

5. Agregue 100 µL de mezcla de extracción recién preparada a cada muestra y agite las muestras.
6. Incube los tubos durante 1 hora a 60 ° C y agite brevemente los tubos utilizando un vórtex cada 10-15 minutos.

Nota: Continúe con las columnas de equilibrado para la purificación de ADN (paso 1-4 del protocolo de purificación de ADN) durante este paso de incubación de 1 hora.

7. Agite los tubos utilizando el vórtex y centrifugue durante 1 min a 10.000 x g. Después de este paso, las muestras están listas para ser introducidas en la columna de purificación, previamente equilibrada (paso 5 del protocolo de purificación de ADN).

Nota: Para facilitar el pipeteo del sobrenadante, las muestras deben recolectarse inmediatamente después de la centrifugación. Es aconsejable trabajar con lotes de 8 muestras.

Purificación de ADN

1. Colocar las columnas / placa de purificación de ADN conjunto con los tubos / placa de recolección de desechos.
2. Agregue 350 µL de solución de equilibración a cada columna / pocillo por cada extracto de ADN crudo que se purifique.
3. Deje reposar a temperatura ambiente durante 5 min y después centrifugue durante 1 min a 350-500 x g.
4. Deseche los tubos / placa de recolección de desechos y coloque la (s) columna (s) de purificación de ADN en la (s) columna (s) de recolección de ADN / placa.
5. Transfiera 100 µL de cada extracto de ADN (paso 7 del protocolo de extracción de ADN) a la columna / placa de purificación de ADN previamente equilibrada.

Nota: Tenga cuidado, trate de no alterar el pellet. Consulte la nota en el paso 7 del protocolo de extracción de ADN.

6. Deje reposar la columna / placa de purificación de ADN durante 3 min a temperatura ambiente.
7. Centrifugue 1 min a 700 x g.
8. El flujo capturado por el tubo / placa de recolección de ADN contiene ADN purificado listo para realizar una PCR en tiempo real o almacenamiento.

Nota: Diluya el ADN antes de proceder a realizar la PCR en tiempo real (consulte el protocolo RT-F-D-0901/0902). Almacene el ADN entre 4-8 ° C durante no más de varios días. Para almacenamiento a largo plazo, manténgalo a -20 ° C o menos.

Avisos y exenciones de responsabilidad

A pesar del máximo cuidado en el desarrollo y preparación de este protocolo, ClearDetections no puede asumir ninguna responsabilidad por errores, omisiones y / o cambios futuros en este documento.

Este kit está diseñado exclusivamente para uso general en laboratorio e investigación. Para conocer los avisos legales y la exención de responsabilidad, visite el sitio web, www.cleardetections.com, o comuníquese con ClearDetections en info@cleardetections.com.



Kit de extracción y purificación de ADN de tejido de la planta de banano

EX-P-T/P-NDEP

Exclusivo para uso general en laboratorio e investigación

Introducción

Este kit de extracción y purificación de ADN de plantas de ClearDetections está diseñado para extraer y purificar el ADN del tejido de la planta de banano. El kit extrae y separa el ADN de proteínas, detergentes y compuestos de bajo peso molecular. El ADN purificado es adecuado para fines de diagnóstico, incluyendo la detección de *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* Raza Tropical 4 (RT4) utilizando el kit de diagnóstico ClearDetections Foc RT4 PCR en tiempo real para el tejido de la planta de banano (RT-F-D-0902).

El kit de extracción y purificación de ADN de plantas de ClearDetections está disponible en formato de tubo o placa. Este manual se aplica a ambos casos, pero contiene notas específicas para cada formato.

Le recomendamos que lea todo el manual antes de iniciar el procedimiento. No dude en contactarnos en info@cleardetections.com si tiene preguntas sobre este protocolo, la configuración del laboratorio o las especificaciones del equipo.

Componentes del kit, condiciones de almacenamiento y vida útil

Componentes	Código	Almacenamiento
Tampón de extracción de ADN	PEB	4 °C
Proteasa	PR	4 °C
Solución de homogeneización	HS	4 °C
Solución de equilibrio	ES	4 °C
ARNasaA	RNA	4 °C
DTT	DTT	4 °C (-20 °C tras el primer uso)
SDS	SDS	15-30 °C
Purificación de ADN en columna / placa	PWC/PWP	15-30 °C
Extracción de ADN en tubo / placa	DCT/DCP	15-30 °C

Nota: Durante el envío, todos los componentes del kit son estables a temperatura ambiente. Después de su llegada, almacene los componentes en consecuencia.

