



## 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.
- **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 proteinasa 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 Columnas	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 proteinasa 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 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  $-20^{\circ}\text{C}$ . 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  $70^{\circ}\text{C}$  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  $\mu\text{l}$  incrementará la concentración final de ADN en el eluido pero reducirá el rendimiento global de ADN obtenido. Para muestras que contenga  $< 3 \mu\text{g}$  ADN, se recomienda una elución en 100  $\mu\text{l}$ . Para muestras que contenga  $< 1 \mu\text{g}$  ADN, se recomienda una elución en 50  $\mu\text{l}$ .**

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

- 200  $\mu\text{l}$  sangre total.
- 200  $\mu\text{l}$  "buffy coat".
- $10^4$ -  $10^6$  células en cultivo.

Si el material no llega a 200  $\mu\text{l}$  llevar el volumen final de la muestra a 200  $\mu\text{l}$  con agua libre de nucleasas.

1. A 200  $\mu\text{l}$  del material indicado añadir **200  $\mu\text{l}$  del Tampón de Lisis/ Unión + 20  $\mu\text{l}$  Proteinasa K**. Mezclar bien. Incubar a  $70^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos.

2. Añadir **100  $\mu\text{l}$  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 homogenizador tipo Polytron.*
2. Añadir **200 µl de Tampón de Lisis/Unión.** 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 por 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**. 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**. 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 a 13000-16000 x g durante 2 minutos 1.5-3 ml de cultivo de levadura. Eliminar el sobrenadante. **Resuspender el pellet en 293 µl de EDTA 50 mM y 7.5 µl de Lyticasa** (75 unidades/ µl) SIGMA ref.L2524. **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.** Vortex. Incubar a 55°C hasta que la lisis se complete.
2. Añadir **200 µl de Tampón de Lisis/Unión.** 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)