



## DANAGENE SPIN GENOMIC DNA KIT

**Ref.0605.1 50 extracciones**

**Ref.0605.2 250 extracciones**

**Ref.0605.3 1000 extracciones**

### 1. INTRODUCCION

Este kit está designado para una rápida extracción y purificación de ADN genómico de alta calidad a partir de una amplia variedad de muestras incluyendo sangre total, células en cultivo, tejidos animales, colas de ratón, bacterias, levaduras, muestras clínicas (suero, plasma, heces, orina), muestras de forense y tejidos embebidos en parafina.

El kit contiene suficientes reactivos y columnas para realizar **50/250/1000 extracciones** de ADN genómico según el kit de diferentes muestras:

- 200 µl sangre total.
- 200 µl "buffy coat".
- $10^4$ - $10^6$  células en cultivo.
- 25-50 mg tejido.
- 0,2-0,5 cm cola de ratón.
- $10^8$  bacterias.
- $10^9$  levaduras.
- Secciones de tejidos embebidos en parafina.

**NOTA: Para cualquier otro tipo de muestra solicitar el protocolo al servicio técnico de DANAGEN-BIOTED S.L**

El procedimiento incluye una lisis en **SDS** y **proteínasa K**, después se añade una solución caotrópica que creará las condiciones necesarias para que el ADN se una a la membrana de fibra de vidrio y finalmente el ADN es eluido con un **tampón de elución**.

El ADN obtenido es de elevada calidad y puede ser utilizado directamente en PCR, Southern, clonaje, cualquier reacción enzimática, etc.

## 2. COMPONENTES KIT

Reactivos suficientes para	50 extracciones	250 extracciones	1000 extracciones	Tª Stock
Tampón de Lisis Tejidos	10 ml	50 ml	4 x 50 ml	15-25°C
Tampón de Lisis/Unión	10 ml	50 ml	4 x 50 ml	15-25°C
Proteinasa K*	22 mg	105 mg	4 x 105 mg	-20°C
Tampón de Desinhibición*	16,5 ml	82,5 ml	4 x 82,5 ml	15-25°C
Tampón de Lavado*	10 ml	50 ml	4 x 50 ml	15-25°C
Tampón de Elución	10 ml	50 ml	4 x 50 ml	15-25°C
MicroSpin Columns	50 unid.	250 unid.	1000 unid.	15-25°C
Tubos de Recogida	100 unid.	500 unid.	2000 unid.	15-25°C

\* Ver en el apartado de preparaciones preliminares como preparar estas soluciones

### Equipos y reactivos necesarios y no provistos

- Isopropanol.
- Etanol 100 %
- Microcentrifuga.
- Microtubos de 1,5 ml.

### Almacenamiento y estabilidad

- Todos los componentes son estables durante 12 meses desde la fecha de la compra siendo almacenados como se indica.

**ATENCIÓN:** El Tampón de Lisis/Unión y el Tampón de Desinhibición contiene guanidine hydrochloride que es irritante, utilizar guantes y gafas.

## 3. PROTOCOLO

El protocolo implica los pasos siguientes:

- Las muestras son lisadas con el **Tampón de Lisis** adecuado y **proteínasa K**.
- Los ácidos nucleicos se unen a la matriz de fibra de vidrio empaquetada en las MicroSpin Columns.
- Los ácidos nucleicos son lavados primero con el **Tampón de Desinhibición** para eliminar los inhibidores de la PCR.
- Lavado de los ácidos nucleicos para eliminar sales, proteínas y otras impurezas.
- Los ácidos nucleicos son eluidos.

### 3.1 Preparaciones preliminares

- Disolver la **proteínasa K** en **1,1 ml** de agua libre de nucleasas (kit 50 extracciones) y en **5,2 ml** (kit 250 extracciones) y conservar a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se recomienda realizar varias alícuotas para evitar demasiados ciclos de descongelado-congelado. A esta temperatura es estable durante 1 año.
- Verificar que el **Tampón de Lisis de Tejidos**, **Tampón de Lisis/Unión** no tienen precipitados debido a las bajas temperaturas. Si es necesario, disolver calentando a  $37^{\circ}\text{C}$ .
- Añadir el **Etanol** 100 % al **Tampón de Desinhibición** indicado en la etiqueta, unos **10 ml** (kit 50 extracciones) y unos **50 ml** (kit 250 extracciones). Mantener el envase bien cerrado para evitar la evaporación del **etanol**.

- Añadir el **Etanol** 100 % al **Tampón de Lavado** indicado en la etiqueta, unos **40 ml** (kit 50 extracciones) y unos **200 ml** (kit 250 extracciones). Mantener el envase bien cerrado para evitar la evaporación del **etanol**.
- **Pre-calentar el Tampón de Elución a 70°C puede aumentar el rendimiento de ADN obtenido. Para alguna aplicación posterior puede ser necesario que el ADN esté concentrado, la elución en volúmenes más pequeños de 200 µl incrementará la concentración final de ADN en el eluido pero reducirá el rendimiento global de ADN obtenido. Para muestras que contenga <3 µg ADN, se recomienda una elución en 100 µl. Para muestras que contenga <1 µg ADN, se recomienda una elución en 50 µl.**

### 3.2 Protocolo de extracción de ADN genómico a partir de sangre total, "buffy coat" y células en cultivo

- 200 µl sangre total.
- 200 µl "buffy coat".
- 10<sup>4</sup>- 10<sup>6</sup> células en cultivo.

