corte una o dos gotas de sangre seca intentando que el corte sea lo más preciso posible (15-30 mm² de área). Corte el material en pequeñas porciones y coloque en un tubo de 1.5 mL.</p>		MUESTRA
2	<p>PRE-LISIS</p> <p>Añada 180 µL Buffer BT1 y mezcle con vortex. Incube en un baño o bloque calentador 10 min a 94 °C.</p> <p>Deje enfriar la muestra y añada 25 µL Proteinase K. Mezque con vortex e incube 1 h a 56 °C; durante la incubación mezcle ocasionalmente con vortex o utilice un baño/incubadora con agitación.</p> <p><i>Asegúrese que la muestra se encuentra embebida completamente en la solución de lisis</i></p>		<p>+ 180 µL BUFFER BT1 Incube 94 °C, 10 min</p> <p>Enfriar + 25 µL PROTEINASE K Incube 56 °C, 1 h Vortex</p>
3	<p>LISIS</p> <p>Añada 200 µL Buffer BB3, mezcle exhaustivamente con vortex. Incube 10 min a 56 °C.</p>		<p>200 µL BUFFER BB3 Vortex Incube 56 °C 10 min</p>
4	Continuar a partir del Paso 4 del Protocolo Estándar.		

F. Protocolo para extracción de ADN genómico y viral a partir de muestras de sangre

Antes de comenzar el protocolo:


- Corroborar que el Buffer BB5 y la Proteinase K han sido preparados como se indica en la Sección 4.
- Preparar un incubador o baño de agua a 70 °C.
- Antes de la elución y en caso necesario pre-calentar el Buffer BBE a 70 °C.

PASO	DESCRIPCIÓN		
1-2	<p>PREPARACIÓN DE LA MUESTRA y PRE-LISIS</p> <p>Para este protocolo no se requiere ni la preparación previa de la muestra ni el paso de pre-lisis.</p>		No necesarios
3	<p>LISIS</p> <p>Añada en un tubo de 1.5 mL 25 µL de Proteinase K y hasta 200 µL de sangre, buffy coat, o muestra de fluidos biológicos (equilibrados a temperatura ambiente).</p> <p><i>Para muestras de <200 µL agregue PBS para ajustar el volumen a 200 µL.</i></p> <p><i>Para purificar ADN viral comenzar con 200 µL de suero o plasma. Para extraer ADN de células en cultivo resuspender hasta 5×10^6 células en 200 µL de PBS.</i></p> <p><i>Si la muestra de sangre a procesar presenta coágulos o no es una muestra fresca incrementar el tiempo de incubación con Proteinase K hasta 30 min.</i></p> <p>Añada 200 µL Buffer BB3, mezcle exhaustivamente con vortex. Incube 5 min a temperatura ambiente. Mezcle con vortex e incube 10-15 min a 70 °C.</p> <p><i>Durante la incubación con el Buffer BB3 el lisado debe de tomar un color amarronado.</i></p>		<p>25 µL PROTEINASE K + Muestra + 200 µL</p> <p>BUFFER BB3</p> <p>Incube a temp ambiente, 5 min</p> <p>Incube 70 °C, 10-15 min</p>
4	<p>ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES PARA LA UNIÓN DEL ADN A LA COLUMNA</p> <p>Añada al lisado 210 µL etanol (96-100%) y mezcle exhaustivamente con vortex.</p>		<p>+ 210 µL ETANOL</p> <p>Vortex</p>
5	<p>UNIÓN DEL ADN</p> <p>Utilice una columna para cada muestra. Coloque la columna en un Collecting tube de 2 mL y cargue el lisado. Centrifugue 1 min a 11,000 × g. Descarte el filtrado y coloque la columna nuevamente en el Collecting tube.</p> <p><i>Si la muestra no pasa en su totalidad por la columna, repita el paso de centrifugación a mayor velocidad (<math>15,000 \times g</math>). Descarte el tubo con el filtrado.</i></p>		<p>Cargar lisado en la columna</p> <p>1 min, 11,000 × g</p>
6	Continuar a partir del Paso 6 del Protocolo Estándar.		

G. Protocolo para la purificación de ADN genómico de raíces de pelo

Antes de comenzar el protocolo:





- Corroborar que el Buffer BB5 y la Proteinase K han sido preparados como se indica en la Sección 4.
- Preparar un incubador o baño de agua a 56 °C y otro a 70 °C.
- Antes de la elución y en caso necesario pre-calentar el Buffer BBE a 70 °C.

