

DANAGENE GENOMIC DNA KIT

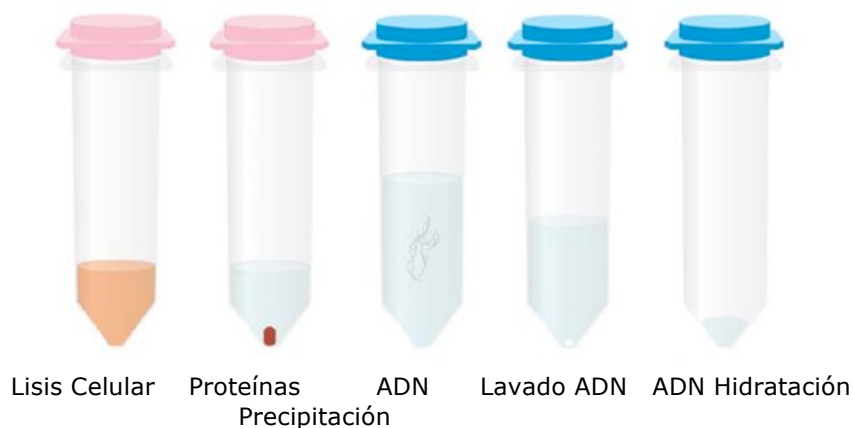
1. INTRODUCCION

1.1 Descripción del producto

Este kit está designado para la **extracción de ADN genómico** de alta calidad a partir de una amplia variedad de muestras incluyendo células en cultivo, tejidos animales o humanos, colas de ratón, bacterias y levaduras.

Otros protocolos pueden obtenerse para diferentes muestras solicitándose al servicio técnico de DANAGEN-BIOTED .

El procedimiento incluye una lisis celular con un detergente aniónico que solubiliza los componentes celulares. Si es necesario, el ARN contaminante puede ser eliminado con un tratamiento con RNasa. Las proteínas celulares son eliminadas por un paso de precipitación, el cual hace precipitar las proteínas pero deja el ADN genómico en solución. Finalmente, el ADN genómico es aislado por una precipitación con isopropanol.



El ADN purificado puede ser utilizado en una variedad de aplicaciones, incluyendo amplificaciones de ADN, digestiones con enzimas de restricción, Southern y dot/slot blots, secuenciación y clonaje.

1.2 Componentes del kit y condiciones de almacenaje

DANAGENE Genomic DNA Tissue Kit	Ref.0603.1 1 gr o 50 preps 20 mg	Ref.0603.11 4 gr o 200 preps 20 mg	Ref.0603.12 33 gr o 1650 preps 20 mg	T^a Stock
Solución de Lisis	32 ml	125 ml	2 x 500 ml	ambiente
Sol.Precipitación de proteínas	20 ml	75 ml	2 x 300 ml	ambiente
Sol.Hidratación ADN	15 ml	50 ml	2 x 250 ml	ambiente
RNasa	175 µl	2 x 325 µl	5 ml	4°C o - 20°C
Proteinasa K	175 µl	2 x 325 µl	5 ml	4°C o - 20°C

DANAGENE Genomic DNA Cell Kit	Ref.0603.2 50 preps 3-5 x 10⁶	Ref.0603.21 200 preps 3-5 x 10⁶	Ref.0603.22 1650 preps 3-5 x 10⁶	T^a Stock
Solución de Lisis	32 ml	125 ml	2 x 500 ml	ambiente
Sol.Precipitación de proteínas	20 ml	75 ml	2 x 300 ml	ambiente
Sol.Hidratación ADN	15 ml	50 ml	2 x 250 ml	ambiente
RNasa	85 µl	325 µl	2.5 ml	4°C o - 20°C

DANAGENE Genomic DNA Mouse Tail Kit	Ref.0603.3 200 preps 0.5-1.0 cm	Ref.0603.31 1650 preps 0.5-1.0 cm	T^a Stock
Solución de Lisis	125 ml	2 x 500 ml	ambiente
Sol.Precipitación de proteínas	75 ml	2 x 300 ml	ambiente
Sol.Hidratación ADN	50 ml	2 x 250 ml	ambiente
Proteinasa K	2 x 1000 µl	17 ml	4°C o - 20°C

DANAGENE Genomic DNA Bacteria Kit	Ref.0603.5 200 ml	Tª Stock
Solución de Lisis	125 ml	ambiente
Solución Lisis Gram +	110 ml	ambiente
Sol.Precipitación de proteínas	75 ml	ambiente
Sol.Hidratación ADN	50 ml	ambiente
RNAsa Lisozima	2 x 325 µl	4°C o - 20°C
	12 ml	4°C o - 20°C