Si el material no llega a 200 µl llevar el volumen final de la muestra a 200 µl con agua libre de nucleasas.

1. A 200 µl del material indicado añadir **200 µl del Tampón de Lisis/Unión + 20 µl Proteinasa K**. Mezclar bien. Incubar a 70°C durante 10 minutos.
2. Añadir **100 µl de Isopropanol**. Mezclar bien.
3. Pipetear el lisado en el reservorio de la Spin microcolumna con su tubo de recogida. **Centrifugar a 8.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el tubo de recogida.
4. Colocar la MicroSpin columna en un nuevo tubo de recogida y añadir al reservorio **500 µl de Tampón de Desinhibición**. **Centrifugar a 12.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el líquido.
5. **Añadir 500 µl de Tampón de Lavado** en el reservorio de la Spin microcolumna. **Centrifugar a 12.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el líquido.
6. 2º Lavado. **Añadir 500 µl de Tampón de Lavado** en el reservorio de la Spin microcolumna. **Centrifugar a 14.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el líquido.
7. **Centrifugar a máxima velocidad durante 90 segundos para eliminar el etanol residual**.
8. Eliminar el tubo de recogida y insertar la spin microcolumna en un microtubo de 1,5 ml. **Añadir 50-200 µl de Tampón de elución** (precalentado a 70°C) en el reservorio de la spin microcolumna. Incubar 2 minutos.
9. **Centrifugar a máxima velocidad durante 60 segundos**. El microtubo contiene ahora el ADN genómico.

### 3.3 Protocolo de extracción de ADN genómico a partir de 25 mg de Tejidos animales

1. Cortar 25 mg de tejido humano o animal en pequeños trozos y colocar en un microtubo de 1,5 ml. Añadir **180 µl del Tampón de Lisis de Tejidos + 20 µl Proteinasa K**. Mezclar bien. Incubar a 55°C durante 1 hora o hasta que la lisis sea completa, las muestras pueden ser incubadas "overnight".

*Las muestras que son difíciles de lisar pueden ser molidas con Ni líquido o pueden ser tratadas directamente con un homogeneizador tipo Polytron.*

2. Añadir **200 µl de Tampón de Lisis/Unión**. Agitar con Vortex. Incubar a 70°C durante 10 minutos. Si se encuentran partículas insolubles, centrifugar 5 minutos a máxima velocidad y traspasar el sobrenadante a un nuevo microtubo.
3. Añadir **100 µl de Isopropanol**. Mezclar bien.
4. Pipetear el lisado en el reservorio de la Spin microcolumna con su tubo de recogida. **Centrifugar a 8.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el tubo de recogida.
5. Colocar la MicroSpin columna en un nuevo tubo de recogida y añadir al reservorio **500 µl de Tampón de Desinhibición**. **Centrifugar a 12.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el líquido.
6. **Añadir 500 µl de Tampón de Lavado** en el reservorio de la Spin microcolumna. **Centrifugar a 12.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el líquido.
7. 2º Lavado. **Añadir 500 µl de Tampón de Lavado** en el reservorio de la Spin microcolumna. **Centrifugar a 14.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el líquido.
8. **Centrifugar a máxima velocidad durante 90 segundos para eliminar el etanol residual**.
9. Eliminar el tubo de recogida y insertar la spin microcolumna en un microtubo de 1,5 ml. **Añadir 50-200 µl de Tampón de elución** (precalentado a 70°C) en el reservorio de la spin microcolumna. Incubar 2 minutos.
10. **Centrifugar a máxima velocidad durante 60 segundos**. El microtubo contiene ahora el ADN genómico.

### **3.4 Protocolo de extracción de ADN genómico a partir de 25-50 mg de cola de ratón**

1. Cortar 0,2-0,5 cm de cola de ratón en varios trozos y colocar en un microtubo de 1,5 ml. Añadir **180 µl del Tampón de Lisis de Tejidos + 20 µl Proteinasa K**. Mezclar bien. Incubar a 55°C hasta que la lisis sea completa, las muestras pueden ser incubadas "overnight". Para eliminar residuos de huesos o pelos, centrifugar durante 5 minutos a velocidad máxima y traspasar el sobrenadante a un nuevo microtubo.
2. Añadir **200 µl de Tampón de Lisis/Unión y 100 µl de Isopropanol**. Mezclar bien con un agitador vortex.
3. Pipetear el lisado en el reservorio de la Spin microcolumna con su tubo de recogida. **Centrifugar a 8.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el tubo de recogida.
4. Colocar la MicroSpin columna en un nuevo tubo de recogida y añadir al reservorio **500 µl de Tampón de Desinhibición**. **Centrifugar a 12.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el líquido.
5. **Añadir 500 µl de Tampón de Lavado** en el reservorio de la Spin microcolumna. **Centrifugar a 12.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el líquido.
6. 2º Lavado. **Añadir 500 µl de Tampón de Lavado** en el reservorio de la Spin microcolumna. **Centrifugar a 14.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el líquido.
7. **Centrifugar a máxima velocidad durante 90 segundos para eliminar el etanol residual**.

