

## Extracción de ADN vegetal

23/02/2018

v. 3.0

FP

Protocolo de extracción de ADN vegetal con el *Genelute Plant Genomic DNA Miniprep kit* de Sigma-Aldrich (Ref. G2N70). Si el kit es nuevo es necesario preparar (diluir con etanol) la *wash solution*.

Equipos necesarios	Material
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Molino de bolas</li> <li>• Vórtex</li> <li>• Baño calefactado</li> <li>• Microcentrífuga</li> <li>• Congelador</li> <li>• Nanodrop (para cuantificar)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kit de extracción</li> <li>• Adaptadores molino de bolas</li> <li>• Bolas (acero) para el molino</li> <li>• Pipetas (P200; P1000)</li> <li>• Puntas azules (P1000) y amarillas (P200)</li> <li>• Tubos eppy de 1.5 y 2 ml</li> <li>• Gradillas flotantes y normales</li> <li>• Hielo</li> <li>• Cronómetro</li> <li>• Etiquetas para los eppys</li> <li>• Gradilla/caja de congelación</li> </ul>

## Pasos a seguir

**1.** Preparación del material vegetal. Introducir en tubos de 2 ml:

- Unos 65 mg de material vegetal (si se trata de hojas secas)
- Unos 100 mg de material vegetal (si se trata de material fresco)

Esto va a ser opcional. Para mayor rapidez se pueden introducir unas cuantas hojas por tubo.

En cada tubo se colocarán 2 bolitas de acero y se introducirán en los adaptadores para el molino de bolas.

**2.** Precalentar un baño a **65°C**. Introducir en él la **Elution Solution**. Comprobar los reactivos, de modo que si alguno ha formado precipitados, calentarlo en el baño hasta que estos desaparezcan y luego dejarlo enfriar a temperatura ambiente.

**3.** Colocar los adaptadores con los tubos en el molino de bolas y agitar **1 minuto** a 25 rps, aproximadamente. Repetir si es necesario, hasta que todo el material esté molido.

**4.** Añadir a cada tubo 350 µl de **Lysis Solution [Part. A]**, agitar con el dedo para que se mezcle bien.

**5.** Añadir, entonces, 50 µl de **Lysis Solution [Part. B]**, vortear vigorosamente e invertir varias veces.

**6.** Incubar a 65°C durante **15 minutos**.

Invertir suavemente los tubos varias veces cada **5 minutos**, para disolver el precipitado que se formó en el paso anterior.

**7.** Añadir **130 µl** de **Precipitation Solution**, mezclar por inversión e incubar **5 minutos** en hielo. A continuación, centrifugar a máxima velocidad durante **5 minutos**.

**8.** Colocar los tubos con las columnas azules en la gradilla y añadir a cada uno de ellos el sobrenadante obtenido, pipeteando con cuidado para no remover el fondo e intentando no llevarnos restos vegetales. Centrifugar a máxima velocidad **1 minuto**.

NOTA: Los tubos donde están los restos vegetales debemos conservarlos, puesto que dentro llevan las bolitas de acero que serán reutilizadas.

- 9.** Colocar los tubos con las columnas rojas en la gradilla y añadir a cada uno **550 µl** de **Column Preparation Solution**. Centrifugar a **12.000 rpm 1 minuto**. Descartar el eludido.
- 10.** Sacar la columna azul para desecharla y añadir a cada tubo **700 µl** de **Binding Solution**. Mezclar inmediatamente por inversión.
- 11.** Pipetear cuidadosamente **700 µl** de la mezcla anterior y añadirlos a los tubos con la columna roja. Centrifugar a máxima velocidad **1 minuto**. Desechar el eludido, volver a colocar la columna y repetir con el remanente del paso anterior.
- 12.** Añadir **500 µl** de **Wash Solution** y centrifugar a máxima velocidad durante **3 minutos**. Descartar el eludido y repetir la operación otra vez, secando, finalmente, cualquier fluido que quede adherido a la columna.
- 13.** Colocar la columna roja en un tubo de 1,5 ml. (*Se puede centrifugar de esta manera 1 minuto, para eliminar restos de Wash Solution que pudieran quedar*). Añadir **50 µl** de **Elution Solution** (precalentado a 65°C) a la columna, incubar **5 minutos** y centrifugar a máxima velocidad **1 minuto**. Repetir esta operación una vez más.  
*Si, por algún motivo, sabemos que podemos tener poca cantidad de ADN, una opción es añadir menor cantidad de Elution Solution en la primera alícuota (a), para que así esté más concentrado.*
- 14.** Etiquetar correctamente y guardar en el **congelador** si no se va a cuantificar en el momento.

La etiqueta debe indicar, al menos, los códigos del espécimen, la fecha, las iniciales de la persona que realizó el procedimiento y la concentración. No utilizar rotuladores cuya tinta pueda perder legibilidad con la humedad.

Ejemplo de etiqueta:

Em21-11-78	-----	indica Especie (Em) y población (21) – año de colecta (2011) – individuo (78)
15/02/2018/FP	-----	fecha de la extracción e iniciales del técnico
20 ng/µl	-----	concentración

## Observaciones