PASO	DESCRIPCIÓN		
1	PREPARACIÓN DE LA MUESTRA <i>Corte las raíces de muestras de pelo (hasta 100 pelos) e introdúzcalas en un tubo de 1.5 mL.</i>		RAÍZ DE PELO
2	PRE-LISIS <i>Añada 180 µL Buffer BT1 y congele la muestra en nitrógeno líquido. Descongele la muestra en un baño a 56 °C. Repita el proceso de congelación/descongelación 4 veces.</i> <i>Añada 25 µL Proteinase K. Mezcle con vortex e incube a 56 °C durante 6-8 horas o durante toda la noche. Mezcle ocasionalmente con vortex durante el periodo de incubación o utilice un baño /incubadora con agitación.</i>		180 µL BUFFER BT1 5 ciclos de cong./descong. en nitrógeno líquido + 25 µL PROTEINASE K Incube 56 °C, 6-8 h/overnight Vortex
3	<i>Continuar a partir del Paso 3 del Protocolo Estándar.</i>		

H. Protocolo para extracción de ADN genómico de tejidos embebidos en parafina

Antes de comenzar el protocolo:


- Corroborar que el Buffer BB5 y la Proteinase K han sido preparados como se indica en la Sección 4.
- Corroborar la disponibilidad de n-octano o xileno
- Preparar incubadores o baños de agua a 37 °C, a 56 °C y a 70 °C.
- Antes de la elución y en caso necesario pre-calentar el Buffer BBE a 70 °C.

PASO	DESCRIPCIÓN		
1	PREPARACIÓN DE LA MUESTRA <i>Corte los bloques de tejido embebido y fijado en pequeñas secciones (\leq 25 mg) e introduzca en un tubo de centrifuga de 1.5 mL. Quite el exceso de parafina antes de cortar la muestra. Maneje la muestra con pinzas o palillos.</i> <i>Añada 1 mL de n-octano o xileno en cada tubo de muestra. Mezcle exhaustivamente con vortex e durante 30 min a temperatura ambiente. Mezcle ocasionalmente con vortex durante el periodo de incubación.</i> <i>Centrifugue 3 min a 11,000 x g. Descarte el sobrenadante utilizando una pipeta.</i> <i>Añada 1 mL etanol (96%-100%) a cada tubo. Cierre los tubos y mezcle repetidamente por inversión. Centrifugue 3 min a 11,000 x g. Descarte el sobrenadante utilizando una pipeta. Repita la fase de lavado con etanol. Deseche el máximo posible de etanol.</i> <i>Incube el tubo con la tapa abierta a 37 °C hasta que el etanol se evapore (aproximadamente 15 min).</i>	   	TEJIDO SECCIONADO + 1 mL n-OCTANO Vortex Incube TA, 30 min 3 min, 11,000 x g + 1 mL ETANOL 3 min, 11,000 x g + 1 mL ETANOL 3 min, 11,000 x g Incube el tubo abierto a 37 °C
2	<i>Continuar a partir del Paso 2 del Protocolo Estándar.</i>		

I. Protocolo para la purificación de ADN genómico de *Mycobacterium tuberculosis* o *Legionella pneumophila* a partir de esputos o lavados broncoalveolares

Antes de comenzar el protocolo:

- Corroborar que el Buffer BB5 y la Proteinase K han sido preparados como se indica en la Sección 4.
- Preparar N-acetyl cysteina/NaOH⁴.
- Preparar incubadores o baños de agua a 56 °C y a 70 °C.
- Corroborar si dispone del volumen necesario de Buffer BT1.

PASO	DESCRIPCIÓN		
1	<p>PREPARACIÓN DE LA MUESTRA</p> <p>En un tubo de centrifuga de 1.5 mL añada 200-500 µL de esputo o lavado broncoalveolar, adicione el mismo volumen de N-acetil cisteína/NaOH⁴. Mezcle suavemente con vortex e incube la mezcla durante 25 min a temperatura ambiente con agitación.</p> <p>Ajuste el volumen final a 25 mL con agua estéril. Centrifugue 30 min a 4,000 x g. Descarte el sobrenadante.</p> <p>Resuspenda el pellet en 0.5-1 mL Buffer BT1 dependiendo de la viscosidad de la muestra. Transfiera 200 µL de la muestra resuspendida a un nuevo tubo de centrifuga de 1.5 mL.</p> <p><i>Si procesa más de 20 muestras requerirá una unidad adicional del Buffer BT1 (BIOTOOLS Ref. 21.161).</i></p>		<p><i>ESPUTO 200-500 µL + 1 vol N-acetil cisteína/NaOH</i></p> <p><i>Vortex Incube TA 25 min Ajuste vol a 25 mL con H₂O estéril 30 min, 4,000 x g Resuspenda en 0.5-1 mL BUFFER BT1 Transfiera 200 µL</i></p>
2	Continuar a partir del Paso 2 del Protocolo Estándar.		


⁴ N-acetil cisteína/NaOH: NaOH 2 g; citrato sódico 1.45 g; N-acetil cisteína 0.5 g; agua bidestilada estéril hasta un volumen de 100 mL.

