



## DANAGENE SPIN MINIPREP KIT

REF.0702.1 250 MINIPREPS

REF.0702.2 1000 MINIPREPS

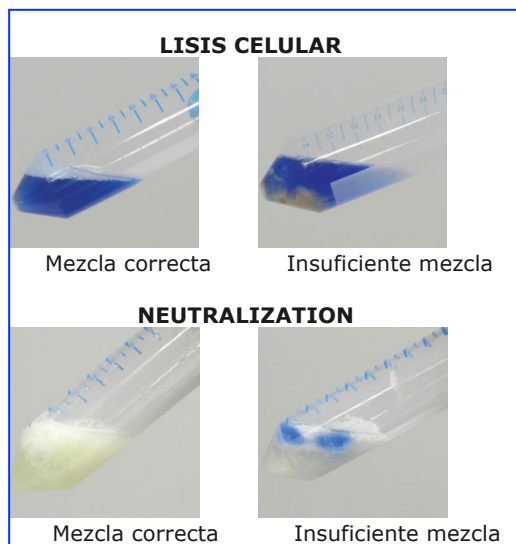
### 1. INTRODUCCION

Este kit está designado para una rápida extracción y purificación de **ADN plasmídico a partir de cultivos de E.coli por medio de MiniSpin columnas.**

El método descrito emplea una lisis alcalina modificada y **columnas con membranas de fibra de sílica** que unen selectivamente el ADN plasmídico en presencia de sales caotrópicas. El ADN plasmídico es purificado con varios pasos de lavado para eliminar las impurezas y finalmente eluido.

Introduce el **TrueBLUE Lysis control reagent** un indicador de color que proporciona una identificación visual de una óptima mezcla de los tampones. Previene errores que conducen a una eficiente lisis celular o un incompleta precipitación del SDS, ADN genómico o restos celulares. Esto es ideal para investigadores que no tienen mucha experiencia con la preparación de plásmidos y para investigadores con experiencia que desean asegurar un máximo rendimiento.

**Visualización de una eficiente lisis celular y precipitación del SDS utilizando el TrueBLUE Lysis control reagent**



### Características:

- **Purifica ADN plasmídico en tan solo 15 minutos.**
- **Conveniente:** MiniSpin columnas con membrana de sílica.
- **Tamaño del plásmido:** 1-15 kb.
- **Elevado Rendimiento:** Hasta 20 µg.
- **Volumen muestra:** 1.5-3.0 ml de cultivos bacterianos.

## 2.COMPONENTES KIT

	Ref. 0702.1 250 preps	Tª
Solución de Resuspensión	65 ml	Tª ambiente
Solución de Lisis	65 ml	Tª ambiente
Solución de Neutralización / Unión	90 ml	Tª ambiente
Solución de Lavado	2x35 ml	Tª ambiente
Tampón de Elución	50 ml	Tª ambiente
RNasa	10 mg	4°C
TRUEBLUE Lysis control reagent	750 µl	Tª ambiente
Spin Columns	250 unid.	Tª ambiente
Tubos de Recogida	500 unid.	Tª ambiente

Equipos y reactivos necesarios no incluidos en el kit:

- \* Etanol 100 %.
- \* Microtubos de 1.5 ml
- \* Microcentrifuga.

## 3. PROTOCOLO GENERAL

### 3.1 Consideraciones preliminares

- Varios factores pueden influir en la obtención del ADN plasmídico. Estos incluyen el número de copias de vector, el inserto de ADN, la cepa huésped, condiciones de crecimiento y el medio.
- El uso de cepas huésped que contiene una mutación en el gen Endonucleasa I (end A) son recomendables, tales como JM109, DH5alpha, DH10B, XL1-Blue. Extracción de ADN con cepas que contienen el producto del gen endonucleasa I, tales como HB101 y MC106, pueden producir muestras con trazas de endonucleasas, por tanto, estas cepas deberían evitarse. Si es necesario utilizar estas cepas pónganse en contacto con el servicio técnico de DanaGen-BioTed que les facilitará un protocolo adicional.

### 3.2 Preparaciones preliminares

- **ATENCIÓN:** La Solución Neutralización/ Unión contiene guanidine hydrochloride que es un agente irritante, por lo que se recomienda el uso de guantes y gafas de seguridad para su manipulación
- La Solución de Resuspensión ya contiene RNasa. El kit incluye un vial extra de RNasa para aquellos usuarios en los que se hace necesaria una mayor cantidad de esta enzima para obtener un plasmídico libre de contaminaciones de RNA. Así, en caso de ser necesario, disolver el polvo de RNasa en la solución de resuspensión, luego almacenar a **4°C**. Esta solución así preparada es estable durante 6 meses.
- Verificar que la Solución de Lisis no tiene SDS precipitado debido a las bajas temperaturas. Si es necesario, disolver el SDS calentando a 37°C.
- **Añadir 140 ml de Etanol 100 % a la Solución de Lavado.** Mantener el envase bien cerrado para evitar la evaporación del etanol.
- La elución se puede llevar a cabo a temperatura ambiente aunque el rendimiento puede ser incrementado un 20 % **si el Tampón de Elución es calentado a 55°C.**

### **3.3 Protocolo de extracción de ADN plasmídico a partir de cultivos de 1-3 ml**

1. Centrifugar **1.5 ml** de un cultivo "overnight" de E.coli a  $> 12.000 \times g$  durante 60 segundos. Eliminar el sobrenadante por aspiración sin tocar el pellet. Se puede repetir la recolección de 1.5 ml del cultivo en el mismo microtubo.