DANAGENE Genomic DNA Yeast Kit	Ref.0603.6 200 ml	Tª Stock
Solución de Lisis	65 ml	ambiente
Solución Lisis Levaduras	60 ml	ambiente
Sol.Precipitación de proteínas	30 ml	ambiente
Sol.Hidratación ADN	25 ml	ambiente
RNAsa Liticasa	2 x 150 µl	4°C o - 20°C
	2 x 800 µl	4°C o - 20°C

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 50 ml.
- Microcentrifuga o centrifuga clínica.
- Vortex.
- Baño de agua.

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

2.1Preparaciones 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 y Proteinasa K 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 generales

- Se recomienda incluir un tratamiento de Proteinasa K para aumentar la eficiencia de lisis, aunque en algunas muestras este tratamiento no es necesario. Si se quiere reducir el tiempo de purificación, el propio usuario puede determinar según la muestra si se requiere el tratamiento con Proteinasa K. 1.5 ml de Proteinasa K en 300 µl de Solución de lisis dará lugar a una concentración final de 100 µg / ml. Incubar a 55°C durante 1 hora o hasta que la digestión sea completa. En el caso de tejidos el uso de un homogenizador mecánico ayuda enormemente en la lisis celular.
- Si se requiere ADN libre de ARN para las subsiguientes aplicaciones, se puede realizar una digestión con RNasa.
- Las muestras que son difíciles de lisar pueden ser pulverizadas bajo Ni líquido o pueden ser tratadas con un homogenizador mecánico.
- Si la cantidad de ADN que se espera obtener es baja (< 2 µg), añadir un carrier como glucógeno (1ml de solución de glucógeno 20 mg/ml por 600 µl de isopropanol).

2.3 Protocolo de extracción de ADN genómico a partir de 20 mg / 50 mg de tejidos animales

Lisis celular

1. Diseccionar la muestra de tejido y rápidamente enfriar en nitrógeno líquido. Conservar a -80°C. Se puede utilizar directamente el tejido fresco para la extracción. Trabajar rápidamente y mantener el tejido en hielo todo el rato.
2. Añadir **20 mg / 50 mg** de tejido congelado pulverizado con nitrógeno líquido o tejido fresco a **600 µl / 1.5 ml** de **Solución de Lisis**. Las muestras que son difíciles de lisar **se recomienda** ser tratadas con un homogenizador mecánico (Polytron, Ultra turrax).
3. Para aumentar la eficiencia de la lisis en tejidos **se recomienda** el uso de **Proteinasa K**. Añadir **3 µl / 7.5 µl** mezclar e incubar a 55°C durante 3 horas o overnight, hasta la lisis total. Si es posible, invertir o vortex periódicamente durante la incubación.

Tratamiento de RNasa

1. Enfriar la muestra a temperatura ambiente.
2. Añadir **3 µl / 7.5 µl** de **RNasa** al lisado.
3. Mezclar la muestra por inversión del tubo y incubar a 37°C durante 15-60 minutos.

Precipitación de proteínas

1. Añadir **360 µl / 900 µl** de **Solución de precipitación de proteínas**.
2. Vortex vigorosamente durante 20-30 segundos.
3. Centrifugar a **14.000 x g / 2.500 x g** durante **5 / 10** minutos. Se observará que el precipitado proteico forma un pellet.

Precipitación del ADN

1. Pasar el sobrenadante que contiene el ADN a un tubo de **1.5 ml** que contenga **600 µl de isopropanol** o a un tubo de **15 ml** que contenga **1.5 ml de isopropanol**. Mezclar por inversión varias veces.
2. Centrifugar a **14.000 x g / 2.500 x g** durante 3 minutos.
3. Eliminar el sobrenadante. Añadir **600 µl / 1.5 µl** de etanol 70% e invertir varias veces para lavar el pellet de ADN.

4. Centrifugar a **14.000 x g / 2.500 x g** durante 2 minutos. Cuidadosamente eliminar todo el etanol. Vigilar no perder el pellet de ADN
5. Invertir el tubo y dejar secar en papel absorbente durante 5 minutos.

Hidratación del ADN

1. Añadir **100 µl / 250 µl** de **Solución de Hidratación del ADN**.
2. Incubar a 65°C durante 1 hora con periódicas agitaciones para ayudar a la dispersión del ADN, o incubar "overnight" a temperatura ambiente o 4°C con agitación para que se rehidrate.
3. Conservar a 2-8°C. Para almacenajes largos conservara -20°C o -80°C.