J. Protocolo para extracción de ADN genómico de heces

Para este protocolo si procesa numerosas muestras y utiliza el máximo volumen recomendado de Buffer BT1 requerirá unidades adicionales del Buffer BT1 (BIOTOOLS Ref. 21.161).

Antes de comenzar el protocolo:

- Corroborar que el Buffer BB5 y la Proteinase K han sido preparados como se indica en la Sección 4.
- Corroborar la disponibilidad de suficiente Buffer BT1 y Buffer TE⁵.
- Preparar incubadores o baños de agua a 56 °C y a 70 °C.
- Antes de la elución y en caso necesario pre-calentar el Buffer BBE a 70 °C.

PASO	DESCRIPCIÓN		
1	<p>PREPARACIÓN DE LA MUESTRA</p> <p>Añada 250 mg de heces a 1 mL de buffer TE. Mezcle exhaustivamente con vortex (30 seg) para resuspender la muestra.</p> <p>Centrifugue 15 min a 4,000 x g. Descarte el sobrenadante.</p> <p>Resuspenda el pellet en 0.2-1 mL Buffer BT1. Utilice el volumen de buffer BT1 necesario para resuspender completamente la muestra.</p> <p>El precipitado obtenido contiene células del tracto digestivo y bacterias, entre otros componentes.</p> <p>Transfiera 200 µL de la muestra resuspendida a un tubo de centrifuga de 1.5 mL nuevo.</p>		<p>250 mg MUESTRA + 1 mL buffer TE</p> <p>Vortex</p> <p>15 min, 4,000 x g</p> <p>Resuspender 0.2-1 mL BUFFER BT1</p> <p>Transferir 200 µL</p>
2	<p>Añada 25 µL Proteinase K. Mezcle con vortex e incube a 56 °C durante al menos 1-3 horas o durante toda la noche. Mezcle ocasionalmente con vortex durante el periodo de incubación o utilice un baño /incubadora con agitación.</p> <p><i>Las células humanas, de bacterias o de patógenos presentes en muestras de heces se lisan con diferente eficiencia en presencia de Proteinase K. Para la detección de células difíciles de lisar (ej. ciertas bacterias o parásitos) es conveniente realizar una incubación adicional a mayor temperatura (5-10 min a ≤ 95 °C). La incubación adicional a mayor temperatura incrementa el rendimiento de la extracción aunque el ratio convencional de ADN humano/ADN no humano suele cambiar debido a la mayor liberación de ADN bacteriano/patógeno.</i></p>		<p>25 µL PROTEINASE K + Muestra</p> <p>Vortex</p> <p>1-3 h a 56 °C</p>
2	Continuar a partir del Paso 2 del Protocolo Estándar.		



⁵ Buffer TE: Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM, pH 8.

K. Protocolo para extracción de ADN viral a partir de muestras de heces

Antes de comenzar el protocolo:

- Corroborar que el Buffer BB5 y la Proteinase K han sido preparados como se indica en la Sección 4.
- Preparar NaCl 0.9 %.
- Preparar un incubador o baño de agua a 70 °C.
- Antes de la elución y en caso necesario pre-calentar el Buffer BBE a 70 °C.

PASO	DESCRIPCIÓN		
1	<p>PREPARACIÓN DE LA MUESTRA</p> <p>Resuspenda 0.5 g de heces en 4 mL de NaCl 0.9 %. Mezcle con vortex para resuspender la muestra.</p> <p>Divida la muestra anterior en alícuotas de 1 mL y centrifugue cada una de las alícuotas 5 min a 800 x g a temperatura ambiente. Tomar y unir los sobrenadantes de las diferentes alícuotas (sin tocar el pellet).</p> <p>Filtre el sobrenadante utilizando filtros estériles de 0.22-0.45 µm. Fraccione el filtrado y centrifugue las alícuotas 1 min a 11,000 x g.</p>		<p>0.5 g muestra + 4 mL NaCl 0.9 %</p> <p>Vortex</p> <p>5 min, 800 x g</p> <p>Filtrar sobrenadante</p> <p>1 min, 11,000 x g</p>
2	<p>PRE-LISIS</p> <p>Remueva cuidadosamente el sobrenadante por decantación. Añada al pellet 400 µL Buffer BT1 y 35 µL Proteinase K. Mezcle con vortex.</p>		<p>400 µL BUFFER BT1 + 35 µL PROTEINASE K</p> <p>Vortex</p>
3	<p>LISIS</p> <p>Añada 400 µL Buffer BB3 y mezcle exhaustivamente con vortex. Incube al menos 30 min a 70 °C.</p>		<p>+ 400 µL BUFFER BB3</p> <p>Vortex</p> <p>70 °C, ≥ 30 min</p>
4	<p>ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES PARA LA UNIÓN DEL ADN A LA COLUMNA</p> <p>Añada al lisado 420 µL etanol (96-100%) y mezcle exhaustivamente con vortex.</p>		<p>+ 420 µL ETANOL</p> <p>Vortex</p>
5	<p>UNIÓN DEL ADN</p> <p>Utilice una columna para cada muestra. Coloque la columna en un Collecting tube de 2 mL y cargue el lisado. Centrifugue 1 min a 4,500 x g. Descarte el filtrado y coloque la columna nuevamente en el Collecting tube.</p> <p><i>Si la muestra no pasa en su totalidad por la columna, repita el paso de centrifugación a 11,000 x g). Descarte el tubo con el filtrado.</i></p>		<p>Cargar lisado en la columna</p> <p>1 min, 4,500 x g</p>
	<p>LAVADOS DE LA MEMBRANA DE SÍLICA</p> <ul style="list-style-type: none"> • Lavado 1 Añada 600 µL Buffer BBW. Centrifugue 1 min a 4,500 x g. Descarte el filtrado y coloque la columna nuevamente en el Collecting tube. • Lavado 2 Añada 600 µL Buffer BB5. Centrifugue 1 min a 4,500 x g. Descarte el filtrado y coloque la columna nuevamente en el Collecting tube. • Lavado 3 Añada 600 µL Buffer BB5. Centrifugue 2 min a 4,500 x g. Descarte el filtrado y coloque la columna en un Collecting tube nuevo. 		<p>+ 600 µL BUFFER BBW</p> <p>1 min, 4,500 x g</p> <p>+ 600 µL BUFFER BB5</p> <p>1 min, 4,500 x g</p> <p>+ 600 µL BUFFER BB5</p> <p>2 min, 11,000 x g</p>




