



DANAGENE SPIN PLANT DNA KIT

Ref. 0611.1 50 extracciones

Ref. 0612.2 250 extracciones

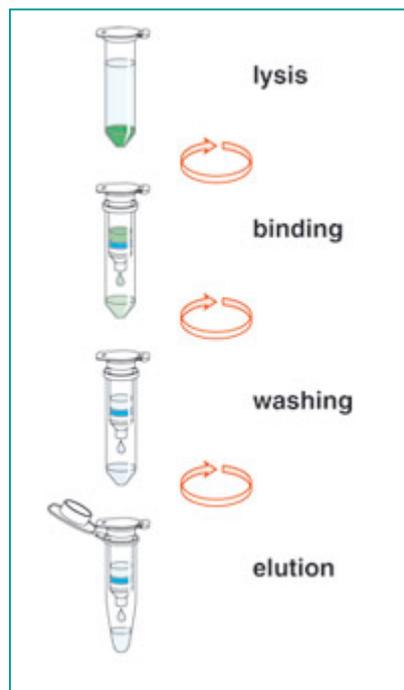
1.INTRODUCCION

Este Kit proporciona un método eficiente y rápido para la extracción de **ADN genómico de plantas y hongos utilizando MiniSpin columnas.**

El kit incluye 2 optimizados tampones de lisis, basados en los métodos establecidos de CTAB y de SDS. Las plantas son muy heterogéneas y contienen diferentes metabolitos como polifenoles, polisacáridos o componentes ácidos, DANAGENE SPIN PLANT DNA Kit **suministra 2 diferentes procedimientos de lisis para el óptimo procesamiento de diferentes muestras de plantas.**

Además, también le suministramos **una solución de PVP que une los polisacáridos y polifenoles**

PROCEDIMIENTO



Las muestras de plantas son primero rotas/homogenizadas y luego lisadas en un optimizado tampón que contiene sales caotrópicas, agentes desnaturalizantes y detergentes.

Se puede utilizar 2 optimizados tampones de lisis basados en los métodos establecidos de CTAB y SDS.

El lisado crudo es limpiado por centrifugación y el lisado limpio es mezclado después con el tampón de unión y procesado a través de una MiniSpin columna que contiene una membrana de sílica que permite la unión del ADN.

Los contaminantes e impurezas como sales, metabolitos y componentes celulares son eliminados con un paso de lavado con 2 diferentes tampones de lavado.

ADN genómico de elevada pureza es luego eluido en un Tampón de elución. El ADN ya está listo para ser utilizado en diferentes aplicaciones.

Características:

- **Tecnología de membrana de sílica que utiliza MiniSpin columnas.**
- **Se puede utilizar 2 tampones de lisis optimizados y la solución de PVP.**
- **Elevada pureza: $A_{260}/A_{280} = 1.6 - 1.9$.**

Aplicaciones:

- **Extracción de ADN genómico de plantas a partir: Tejido de plantas o de hongos fresco, congelado o liofilizado. Células de plantas.**
- **El ADN aislado está listo para las siguientes aplicaciones como PCR, PCR cuantitativa y genotipado.**

2.COMPONENTES KIT

| | 50 extract. | 250 extract. | T ^a Stock |
|---|------------------|------------------|-------------------------------|
| Tampón de Lisis CTAB | 60 ml | 300 ml | T^a ambiente |
| Tampón de Lisis/unión | 35 ml | 175 ml | T^a ambiente |
| Proteinasa K ^(*) | 22 mg | 105 mg | -20°C |
| Tampón de Extracción | 50 ml | 250 ml | T^a ambiente |
| PVP Solution | 10 ml | 50 ml | 4°C |
| Tampón de Lisis SDS | 12 ml | 60 ml | T^a ambiente |
| Tampón de Precipitación | 12 ml | 60 ml | 4°C |
| Tampón de Desinhibición ^(*) | 16.5 ml | 82.5 ml | T^a ambiente |
| Tampón de Lavado ^(*) | 10 ml | 50 ml | T^a ambiente |
| Tampón de Elución | 10 ml | 50 ml | T^a ambiente |
| MiniSpin Columnas | 50 unid. | 250 unid. | T^a ambiente |
| Tubos de Recolección | 100 unid. | 500 unid. | T^a ambiente |

2.2 Equipment and additional reagents required

- ✓ Isopropanol.
- ✓ Etanol 100 %.
- ✓ Etanol 70%
- ✓ Microcentrifuga.
- ✓ Microtubos de 1.5 ml y 2.0 ml.
- ✓ Homogenizador eléctrico de mano.
- ✓ Baño incubador.
- ✓ Vortex.
- ✓ Nitrogeno líquido.

3. PROTOCOLO

3.1 Preparaciones Preliminares

- Disolver la proteinasa 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°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/ Unión no tiene precipitados debido a las bajas temperaturas. Si es necesario, disolver calentando a 37°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 .
- Tanto el Tampón de Lisis/unión como el Tampón de Desinhibición contiene sales irritantes, por esta razón recomendamos el uso de guantes y gafas.