Tabla de volúmenes de reactivos escalados a partir de 5mg hasta 600 mg

Cantidad tejido en mg	5-10	10-20	25	50	100	300-600
Tamaño tubo	1.5 ml	1.5 ml	2.0 ml	15 ml	15 ml	50 ml
Sol.Lisis	0.3 ml	0.6 ml	0.75 ml	1.5 ml	3.0 ml	18 ml
RNasa (µl)	1.5	3.0	3.75	7.5	15	90
Proteinasa K (µl)	1.5	3.0	3.75	7.5	15	90
Sol.Precip.Proteína	0.18 ml	0.36 ml	0.45 ml	0.90 ml	1.8 ml	10.8 ml
Isopropanol 100%	0.3 ml	0.6 ml	0.75 ml	1.5 ml	3.0 ml	18 ml
Sol.Hidratación(ml)	50	100	150	250	375	500

2.3 Protocolo de extracción de ADN genómico a partir de 10-20 mg / 25-50 mg de cola de ratón

Lisis celular

1. Colocar **5-10 mm(10-20 mg) / 25 mm(25-50 mg)** de cola de ratón troceada en **600 µl / 1.20 ml** de **Solución de Lisis**.
2. Añadir **10 µl / 20 µl** de **Proteinasa K**. Vortex e incubar a 55°C overnight, o hasta la lisis total. Es recomendable si es posible vortex durante la incubación ya que ayuda a la disgregación del tejido. Si la incubación es overnight, al día siguiente realizar vortex vigoroso varias veces para separar los pelos y vertebras.

Tratamiento de RNasa (opcional)

1. Enfriar la muestra a temperatura ambiente.
2. Añadir **3 µl / 6.0 µl** de **RNasa** al lisado.
3. Mezclar la muestra por inversión del tubo y incubar a 37°C durante 15-60 minutos.

Precipitación de proteínas

1. Añadir **360 µl / 720 µl** de **Solución de precipitación de proteínas**.
2. Vortex vigorosamente durante 20-30 segundos.
3. Centrifugar a **14.000 x g / 2.500 x g** durante **5 / 10** minutos. Se observará que el precipitado proteico forma un pellet.

Precipitación del ADN

1. Pasar el sobrenadante que contiene el ADN a un tubo de **1.5 ml** que contenga **600 µl de isopropanol** o a un tubo de **15 ml** que contenga **1.2 ml de isopropanol**. Mezclar por inversión varias veces.
2. Centrifugar a **14.000 x g / 2.500 x g** durante 3 minutos.
3. Eliminar el sobrenadante. Añadir **600 µl / 1.2 ml** de etanol 70% e invertir varias veces para lavar el pellet de ADN.
4. Centrifugar a **14.000 x g / 2.500 x g** durante 2 minutos. Cuidadosamente eliminar todo el etanol. Vigilar no perder el pellet de ADN
5. Invertir el tubo y dejar secar en papel absorbente durante 5 minutos.

Hidratación del ADN

1. Añadir **100-250 µl / 250-500 µl** de **Solución de Hidratación del ADN**.
2. Incubar a 65°C durante 1 hora con periódicas agitaciones para ayudar a la dispersión del ADN, o incubar "overnight" a temperatura ambiente o 4°C con agitación para que se rehidrate.
3. Conservar a 2-8°C. Para almacenajes largos conservara -20°C o -80°C.

2.4 Protocolo de extracción de ADN genómico a partir de 1 ml / 5 ml de cultivos de bacterias Gram(-) y Gram(+)

Las bacterias Gram(+) son más difíciles de lisar es por ello que se recomienda la incubación con enzimas líticos. Para ciertas especies de Staphylococcus una mezcla de lisozima (10 mg/ml) y lisostafina (10 mg / ml) es necesaria.

Lisis celular

1. Añadir **1.0 ml / 5.0 ml** de un cultivo overnight a un tubo de **1.5 ml / 15 ml**.
2. Centrifugar a **14.000 x g / 2.500 x g** durante **30 segundos / 3 minutos**. Eliminar el sobrenadante. Para bacterias Gram (+) proceder con el punto 3. **Para bacterias Gram (-) ir directamente al punto 6.**
3. Resuspender las células en **540 µl / 2.7 ml** de **Solución Lisis Gram +.**
4. Añadir la cantidad de enzimas líticos apropiada, **60 µl / 300 µl de Lisozima** (10 mg/ml). El propósito de este tratamiento es debilitar la pared celular para hacer más eficiente la lisis celular.
5. Incubar la muestra a 37°C durante 60 minutos. Centrifugar a **14.000 x g / 2.500 x g** durante **2 minutos / 5 minutos**. Eliminar el sobrenadante.
6. Añadir **600 µl / 3.0 ml** de **Solución de Lisis** al pellet celular y pipetear para resuspender y lisar las células.
7. Incubar las muestras a 80°C durante 5 minutos. Enfriar a temperatura ambiente.