7	<p>SECADO DE LA MEMBRANA DE SÍLICA</p> <p>Incube la columna con la tapa abierta durante 1-2 min a 70 °C.</p> <p><i>En este paso se elimina el etanol residual.</i></p>		1-2 min 70 °C,
8	<p>ELUCIÓN DE ADN PURO</p> <p>Transfiera la columna a un microtubo de 1.5 mL y añada 100 µL Buffer BBE e incube con la tapa cerrada durante 3-5 min. Centrifugue 1 min a 4,500 x g.</p> <p><i>Para protocolos de elución alternativos véase Sección 5.</i></p>		+ 100 µL BUFFER BBE Incube 3-5 min 1 min, 4,500 x g

L. Protocolo para la purificación de ADN de cepas de *E. Coli* productoras de verotoxinas (EHEC) en muestras de comida

La principal fuente de infección con verotoxinas en humanos es a través de alimentos contaminados (leche cruda o carne poco cocinada). Este protocolo utiliza como materia de partida leche.

Antes de comenzar el protocolo:

- Corroborar que el Buffer BB5 y la Proteinase K han sido preparados como se indica en la Sección 4.
- Preparar medio TSB⁶ y acetato de sodio 3.2 M.
- Corroborar disponibilidad de Novobiocina.
- Preparar incubadores o baños de agua a 37 °C, a 56 °C y a 70 °C.
- Antes de la elución y en caso necesario pre-calentar el Buffer BBE a 70 °C.


PASO	DESCRIPCIÓN		
1	<p>PREPARACIÓN DE LA MUESTRA</p> <p>En un frasco de 1 Litro estéril añada 25 mL de leche y 225 mL de medio mTSB (suplementado con Novobiocin) previamente calentado a 37 °C. Incube en un baño/incubadora con agitación durante 5-6 horas o toda la noche a 37 °C.</p> <p>Centrifugue 100 mL del cultivo durante 40 min a 6,000 x g.</p> <p>Descarte el sobrenadante y suspenda las células en 2 mL de agua estéril. Centrifugue nuevamente durante 10 min a 10,000 x g y descarte el sobrenadante.</p>		25 mL MUESTRA + 225 mL mTSB estéril Incube a 37 °C con agitación, 5-6 h/overnight 100 mL cultivo 40 min, 6,000 x g Resuspender céls en 2 mL H ₂ O estéril 10 min, 10,000 x g
2	<p>PRE-LISIS</p> <p>Resuspenda el pellet en 180 µL Buffer BT1 y añada 25 µL Proteinase K.</p>		+ 180 µL BUFFER BT1 + 25 µL PROTEINASE
3-8	<p>Continuar a partir del Paso 3 del Protocolo Estándar.</p> <p>Realice dos pasos de elución del ADN con el volumen indicado en el Protocolo Estándar.</p>		200 µL ELUIDO
9	<p>PRECIPITACIÓN DEL ADN</p> <p>Finalizado el paso de elución del ADN continúe con este paso.</p> <p>Precipite el ADN eluido (200 µL) añadiendo 20 µL de acetato de sodio 3.2 M y 400 µL etanol absoluto.</p> <p>Centrifugue 30 min a 11,000 x g. Descarte el sobrenadante y lave el pellet con 1 mL etanol 70-80 % y resuspenda el pellet en 10 µL de agua estéril.</p>		+ 20 µL ACETATO SÓDICO + 400 µL ETANOL 30 min, 11,000 x g Lavar pellet 1 mL ETANOL 70% Resuspender 10 µL H ₂ O estéril