**NOTA:** Se recomienda el uso de cultivos bacterianos con una  $DO_{600} = 2-6$  unidades. No utilizar cultivos bacterianos sobrecrecidos ( $< 16$  horas de incubación a  $37^{\circ}C$  con agitación). Utilizar sólo cultivos frescos.

2. **Resuspender el pellet en 250  $\mu$ l de Solución de Resuspensión + 2.50  $\mu$ l de TRUEBLUE Lysis control reagent mediante agitación con vortex o pipeta,** asegurándose de la completa resuspensión de las células.

**NOTA:** Preparar suficiente Solución de Resuspensión EP01/ TRUEBLUE Lysis control reagent para el número de minipreps que se han de realizar. Se formará un precipitado después de la adición del TRUEBLUE lysis control reagent que no afectará. Agite para su disolución.

3. **Lisar las células con 250  $\mu$ l de Solución de Lisis .** Suavemente invertir el tubo 8- 10 veces hasta que la mezcla aparezca clara y viscosa. **No utilizar vortex.** Se puede incubar 3 minutos, pero nunca más de 5 minutos.

4. **Neutralizar añadiendo 350  $\mu$ l de Solución de Neutralización / Unión .** Suavemente invertir el tubo 8-10 veces. Se recomienda la incubación durante 5 minutos en hielo.

5. **Centrifugar a máxima velocidad en una microcentrifuga durante 5 minutos.** Si hubiera partículas flotando en el sobrenadante, volver a centrifugar.

6. **Cuidadosamente pasar el sobrenadante a una Spin microcolumna con su tubo de recogida.**

7. **Centrifugar a máxima velocidad durante 30- 60 segundos.** Sacar la Spin microcolumna del tubo de recogida y colocar en un nuevo tubo de recogida.

8. **Añadir 600  $\mu$ l de Solución de Lavado en el reservorio de la spin microcolumna. Centrifugar a máxima velocidad durante 60 segundos.** Eliminar el líquido.

9. **Realizar un 2º lavado. Añadir 600  $\mu$ l de Solución de Lavado en el reservorio de la spin microcolumna. Centrifugar a máxima velocidad durante 60 segundos.** Eliminar el líquido.

10. **Centrifugar a máxima velocidad durante 3 minutos para eliminar el etanol residual.**

11. Insertar la spin microcolumna en un microtubo de 1.5 ml nuevo. **Añadir 50- 100  $\mu$ l de Tampón de elución en el reservorio de la spin microcolumna.**

12. **Incubar 1 minuto.** Se recomienda que el tampón esté a  $55^{\circ}C$ .

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

## 4. GUIA DE PROBLEMAS Y POSIBLES SOLUCIONES

### 1. Baja o negativa obtención de DNA:

- 1.1. **Debido a un número insuficiente de células:** Posiblemente el cultivo sea viejo. Preparar un cultivo nuevo. Confirmar la densidad celular.
- 1.2. **Debido a una pobre replicación del plásmido:** Confirmar que las células fueron crecidas en un medio apropiado bajo óptimas condiciones.
- 1.3. **Debido a una insuficiente actividad del antibiótico:** Muchos antibióticos son sensibles a la luz y se degradan en almacenamientos prolongados a 2-8 °C.
- 1.4. **Debido a una lisis alcalina prolongada:** Reducir el tiempo de la lisis.
- 1.5. **Debido a una precipitación de los desechos celulares incompleta:** Reducir el volumen inicial de cultivo.
- 1.6. **Debido a una lisis incompleta:** Reducir el volumen inicial de cultivo o Incrementar el tiempo de lisis

### 2. DNA contaminado o de baja calidad:

- 2.1. **DNA genómico:** La mezcla de los lisados bacterianos ha sido efectuada demasiado vigorosamente. No utilizar vortex. No utilizar cultivos que han crecido más de 24 h.
- 2.2. **DNA degradado y genómico:** Evitar que no pase ninguna partícula del lisado al sobrenadante.
- 2.3. **ARN:** La digestión con RNAsa fue insuficiente. Confirmar que se ha añadido la RNAsa a la solución EP01. Si la solución EP01 tiene más de 6 meses, se recomienda añadir más RNAsa.
- 2.4. **Nucleasas:** Confirmar que las soluciones no tienen nucleasas

### 3. Baja A260/280 del DNA purificado:

- 3.1. **La purificación es incompleta debido a una gran cantidad de DNA:** Reducir el volumen inicial del cultivo celular.

### 4. Dificultad para redissolver el DNA plasmídico:

- 4.1. **El pellet fue sobreseco:** Secar al aire y calentar el TE o agua estéril a 60-70°C.
- 4.2. **pH bajo:** Verificar que el pH del TE es >8.0.
- 4.3. **Volumen de resuspensión demasiado bajo.**

### 5. Bandas adicionales de plásmido.

- 5.1. **El DNA plasmídico desnaturalizado aparece como una banda por debajo del DNA superenrollado:** No permitir que la reacción de lisis sobrepase los 3 minutos.

Recomendamos ponerse en contacto con el servicio técnico del laboratorio **DANAGEN-BIOTED S.L** para cualquier consulta adicional respecto a los protocolos de trabajo o problemas que puedan surgir durante el trabajo.