Tratamiento de RNasa

1. Añadir **3 µl / 15 µl** de **RNasa** al lisado.
2. Mezclar la muestra por inversión del tubo y incubar a 37°C durante 15-60 minutos.

Precipitación de proteínas

1. Enfriar la muestra a temperatura ambiente.
2. Añadir **300 µl / 1500 ml** de **Solución de precipitación de proteínas**.
3. Vortex vigorosamente durante 20-30 segundos.
4. Centrifugar a **14.000 x g / 2.500 x g** durante **5 / 10** minutos. Se observará que el precipitado proteico forma un pellet.

Precipitación del ADN

1. Pasar el sobrenadante que contiene el ADN a un tubo de **1.5 ml** que contenga **600 µl de isopropanol** y a un tubo de **15 ml** que contenga **3 ml de isopropanol**. Mezclar por inversión varias veces.
2. Centrifugar a **14.000 x g / 2.500 x g** durante 3 minutos.
3. Eliminar el sobrenadante. Añadir **600 µl / 3 ml** de etanol 70% e invertir varias veces para lavar el pellet de ADN.
4. Centrifugar a **14.000 x g / 2.500 x g** durante 2 minutos. Cuidadosamente eliminar todo el etanol. Vigilar no perder el pellet de ADN
5. Invertir el tubo y dejar secar en papel absorbente durante 15 minutos.

Hidratación del ADN

1. Añadir **200 µl / 500 µl** de **Solución de Hidratación del ADN**.
2. Incubar a 65°C durante 1 hora con periódicas agitaciones para ayudar a la dispersión del ADN, o incubar "overnight" a temperatura ambiente o 4°C con agitación para que se rehidrate.
3. Conservar a 2-8°C. Para almacenajes largos conservara -20°C o -80°C.

2.5 Protocolo de extracción de ADN genómico a partir de 1 ml / 5 ml de cultivos de levaduras

Lisis celular

1. Añadir **1.0 ml / 5.0 ml** de un cultivo overnight a un tubo de **1.5 ml / 15 ml**.
2. Centrifugar a **14.000 x g / 2.500 x g** durante **2 minutos / 5 minutos**. Eliminar el sobrenadante. Resuspender las células en **292 µl / 2.7 ml** de **Solución Lisis Levaduras**.
3. Añadir la cantidad de enzimas líticos apropiada, **8 µl / 40 µl de Liticasa** (20 mg/ml). El propósito de este tratamiento es debilitar la pared celular para hacer más eficiente la lisis celular.
4. Incubar la muestra a 37°C durante 60 minutos. Centrifugar a **14.000 x g / 2.500 x g** durante **2 minutos / 5 minutos**. Eliminar el sobrenadante.
5. Añadir **300 µl / 1.5 ml** de **Solución de Lisis** al pellet celular y pipetear para resuspender y lisar las células. Algunas cepas pueden requerir la incubación a 65°C durante 5 minutos.

Precipitación de proteínas

1. Añadir **150 µl / 750 µl** de **Solución de precipitación de proteínas**.
2. Vortex vigorosamente durante 20-30 segundos.
3. Centrifugar a **14.000 x g / 2.500 x g** durante **5 / 10** minutos. Se observará que el precipitado proteico forma un pellet.

Precipitación del ADN

1. Pasar el sobrenadante que contiene el ADN a un tubo de **1.5 ml** que contenga **300 µl de isopropanol** y a un tubo de **15 ml** que contenga **1.5 ml de isopropanol**. Mezclar por inversión varias veces.
2. Centrifugar a **14.000 x g / 2.500 x g** durante 3 minutos.
3. Eliminar el sobrenadante. Añadir **300 µl / 1.5 ml** de etanol 70% e invertir varias veces para lavar el pellet de ADN.
4. Centrifugar a **14.000 x g / 2.500 x g** durante 2 minutos. Cuidadosamente eliminar todo el etanol. Vigilar no perder el pellet de ADN
5. Invertir el tubo y dejar secar en papel absorbente durante 15 minutos.