⁶ Medio mTSB: 30 g Caldo triptona de Soya (Gibco); 1.5 g sales biliares # 3 (Oxoid); 1.5 g KH₂PO₄. Añada 900 mL de H₂O. Filtre el medio y ajuste el pH a 7.4 con NaOH 2 M. Enrase a un litro con H₂O y autoclave el medio 15 min a 121°C.

M. Protocolo para la purificación de ADN genómico de origen bacteriano (ej. *Borrelia burgdorferi*) a partir de muestras de orina

Antes de comenzar el protocolo:

- Corroborar que el Buffer BB5 y la Proteinase K han sido preparados como se indica en la Sección 4.
- Preparar incubadores o baños de agua a 56 °C y a 70 °C.
- Antes de la elución y en caso necesario pre-calentar el Buffer BBE a 70 °C.

PASO	DESCRIPCIÓN		
1	<p>PREPARACIÓN DE LA MUESTRA</p> <p>Centrifugue 1 mL de orina durante 30 min a 13,000 x g. Descarte el sobrenadante, añada 1 mL de orina y centrifugue nuevamente durante 30 min a 13, 000 x g. Este paso puede ser repetido hasta 3 veces. Descarte el sobrenadante.</p> <p><i>La muestra de orina a utilizar debe de ser fresca. La muestra puede ser conservada por un par de días entre -20 y -80 °C. Una vez descongelada la orina se incuba a 40 °C hasta que todos los precipitados se disuelvan (las muestras de orina tienden a precipitar a bajas temperaturas de almacenamiento). Si no consigue disolver completamente el sedimento, centrifugue para precipitar el sedimento y continúe el protocolo sólo con el sobrenadante de la muestra.</i></p>		<p>1 mL ORINA 30 min, 13,000 x g</p> <p>+</p> <p>1 mL ORINA 30 min, 13,000 x g</p> <p>+</p> <p>1 mL ORINA 30 min, 13,000 x g</p>
2	Continuar a partir del Paso 2 del Protocolo Estándar.		

N. Protocolo para la purificación de ADN viral (ej. CMV) de muestras de orina

Antes de comenzar el protocolo:



- Corroborar que el Buffer BB5 y la Proteinase K han sido preparados como se indica en la Sección 4.
- Preparar un incubador o baño de agua a 70 °C.
- Antes de la elución y en caso necesario pre-calentar el Buffer BBE a 70 °C.

PASO	DESCRIPCIÓN		
1	<p>PREPARACIÓN DE LA MUESTRA</p> <p>Centrifugue 3 ó 4 alícuotas de 1 mL de orina durante 10 min a 13,000 x g. Descarte el sobrenadante de todas las alícuotas.</p> <p><i>La muestra de orina a utilizar debe de ser fresca. La muestra puede ser conservada por un par de días entre -20 y -80 °C. Una vez descongelada la orina se incuba a 40 °C hasta que todos los precipitados se disuelvan (las muestras de orina tienden a precipitar a bajas temperaturas de almacenamiento). Si no consigue disolver completamente el sedimento, centrifugue para precipitar el sedimento y continúe el protocolo sólo con el sobrenadante de la muestra.</i></p>		<p>MUESTRA dividir en alícuotas 1 mL</p> <p>10 min, 13,000 x g</p>
2	<p>PRE-LISIS</p> <p>Resuspenda sólo un pellet en 180 µL Buffer BT1 y 25 µL Proteinase K. Transfiera el material resuspendido al tubo del siguiente pellet y repita el proceso con los demás precipitados de la misma muestra.</p>		<p>+ 180 µL BUFFER BT1</p> <p>+ 25 µL PROTEINASE K</p>
3	<p>LISIS</p> <p>Añada 200 µL Buffer BB3. Mezcle con vortex e incube la muestra un tiempo mínimo de 20 min a 70°C.</p>		<p>200 µL BUFFER BB3</p> <p>Vortex e Incube 70°C, 20 min</p>
4	<p>ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES PARA LA UNIÓN DEL ADN A LA COLUMNA</p> <p>Añada 210 µL etanol (96-100%) al lisado y mezcle exhaustivamente con vortex.</p>		<p>+ 210 µL ETANOL</p> <p>Vortex</p>
5	<p>UNIÓN DEL ADN</p> <p>Coloque la columna en un Collecting tube de 2 mL y cargue el lisado (<i>utilice una columna por muestra</i>). Centrifugue 1 min a 4,500 x g. Descarte el filtrado y coloque la columna en el Collecting tube.</p>		<p>Cargar lisado en la columna</p> <p>1 min, 4,500 x g</p>
6	<p>LAVADOS DE LA MEMBRANA DE SÍLICA</p> <ul style="list-style-type: none"> • Lavado 1 <p>Añada 500 µL Buffer BBW. Centrifugue 1 min a 4,500 x g. Descarte el filtrado y coloque la columna en el Collecting tube.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Lavado 2 <p>Añada 600 µL Buffer BB5. Centrifugue 2 min a 11,000 x g. Descarte el filtrado y coloque la columna en el Collecting tube.</p>		<p>+ 500 µL BUFFER BBW</p> <p>1 min, 4,500 x g</p> <p>+ 600 µL BUFFER BB5</p> <p>2 min, 11,00 x g</p>
7	<p>SECADO DE LA MEMBRANA DE SÍLICA</p> <p>Coloque la columna en un microtubo de 1.5 mL. Incube la columna con la tapa abierta durante 1-2 min a 70 °C.</p> <p><i>En este paso se elimina el etanol residual.</i></p>		<p>Incube los tubos abiertos 70 °C, 1-2 min</p>
8	<p>ELUCIÓN DE ADN PURO</p> <p>Añada 70 µL de Buffer BBE directamente en la membrana. Cierre la tapa e incube 3-5 min. Centrifugue 1 min a 4,500 x g.</p>		<p>+ 70 µL BUFFER BBE</p> <p>Incube 3-5 min</p> <p>1 min, 4,500 x g</p>

