



## DANAGENE PLANT DNA Kit

Ref. 0604.1 50 extracciones

Ref. 0604.2 200 extracciones

### 1. INTRODUCCION

#### 1.1 Descripción del producto

Este kit provee un método para una eficiente y rápida extracción de **ADN genómico a partir de tejidos y células de plantas y hongos.**

Es conocido que las plantas contienen cantidades de diferentes sustancias (polisacáridos, polifenoles, etc) y que plantas del mismo género o géneros relacionados pueden presentar enormes variabilidades en sus composiciones bioquímicas, de esta forma, se hace difícil de disponer de un único método de extracción de ADN para todas las plantas.

Para solventar este problema y poder abarcar el mayor número de plantas posibles DANAGENE-BIOTED utiliza una **solución de PVP** que es capaz de unir los polisacáridos y polifenoles que se liberan mediante la lisis celular y que poseen la capacidad de formar complejos con los ácidos nucleicos y degradarlos o hacer que precipiten con ellos.

El procedimiento incluye una homogenización de la muestra en un Tampón de extracción y la Solución de PVP. La lisis se completa con la incubación en un Tampón de Lisis y RNasa a 37°C durante 30 minutos.

Las proteínas celulares y restos celulares son eliminados mediante una Tampón de eliminación de proteínas, lo que permite dejar el ADN genómico en solución. Finalmente el ADN genómico es aislado por una precipitación con isopropanol.

#### 1.2 Componentes del kit y condiciones de almacenaje

Reactivos suficientes para	50 extracciones	200 extracciones	T <sup>a</sup> Stock
Tampón de Extracción	25 ml	100 ml	ambiente
Solución de PVP	10 ml	40 ml	4°C
Solución de Lisis	3 ml	12 ml	ambiente
RNasa	150 µl	600 µl	4°C o -20°C
Tampón de precipitación proteínas	18 ml	72 ml	ambiente
Tampón de Hidratación	5 ml	20 ml	ambiente

#### 1.3 Equipos y reactivos necesarios y no provistos.

- Isopropanol.
- Etanol 70%.
- Microtubos de 1.5 ml y 2.0 ml.
- Tubos de centrifuga de 15 o 30 ml que soporte elevadas velocidades (para extracciones mayores de 100 mg de tejido).
- Microcentrifuga o centrifuga clínica.
- Vortex.
- Baño de agua.
- Nitrógeno líquido y mortero para pulverizar los tejidos.
- Homogenizador eléctrico.
- Proteinasasa K(20 mg/ml) para extracción en hongos.

#### **1.4 Almacenamiento y estabilidad**

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

## **2.PROTOCOLO**

### **2.1 Preparaciones preliminares**

- Si la solución de lisis contiene un precipitado debido a las bajas temperaturas. Incubar a 37°C y mezclar para disolver el precipitado.
- Conservar la RNasa a 4°C. Si el periodo de utilización del kit va a ser elevado, se recomienda hacer alicuotas y conservar a -20°C.

### **2.2 Consideraciones preliminares**

- Para una efectiva obtención de ADN a partir de **plantas** se recomienda pulverizar la muestra en un mortero de porcelana con nitrógeno líquido. Para tejidos blandos y no fibrosos, como hojas jóvenes, flores, etc pueden ser homogenizadas en un homogenizador eléctrico pero siempre que se trate de muestras frescas, diseccionando la muestra en pequeños trozos, añadir el tampón de extracción + solución de PVP y homogeneizar. Para tejidos duros o fibrosos, como tallos, semillas, etc se recomienda el uso de Ni líquido.
- En el caso de **los hongos** recoger el micelio a partir del cultivo por filtración, lavar 3 veces con agua estéril desionizada o PBS para eliminar el medio de cultivo. Pulverizar el tejido en un mortero de porcelana con Ni líquido, conservar a -80°C o procesar la muestra.
- **NOTA:** Puede ser necesario variar la cantidad del material inicial dependiendo de la especie, estado, preparación del tejido o tamaño del genoma.
- Para procesar muestras de 100 mg es necesario utilizar tubos de 15 o 30 ml que soporten altas velocidades de centrifugación.