Reactivos y equipamiento suministrado por el usuario

- Vórtex
- Centrifuga para tubos de 1,5 mL y 2,0 mL y / o para placas de 96 pocillos
- Tubos de microcentrifuga para preparación de muestras
- Incubadora de temperatura controlada / bloque de calor o baño de agua
- Pipetas y puntas con filtro para volúmenes de 5-1000 µL
- Batidor de perlas y perlas de acero inoxidable (2-3 mm de diámetro) o maja y mortero
- Opcional: nitrógeno líquido

Preparación de la muestra

El muestreo del tejido del banano es un paso crucial que tiene una gran influencia en el éxito de los procesos posteriores, como la detección de Foc RT4 mediante PCR en tiempo real. Para el diagnóstico de Foc RT4, use 250 mg de tejido venoso aislado manualmente de la hoja interna del pseudotallo o 250 mg de tejido del corno (donde la infección es más pronunciada).

Extracción de ADN

Nota: Antes de comenzar este procedimiento, asegúrese de tener suficiente tiempo para concluir la extracción y purificación del ADN de una sola vez. Una vez completada la extracción, el ADN debe purificarse inmediatamente para evitar su posible degradación. Después de la purificación, el ADN se puede almacenar de forma segura a -20°C.

1. Precaliente la incubadora o el baño de agua a 60 °C.
2. Prepare una mezcla de homogeneización suficiente para todas las muestras:

Mezcla de homogeneización	Por muestra (µl)	x 10 muestras*
Solución de homogeneización	185	2035
DTT	3	33
ARNasa	12	132

* Al calcular el volumen de la mezcla de homogeneización, recomendamos aumentar el número de muestras aproximadamente un 10% para compensar por posible error de pipeteo.

3. Para continuar con la extracción de ADN usando un homogeneizador tipo bead beater, vaya a la sección A. Para continuar con la extracción de ADN usando maja y un mortero, vaya a la sección B

A. Molienda con bead beater y beads de acero inoxidable:

1. Transfiera hasta 250 mg de tejido de planta de banano a un tubo de 2.0 mL y agregue 1 o 2 beads.

Nota: para aumentar la eficiencia de la extracción de ADN, la trituración del tejido vegetal se puede realizar en nitrógeno líquido. Para ello, enfríe los tubos que contienen material vegetal en nitrógeno líquido antes de la molienda con beads. Asegúrese de que la tapa esté bien cerrada para evitar que el nitrógeno líquido entre en el tubo.

2. Muela durante 1 minuto a 30 Hz en el batidor de cuentas. A continuación, centrifugue brevemente (5 segundos) para asegurarse de que todo el material esté en el fondo del tubo, de modo que la tapa se pueda abrir sin perder la muestra.
3. Añada 200 µL de mezcla de homogeneización recién preparada y vuelva a triturar durante 1 minuto a 30 Hz en el batidor de perlas. A continuación, centrifugue brevemente (5 segundos).

Nota: Durante este paso, no vuelva a congelar las muestras en nitrógeno líquido. La muestra, incluido el tampón, no debe congelarse, ya que esto bloquearía el movimiento eficiente de las beads.

4. Continúe con el punto 4 del procedimiento de extracción de ADN.

B. Molienda con maja y mortero:

1. Transfiera hasta 250 mg de tejido vegetal de banano a un mortero.

Nota: para aumentar la eficiencia de extracción de ADN, la trituración del tejido vegetal se puede realizar en nitrógeno líquido. Para ello, enfríe el mortero con nitrógeno líquido antes de moler. Después de agregar el tejido de la planta de banano, agregue suficiente nitrógeno líquido para congelar su muestra y muela vigorosamente el tejido de la planta con un mortero.

2. Agregue 200 µL de mezcla de homogeneización recién preparada y triture el tejido vegetal vigorosamente con un mortero.

Nota: No agregue nitrógeno líquido después de agregar el tampón.

3. Transfiera el contenido del mortero a un tubo Eppendorf de 1,5 mL, compatible con el bloque térmico.

Nota: Tenga cuidado de no transferir nitrógeno líquido al tubo cuando transfiera la muestra. Si sucede, deje que el nitrógeno líquido se evapore antes de cerrar el tubo.

4. Prepare una mezcla de extracción suficiente para todas las muestras:

Mezcla de extracción	Por muestra (µl)	x 10 muestra*
Tampón de extracción de ADN	70	770
Proteasa	20	220
SDS	10	110

* Al calcular el volumen de la mezcla de extracción, recomendamos aumentar el número de muestras aproximadamente un 10% para compensar por posible error de pipeteo.