O. Protocolo para la purificación de ADN bacteriano (ej. *Chlamydia trachomatis*) a partir de muestras de cultivo, de fluidos biológicos o de muestras clínicas

Antes de comenzar el protocolo:

- Corroborar que el Buffer BB5 y la Proteinase K han sido preparados como se indica en la Sección 4.
- Preparar incubadores o baños de agua a 56 °C y a 70 °C.
- Antes de la elución y en caso necesario pre-calentar el Buffer BBE a 70 °C.

PASO	DESCRIPCIÓN		
1	<p>PREPARACIÓN DE LA MUESTRA</p> <p>Para la purificación de ADN bacteriano a partir de cultivos de bacterias o fluidos biológicos: Centrifugue la muestra 5 min a 13,000 x g y continúe a partir del paso 2 del Protocolo Estándar.</p> <p>Para la purificación de ADN bacteriano a partir de swabs embebidas en muestras nasales, oculares o faríngeas: Incube la muestra con 2 mL de PBS que contenga fungicida durante varias horas a temperatura ambiente. Centrifugue la muestra 5 min a 13,000 x g, descarte el sobrenadante.</p>	 	<p>5 min, 13,000 x g</p> <p>O bien</p> <p>Incube muestra con PBS 5 min a TA</p> <p>5 min, 13,000 x g</p>
2	Continuar a partir del Paso 2 del Protocolo Estándar.		

P. Protocolo para la purificación de ADN genómico de insectos

Antes de comenzar el protocolo:


- Corroborar que el Buffer BB5 y la Proteinase K han sido preparados como se indica en la Sección 4.
- Preparar incubadores o baños de agua a 56 °C y a 70 °C.
- Antes de la elución y en caso necesario pre-calentar el Buffer BBE a 70 °C.

PASO	DESCRIPCIÓN		
1	<p>PREPARACIÓN DE LA MUESTRA</p> <p>Homogenice ≤ 50 mg de insectos utilizando nitrógeno líquido y transfiera el residuo obtenido en un tubo de centrifuga de 1.5 mL.</p>		<p>MUESTRA (< 50 mg)</p> <p>Homogeneizar con nitrógeno líquido</p>
2	Continuar a partir del Paso 2 del Protocolo Estándar.		

Q. Protocolo para la purificación de ADN genómico de torundas/bastoncitos con muestras dentales (*dental swabs*)

Antes de comenzar el protocolo:


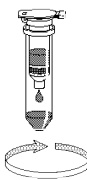
- Corroborar que el Buffer BB5 y la Proteinase K han sido preparados como se indica en la Sección 4.
- Preparar incubadores o baños de agua a 70 °C; 95 °C y 56 °C.
- Antes de la elución y en caso necesario pre-calentar el Buffer BBE a 70 °C.