Hidratación del ADN

1. Añadir **50 μ l / 250 μ l** de **Solución de Hidratación del ADN**.
2. Añadir **1.5 μ l / 7.5 μ l** de RNasa.
3. Mezclar la muestra y vortex 1 segundo. Centrifugar para recolectar la muestra y incubar a 37°C durante 15 minutos.
4. Incubar a 65°C durante 1 hora con periódicas agitaciones para ayudar a la dispersión del ADN, o incubar "overnight" a temperatura ambiente o 4°C con agitación para que se rehidrate.
5. Conservar a 2-8°C. Para almacenajes largos conservara -20°C o -80°C.

2.6 Protocolo de extracción de ADN genómico a partir de 3-5 millones / 30-50 millones de células en cultivo.

Previo a la extracción determinar el número de células con un hemocitómetro u otro contador de células.

Las células que crecen en una monocapa pueden ser recogidas por "scraping" o por tripsinización.

Lisis celular

1. Añadir 3-5 millones de células en PBS o medio de cultivo directamente a un microtubo de 1.5 ml. O añadir 30-50 millones de células en PBS o medio de cultivo directamente a un tubo de 15 ml
2. Centrifugar a **14.000 x g / 500 x g** para pellet las células durante **10 segundos/ 3 minutos**. Eliminar el sobrenadante y añadir 200 μ l de PBS para lavar las células.
3. Centrifugar como en el punto 2 para eliminar el PBS, dejar **20-40 μ l / 200-400 μ l** de líquido residual. Vortex vigorosamente para resuspender las células en el sobrenadante residual.
4. Añadir **600 μ l / 6 ml** de **Solución de lisis**, pipetear arriba-abajo para lisar las células hasta que no se observen grumos de células.
5. Incubar a 55°C durante 15 minutos y observar la solución homogénea.

Tratamiento de RNasa (OPCIONAL)

1. Añadir **1.5 μ l / 4.5 μ l** de **RNasa** al lisado.
2. Mezclar la muestra por inversión del tubo y incubar a 37°C durante 15-60 minutos.

Precipitación de proteínas

1. Añadir **360 μ l / 3.6 ml** de **Solución de precipitación de proteínas**.
2. Vortex vigorosamente durante 20-30 segundos.
3. Centrifugar a **14.000 x g / 2.500 x g** durante **5 / 10** minutos. Se observará que el precipitado proteico forma un pellet.

Precipitación del ADN

1. Pasar el sobrenadante que contiene el ADN a un tubo de **1.5 ml** que contenga **600 μ l de isopropanol** y a un tubo de **15 ml** que contenga **6 ml de isopropanol**. Mezclar por inversión varias veces.
2. Centrifugar a **14.000 x g / 2.500 x g** durante 3 minutos.
3. Eliminar el sobrenadante. Añadir **600 μ l / 6 ml** de etanol 70% e invertir varias veces para lavar el pellet de ADN.
4. Centrifugar a **14.000 x g / 2.500 x g** durante 2 minutos. Cuidadosamente eliminar todo el etanol. Vigilar no perder el pellet de ADN
5. Invertir el tubo y dejar secar en papel absorbente durante 15 minutos.

Hidratación del ADN

1. Añadir **100 μ l / 500 μ l** de **Solución de Hidratación del ADN**.
2. Incubar a 65°C durante 1 hora con periódicas agitaciones para ayudar a la dispersión del ADN, o incubar "overnight" a temperatura ambiente o 4°C con agitación para que se rehidrate.
3. Conservar a 2-8°C. Para almacenajes largos conservara -20°C o -80°C.

Tabla de volúmenes de reactivos escalados a partir de 1-2 millones de células hasta 500 millones de células

	1-2	3-5	10	20	30-50	100	500
Número de células	millones	millones	millones	millones	millones	millones	millones
Tamaño del tubo	1.5 ml	1.5 ml	15 ml	15 ml	15 ml	50 ml	250 ml
Solución de lisis	0.3 ml	0.6 ml	1.5 ml	3.0 ml	6.0 ml	15 ml	75 ml
RNasa (μ l)	1.5	3.0	7.5	15	30	75	375
Sol.Precip.Proteínas	0.18 ml	0.36 ml	0.9 ml	1.8 ml	3.6 ml	9 ml	45 ml
Isopropanol	0.3 ml	0.6 ml	1.5 ml	3.0 ml	6.0 ml	15 ml	75 ml
Sol.Hidrat.ADN (μ l)	10-30	30-100	50-150	100-200	200-300	500	2500

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 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.