8. Eliminar el tubo de recogida y insertar la spin microcolumna en un microtubo de 1,5 ml. **Añadir 50-200 µl de Tampón de elución** (precalentado a 70°C) en el reservorio de la spin microcolumna. Incubar 2 minutos.

9. **Centrifugar a máxima velocidad durante 60 segundos.** El microtubo contiene ahora el ADN genómico.

### **3.5 Protocolo de extracción de ADN genómico a partir de 10<sup>9</sup> bacterias**

1. Centrifugar 1-1,5 ml de cultivo bacteriano. Eliminar el sobrenadante. Resuspender el pellet en **180 µl de Tampón de Lisis de Tejidos y luego añadir 20 µl Proteinasa K.** Agitar con Vortex e incubar a 55°C hasta que se complete la lisis.

Para aquellas cepas difíciles de lisar, especialmente las Gram+, es necesaria una incubación previa con enzimas líticos. Resuspender el pellet con 200 µl de PBS con 20 mg/ml de lisozima y/o lisostafina (10 mg/ml), incubar 30 minutos a 37°C, luego añadir **20 µl Proteinasa K** e incubar a 55°C hasta que se complete la lisis.

2. Añadir **200 µl de Tampón de Lisis/Unión.** Agitar con Vortex. Incubar a 70°C durante 10 minutos.

3. Añadir **100 µl de Isopropanol.** Mezclar bien.

4. Pipetear el lisado en el reservorio de la Spin microcolumna con su tubo de recogida. **Centrifugar a 8.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el tubo de recogida.

5. Colocar la MicroSpin columna en un nuevo tubo de recogida y añadir al reservorio **500 µl de Tampón de Desinhibición. Centrifugar a 12.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el líquido.

6. **Añadir 500 µl de Tampón de Lavado** en el reservorio de la Spin microcolumna. **Centrifugar a 12.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el líquido.

7. 2º Lavado. **Añadir 500 µl de Tampón de Lavado** en el reservorio de la Spin microcolumna. **Centrifugar a 14.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el líquido.

8. **Centrifugar a máxima velocidad durante 90 segundos para eliminar el etanol residual.**

9. Eliminar el tubo de recogida y insertar la spin microcolumna en un microtubo de 1,5 ml. **Añadir 50-200 µl de Tampón de elución** (precalentado a 70°C) en el reservorio de la spin microcolumna. Incubar 2 minutos.

10. **Centrifugar a máxima velocidad durante 60 segundos.** El microtubo contiene ahora el ADN genómico.

### **3.6 Protocolo de extracción de ADN genómico a partir de 10<sup>8</sup> levaduras**

1. Centrifugar 3 ml de cultivo de levadura. Eliminar el sobrenadante. Resuspender el pellet en 290 µl de EDTA 50 mM y 10 µl de Liticasa (20 mg/ml). Incubar a 37°C durante 30-60 minutos. Centrifugar a máxima velocidad y eliminar el sobrenadante. Resuspender el pellet con **180 µl de Tampón de Lisis de Tejidos y luego añadir 20 µl Proteinasa K.** Agitar con Vortex. Incubar a 55°C hasta que la lisis se complete.

2. Añadir **200 µl de Tampón de Lisis/Unión.** Agitar con Vortex. Incubar a 70°C durante 10 minutos.

3. Añadir **100 µl de Isopropanol.** Mezclar bien.

4. Pipetear el lisado en el reservorio de la Spin microcolumna con su tubo de recogida. **Centrifugar a 8.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el tubo de recogida.
5. Colocar la MicroSpin columna en un nuevo tubo de recogida y añadir al reservorio **500 µl de Tampón de Desinhibición. Centrifugar a 12.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el líquido.
6. **Añadir 500 µl de Tampón de Lavado** en el reservorio de la Spin microcolumna. **Centrifugar a 12.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el líquido.
7. 2º Lavado. **Añadir 500 µl de Tampón de Lavado** en el reservorio de la Spin microcolumna. **Centrifugar a 14.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el líquido.
8. **Centrifugar a máxima velocidad durante 90 segundos para eliminar el etanol residual.**
9. Eliminar el tubo de recogida y insertar la spin microcolumna en un microtubo de 1,5 ml. **Añadir 50-200 µl de Tampón de elución** (precalentado a 70°C) en el reservorio de la spin microcolumna. Incubar 2 minutos.
10. **Centrifugar a máxima velocidad durante 60 segundos.** El microtubo contiene ahora el ADN genómico.

#### **4. GUIA DE PROBLEMAS Y SOLUCIONES**

Para cualquier duda o consulta adicional sobre el protocolo pónganse en contacto con el servicio técnico de DanaGen-BioTed .L [info@danagen.es](mailto:info@danagen.es)