PASO	DESCRIPCIÓN		
1	<p>PREPARACIÓN DE LA MUESTRA</p> <p>Coloque el material con la muestra (papel, algodón, bastoncitos, cepillo, etc.) en un tubo de centrifuga de 1.5 mL.</p>		MUESTRA
2	<p>PRE-LISIS</p> <p>Añada a cada muestra 180 µL Buffer BT1 y 25 µL Proteinase K. Cierre el tubo y centrifugue durante 15 seg a 1,500 x g para sumergir completamente la muestra en la solución de pre-lisis.</p> <p>Incube 5 min a temperatura ambiente. Mezcle exhaustivamente con vortex durante 15 seg y centrifugue 15 seg a 1,500 x g.</p> <p>Incube las muestras 10 min a 70 °C. Para prevenir la apertura de los tubos coloque peso encima de la tapa de los tubos.</p> <p>Incube 5 min a 95 °C. Centrifugue 15 seg a 1,500 x g para recoger restos que estuvieran en las paredes y tapa del tubo.</p> <p><i>La incubación a 95 °C no es obligatoria; depende de la cepa bacteriana que se pretende purificar.</i></p>		<p>180 µL BUFFER BT1 + 25 µL PROTEINASE K</p> <p>Spin Incube 5 min a TA vortex y spin</p> <p>Incube 10 min, 70 °C</p> <p>Incube 5 min, 95 °C</p> <p>Spin</p>
3	<p>LISIS</p> <p>Transferir el mayor volumen posible de lisado a un microtubo de 1.5 mL. Desechar la torunda/bastoncito y continuar con el lisado recuperado.</p>		
3	Continuar a partir del Paso 3 del Protocolo Estándar.		

R. Protocolo para la purificación de ADN genómico de torundas/bastoncitos con muestras bucales (*buccal swabs*)

Antes de comenzar el protocolo:

- Corroborar que el Buffer BB5 y la Proteinase K han sido preparados como se indica en la Sección 4.
- Corroborar disponibilidad de Buffer PBS.
- Preparar incubadores o baños de agua a 56 °C y a 70 °C.
- Antes de la elución y en caso necesario pre-calentar el Buffer BBE a 70 °C.

PASO	DESCRIPCIÓN		
1	<p>PREPARACIÓN DE LA MUESTRA</p> <p>Con la ayuda de un bastoncito o torunda raspe varias veces la cara interna de cada mejilla y deje secar la muestra al aire.</p> <p><i>Para la recogida de muestra no se debe consumir comidas o bebidas durante los 30 min previos a la recolección.</i></p>		MUESTRA
2	<p>PRE-LISIS</p> <p>Coloque la muestra en un tubo de centrifuga de 2 mL. Añada 400-600 µL buffer PBS⁷ y 25 µL Proteinase K.</p> <p><i>El volumen de PBS dependerá del tipo de swab utilizada para la recolección de la muestra: para swabs dacron® o de algodón utilizar 400 µL; para las C.E.P. adicionar 600 µL.</i></p> <p>Mezcle 2 x 5 seg con vortex e incubar 10 min a 56 °C.</p>		<p>+ 400-600 µL buffer PBS + 25 µL PROTEINASE K</p> <p>10 min, 56 °C</p>
3	<p>LISIS</p> <p>Transfiera el mayor volumen posible de lisado a un microtubo de 1.5mL. Deseche la torunda/bastoncito y continúe con el lisado recuperado.</p> <p>Añada un volumen de Buffer BB3 (400-600 µL, dependiendo del volumen de PBS adicionado) y mezclar exhaustivamente con vortex. Incube 10 min a 70 °C.</p> <p><i>Dependiendo del número de muestras a procesar este protocolo puede requerir una cantidad de Buffer BB3 superior a la proporcionada con el kit.</i></p>		<p>1 volumen BUFFER BB3</p> <p>10 min, 70 °C</p>
4	<p>ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES PARA LA UNIÓN DEL ADN A LA COLUMNA</p> <p>Añada al lisado un volumen de etanol 96-100% (400-600 µL, dependiendo del volumen de PBS adicionado) y mezcle con vortex.</p>		<p>1 volumen ETANOL vortex</p>
5	<p>UNIÓN DEL ADN</p> <p>Coloque la columna en un Collecting tube de 2 mL (<i>utilice una columna por muestra</i>) y transfiera 600 µL del lisado a la columna. Centrifugue 1 min a 11,000 × g.</p> <p><i>Si la muestra no ha pasado totalmente por la columna, centrifugue nuevamente. Repita este paso hasta que todo el lisado pase a través de la columna.</i></p> <p>Descarte el filtrado y coloque la columna en el Collecting tube.</p>		<p>Cargar lisado en la columna</p> <p>1 min, 11,000 × g</p>
6	Continuar a partir del Paso 6 del Protocolo Estándar.		

⁷ Buffer PBS estéril: disolver 8 g de NaCl; 0.2 g de KCl; 1.44 g de Na₂HPO₄; 0.24 g de KH₂PO₄ en 800 mL H₂O, ajustar el pH a 7.4 con HCl y añadir H₂O hasta llegar a un volumen de 1 L. Autoclavar el Buffer PBS.

7. RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Problema	Posible causa y sugerencias
Bajo o ningún rendimiento de ADN	<p>Lisis incompleta</p> <ul style="list-style-type: none"> • La muestra no ha sido bien mezclada y homogeneizada con el Buffer BT1/Proteinase K. Después de añadir el Buffer BT1 vortex vigorosamente la muestra. • Insuficiente digestión de la Proteinasa K debida a una actividad enzimática baja inferior a lo normal. Almacene la Proteinasa K a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante al menos 6 meses. <p>Reactivos no han sido preparados correctamente</p> <ul style="list-style-type: none"> • Prepare el Buffer BB5 y la solución de Proteinase K según las instrucciones de la sección 4. Añada etanol al lisado antes de cargar las columnas. <p>Elución incompleta del ADN unido a la columna</p> <ul style="list-style-type: none"> • El Buffer BBE de elución debe precalentarse a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ antes de su uso. Aplique el Buffer BBE directamente sobre el centro de la membrana de sílica. • La eficiencia de elución disminuye drásticamente si el buffer utilizado para eluir tiene un $\text{pH} < 7.0$. Así el Buffer BBE posee un $\text{pH} 8.5$. Utilice buffers ligeramente alcalinos para eluir el ADN. • Cuando trabaje con muestras con un gran volumen de las que se espera obtener un alto rendimiento, se recomienda eluir el ADN con $200\text{ }\mu\text{L}$ de Buffer BBE e incubar la columna cerrada con su tapa en una incubadora a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 min antes de centrifugar.
Se obtiene ADN de mala calidad	<p>Lisis celular incompleta</p> <ul style="list-style-type: none"> • La muestra no ha sido bien homogeneizada y mezclada con el Buffer BT1/Proteinase K. Después de añadir el Buffer BT1 vortex vigorosamente la muestra. • Insuficiente digestión de la Proteinasa K debida a una baja actividad enzimática de la proteinasa. Almacene la Proteinasa K a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante al menos 6 meses. <p>Reactivos no han sido preparados correctamente</p> <ul style="list-style-type: none"> • Prepare el Buffer BB5 y la solución de Proteinase K según las instrucciones de la sección 4. Añada etanol al lisado antes de cargar las columnas. <p>Existencia de ARN en la muestra</p> <ul style="list-style-type: none"> • Si se quiere ADN libre de ARN añada solución de RNase A, no incluido en el kit, antes de añadir el Buffer BB3 de lisis e incube 5 min a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Problema	Posible causa y sugerencias
<p>La columna se ha obturado</p>	<p>Se ha cargado la columna con demasiado material</p> <ul style="list-style-type: none"> No utilice más cantidad de muestra que el indicado (25 mg en la mayoría de tejidos). Si en el lisado permanece material insoluble como huesos o pelo, spin la muestra para que los restos caigan al fondo del tubo y transfiera el sobrenadante (claro sin turbidez) a un nuevo tubo de centrifuga. Continúe con el protocolo. <p>Lisis incompleta</p> <ul style="list-style-type: none"> La muestra no ha sido bien mezclada y homogeneizada con el Buffer BT1/Proteinase K. Después de añadir el Buffer BT1 vortex vigorosamente la muestra. Insuficiente digestión de la Proteinasa K debida a una baja actividad enzimática de la misma. Almacene la Proteinasa K a -20 °C durante al menos 6 meses. <p>Reactivos no han sido preparados correctamente</p> <ul style="list-style-type: none"> Prepare los buffers y la solución de Proteinase K según las instrucciones de la sección 4. Añada etanol al lisado antes de cargar las columnas.
<p>El ADN purificado no funciona bien en reacciones enzimáticas</p>	<p>Presencia de etanol y sales</p> <ul style="list-style-type: none"> Antes de pasar al paso de elución del ADN asegúrese que ha centrifugado la columna ≥ 1 min a 11,000 x g para así eliminar los restos de etanol del Buffer BB5. Si por alguna circunstancia el nivel del Buffer BB5 ha sobrepasado la columna y ha alcanzado el exterior de la misma, coloque la columna en un nuevo tubo y centrifugue otra vez para eliminar restos de etanol. Antes de su uso equilibre el Buffer BB5 a temperatura ambiente pues su capacidad de eliminar sales disminuye si el buffer esta frío. <p>Contamination del ADN con inhibidores</p> <ul style="list-style-type: none"> Si el ADN ha sido eluido con buffer Tris/EDTA (TE), asegúrese que EDTA no interfiera en posteriores aplicaciones del ADN o re-purifique el ADN y utilice el Buffer BBE. Si el ratio de A260/280 del eluido es menor de 1.6 repita el proceso de purificación: Añada un volumen de Buffer BB3 y un volumen de etanol al eluido, cargue una columna y continúe con el paso 5 del Protocolo Estándar.

8. INFORMACIÓN SOBRES 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

9. LIMITACIONES Y GARANTÍA

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

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