3.2 Consideraciones Preeliminarias

- **Puede ser necesario reducir el tamaño inicial de muestra dependiendo de la especie, estado, tejido o tamaño del genoma.**
- **La primera vez que se trabaja con nuestro kit, se RECOMIENDA el uso de los 2 métodos de trabajo (A y B) para establecer cual método trabaja mejor con nuestra muestra.**

METODO A. Basado en el Tampón de Lisis SDS

1. Pesar **180-200 mg de muestra** en un microtubo de 2.0 ml y añadir **1.00 ml de Tampón de Extracción + 200 μl Solución PVP . Vortex vigorosamente .** Homogenizar con un homogenizador eléctrico de mano durante 20 segundos.

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.

2. Añadir 200 µl Tampón SDS. Vortex vigorosamente . Incubar a 80°C durante 30-45 minutos con vortex periódicos. *Si e tampón de SDS contiene precipitado, incubar a 37°C hasta su desaparición.*

3. Centrifugar a 14.000 rpm durante 5 minutos.

4. Pasar el sobrenadante a un microtubo que contenga **200 µl de Tampón de Precipitación** . **Incubar a -20°C durante 3 minutos.**

5. Centrifugar a 14.000 rpm durante 5 minutos. Aparecerá un pellet y en la superficie una capa de grasa, introducir la punta de pipeta atravesando esta capa superficial, intentando recoger sólo el sobrenadante que es el líquido transparente con color (evitar coger pellet y capa superficial).

6. Pasar el sobrenadante (**entre 600-700 µl**) a un nuevo microtubo.

7. Añadir una cantidad igual al sobrenadante recogido **600-700 µl del Tampón de Lisis/ Unión + 20 µl Proteínasa K** . Mezclar bien. **Incubar a 70°C durante 10 minutos.**

8. Añadir **300 µl de Isopropanol**. Mezclar bien.

9. Añadir **750 µl** en el reservorio de la Spin microcolumna con su tubo de recogida. **Centrifugar a 12.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el tubo de recogida.

10. Repetir el punto N.9 con los **750 µl restantes**. Si quedará más cantidad se puede hacer pasar una tercera vez por la columna.

11. 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.

12. **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.

13. 2º Lavado. **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.

14. Centrifugar a máxima velocidad durante 2 minutos para eliminar el etanol residual.

15. Eliminar el tubo de recogida e insertar la spin microcolumna en un microtubo de 1.5 ml . **Añadir 50 µl de Tampón de elución** (precalentado a 70°C) en el reservorio de la spin microcolumna. **Incubar 1 minuto.**

16. Centrifugar a máxima velocidad durante 60 segundos.

17. Añadir de nuevo otros **50 µl de Tampón de elución** (precalentado a 70°C) en el reservorio de la spin microcolumna. **Incubar 1 minuto.**

18. Centrifugar a máxima velocidad durante 60 segundos. El microtubo contiene ahora el ADN .

METODO B. Basado en el Tampón de Lisis CTAB

1. Pesar **180-200 mg de muestra** en un microtubo de 2.0 ml y añadir **1.20 ml de Tampón CTAB**. Vortex vigorosamente .

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 juvenes, 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 lisis CTAB 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.

2. **Incubar a 80°C durante 30-45 minutos con vortex periódicos.**

3. **Centrifugar a 14.000 rpm durante 5 minutos.** Aparecerá un pellet y en la superficie una capa de grasa, introducir la punta de pipeta atravesando esta capa superficial, intentando recoger sólo **700 μl de sobrenadante** que es el líquido transparente con color (evitar coger pellet y capa superficial) y colocar en un microtubo de 2.0 ml.

4. Añadir **700 μl del Tampón de Lisis/ Unión + 20 μl Proteinasa K** a los 700 μl de sobrenadante. Mezclar bien. **Incubar a 70°C durante 10 minutos.**

5. Añadir **300 μl de Isopropanol**. Mezclar bien.

6. Añadir **750 μl** en el reservorio de la Spin microcolumna con su tubo de recogida. **Centrifugar a 12.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el tubo de recogida.

7. Repetir el punto N.6 con los **750 μl restantes**. Si quedará más cantidad se puede hacer pasar una tercera vez por la columna.

8. 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.

9. **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.

10. 2º Lavado. **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.

11. **Centrifugar a máxima velocidad durante 2 minutos para eliminar el etanol residual.**

12. Eliminar el tubo de recogida e insertar la spin microcolumna en un microtubo de 1.5 ml . **Añadir 50 μl de Tampón de elución** (precalentado a 70°C) en el reservorio de la spin microcolumna. **Incubar 1 minuto.**

13. **Centrifugar a máxima velocidad durante 60 segundos.**

14. Añadir de nuevo otros **50 µl de Tampón de elución** (precalentado a 70°C) en el reservorio de la spin microcolumna. **Incubar 1 minuto.**

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

4.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 que no duden en ponerse en contacto con el servicio técnico de DANAGEN-BIOTED para cualquier consulta adicional respecto a los protocolos de trabajo o problemas que puedan surgir durante el trabajo. info@danagen.es