### **2.3 Protocolo de extracción de ADN genómico a partir de 10-20 mg de tejido de planta o 10-20 mg de tejido de hongo**

#### **Lisis celular**

1. Pesar la muestra **10-20 mg de tejido de planta o 10-20 mg tejido de hongo** y añadir **400 µl de Tampón de extracción + 200 µl de Solución de PVP**. Homogenizar con un homogenizador eléctrico durante 20 segundos.
2. Añadir **60 µl de Solución de Lisis + 3 µl RNasa**. Vortex vigorosamente e incubar la muestra a 37°C durante 30 minutos. *En el caso de los hongos para aumentar la eficiencia de la lisis añadir 3 µl de Proteinasa K (20 mg/ml) e incubar a 55°C durante 1 hora o overnight. Si es posible, invertir o vortex periódicamente durante la incubación.*

#### **Precipitación proteica**

1. Enfriar la muestra a temperatura ambiente.
2. Añadir **360 µl de Tampón de Precipitación de Proteínas**.
3. Vortex vigorosamente durante 20-30 segundos.
4. Incubar a **-20°C durante 10 minutos**.
5. Centrifugar a **14.000 rpm durante 5 minutos**. Se observará que el precipitado proteico forma un pellet. Si pasan partículas del pellet volver a centrifugar como en el anterior apartado.

#### **Precipitación del ADN**

1. Pasar el sobrenadante que contiene el ADN a un microtubo que contenga **600 µl de isopropanol**. Mezclar por inversión varias veces.
2. Centrifugar a **14.000 rpm durante 3 minutos**.
3. Eliminar el sobrenadante. Añadir **600 µl de etanol 70%** e invertir varias veces para lavar el pellet.
4. Centrifugar a **14.000 rpm durante 2 minutos**. Cuidadosamente eliminar todo el etanol. Vigilar no perder el pellet de ADN. Normalmente este pellet tiene color verde-marrón y no el característico color blanco.
5. Invertir el tubo y dejar secar en papel absorbente durante 15 minutos.

### **Hidratación del ADN**

1. Añadir **100 µl del Tampón de Hidratación**. Según la especie, el tamaño del pellet puede ser mayor, utilizar en tales casos una mayor cantidad de Tampón de hidratación de forma que no quede una solución excesivamente viscosa.
2. Incubar a 65°C durante 1 hora con periódicas agitaciones para ayudar a la dispersión del ADN.
3. **Centrifugar a 14.000 rpm durante 1 minuto ya que puede haber partículas presentes en el ADN rehidratado. Pasar el sobrenadante que contiene el ADN a un nuevo microtubo.**
4. Conservar a 2-8°C. Para almacenajes largos conservar a -20°C o -80°C.

### **Eliminación posterior de polisacáridos**

En aquellas especies con elevadas cantidades de polisacáridos se puede realizar una purificación posterior que suele producir una reducción en el ADN obtenido pero de mayor calidad. Para ello valorar si las subsiguientes manipulaciones del ADN son inhibidas.

1. Ajustar la solución de ADN hidratado a 0.5 M de Acetato de Potasio y 30 % de etanol. Incubar a -20°C durante 10 minutos.
2. Centrifugar a 14.000 rpm durante 3 minutos.
3. Recoger el sobrenadante con una pipeta y añadir 1 volumen de isopropanol.
4. Centrifugar a 14.000 rpm durante 3 minutos.
5. Lavar con etanol 70 %.
6. Centrifugar a 14.000 rpm durante 2 minutos.
7. Invertir el tubo y dejar secar en papel absorbente durante 15 minutos.
8. Resuspender el pellet en el Tampón de Rehidratación.

**NOTA:** Para procesar muestras de mayor tamaño, ver la tabla adjunta con los reactivos escalados según el tamaño de la muestra y proceder como el protocolo descrito aplicando las cantidades correspondientes.

### **Tabla de volúmenes de reactivos escalados a partir de 10mg hasta 250 mg**

Cantidad de tejido en mg	10-20	25-35	40-50	100	150	250
Tamaño tubo	1.5 ml	2.0 ml	15 ml	15 ml	15 ml	30 ml
Tampón de extracción	0.40 ml	0.500 ml	0.80 ml	1.60 ml	2.40 ml	4.0 ml
Solución de PVP	0.20 ml	0.250 ml	0.40 ml	0.80 ml	1.20 ml	2.0 ml
Solución de Lisis (µl)	60	75	120	240	360	600
RNasa (µl)	3	4.5	6	12	18	30
T.Precipitación de proteínas	0.36ml	0.450 ml	0.72 ml	1.45 ml	2.15 ml	3.6 ml
Isopropanol	0.60 ml	0.75 ml	1.35 ml	2.70 ml	4.0 ml	7.0 ml
Tampón hidratación (µl)	100	150-200	200-300	300-400	400-500	500-600

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

Dada la gran variedad de muestras que se pueden tratar para extraer ADN genómico con este kit se hace difícil poder generalizar los posibles problemas y soluciones. Es por ello, que recomendamos ponerse en contacto con el servicio técnico de DANAGEN-BIOTED S.L para cualquier consulta adicional respecto a los protocolos de trabajo o problemas que puedan surgir durante el trabajo. [info@danagen.es](mailto:info@danagen.es)