

REAL SPIN DTR

Ref. RBMS01 50 Preps.

1. INTRODUCCIÓN

Las Real Spin DTR son microcolumnas cromatográficas ya preparadas y listas para su uso, para obtener una rápida purificación y “clean-up” de ácidos nucleicos y proteínas utilizando una microcentrifuga.

Para la purificación se utiliza el método de filtración en gel, en el cual las moléculas en solución son separadas de acuerdo con sus diferencias de tamaño al pasar por una microcolumna empaquetada con un medio chromatográfico, en forma de gel. El gel es una fase heterogénea en el cual una fase líquida acuosa se encuentra dentro de los poros de una fase sólida, estos poros tienen un rango de tamaño controlado según la matriz en gel utilizada.

Las moléculas pequeñas pueden difundir a través del gel y son retrasadas en su paso hacia abajo de la columna. Por el contrario, las moléculas grandes no pueden difundir a través del gel y dejan la columna rápidamente seguido de moléculas más pequeñas por orden de sus tamaños.

1. INTRODUCTION

Real Spin DTR are ready to use chromatographic microcolumns to obtain a fast purification and clean up of nucleic acids and proteins with the use of a microcentrifuge.

For the purification it uses the filtration in gel method, in which the molecules in solution are separate according to their different sizes when they pass through a microcolumn that has been packed with a chromatographic medium, in a gel form. The gel is an heterogeneous phase in which a watery liquid stage is inside the pores of a solid stage. These pores have a controlled range of size according to the matrix gel used.

Small molecules diffuse through the gel and are delayed on their way down the column. On the opposite, big molecules can not diffuse through the gel and leave quickly the gel followed by smaller molecules in order of size.

Sistema de producción certificado bajo norma ISO



AENOR



Empresa Registrada

ER-0989/2/98

Production system certified under ISO



AENOR



Empresa Registrada

ER-0989/2/98

2. COMPONENTES DEL KIT KIT COMPONENTS

	Ref.	Ref. RBMS01 50 preps	T ^a
Microcolumnas DTR <i>DTR micocolumns</i>	RSDTR	50 unid.	4°
Tubos de Lavado <i>Wash Tubes</i>	R40	50 unid.	RT
Tubos de Recogida <i>Collection Tubes</i>	R30	50 unid.	RT

Equipos y reactivos necesarios no incluidos en el kit:

* Microcentrifuga.

Equipment and additional reagents required

* *Microcentrifuge.*

3. PROTOCOLO GENERAL GENERAL PROCEDURE

3.1 Especificaciones

- Aplicaciones:** Eliminación de “dideoxy terminators” y nucleótidos “dye-labelled” no incorporados en reacciones de secuenciación previo al análisis en secuenciadores automáticos
- Gel Matriz:** Grado especial de poliacrilamida
- Colorantes eliminados:** 98 % de retención
- Big Dye terminators, Rodamina y d-rodamina, Well RED dye.
- Capacidad:** 10-75 µl
- Tiempo:** 4 minutos
- ADN recuperado:** 95 % de ADN > 22 pb
- Tampón:** Agua destilada

3.1. Specifications

- Applications:** Removal of “dideoxy terminators” and “dye-labelled” nucleotides not incorporated in sequencing reactions before the analysis in automatic sequencers
- Gel Matrix:** Special polyacrylamide grade
- Removed Dyes:** 98 % of retention
- Big dye terminators, Rodamine and d-rodamine, Well RED dye.**
- Capacity:** 10-75 µl
- Time:** 4 minutes
- Recovered DNA:** 95 % DNA > 22 pb
- Buffer:** Distilled water

3.2 Protocolo de trabajo

- Resuspender la resina de la Real Spin DTR por inversión varias veces o agitar mediante vortex cuidadosamente.
- Eliminar el tapón inferior y superior y colocar en un microtubo de 2.0 ml de lavado.
- Centrifugar 2 minutos en una microcentrifuga a 750 xg para eliminar el tampón de equilibrio.
- Colocar la Real Spin DTR en el microtubo de 1.5 ml de recogida de muestra.
- Cuidadosamente aplicar la muestra (10-75 µl) directamente en el centro de la columna sin dañar el gel.
- Centrifugar 2 minutos a 750 xg. La muestra purificada es recogida en el microtubo de 1.5 ml de recogida. **Las moléculas más pequeñas**

del límite de exclusión serán retenidas en la Real Spin DTR.

* Todas las centrifugaciones se realizan a 750xg en una microcentrifuga convencional. La velocidad apropiada para cada microcentrifuga puede ser calculada según la fórmula siguiente:

$$\text{rpm} = 1000 \times (750 / 1.12 r)^{1/2}$$

Donde r = radio del rotor en mm

3.2 Working Protocol

1. Dissolve the DTR Real Spin resin by turning the tube upside down several times or shake carefully with vortex.
2. Remove the lower and upper caps and place in a 2.0 ml washing tube.
3. Centrifuge for 2 minutes in a microcentrifuge at 750 xg to remove the equilibration buffer.
4. Place the DTR Real Spin in a 1.5-ml sample collecting tube.
5. Carefully, apply the sample (10-75 µl) directly on the centre of the column without damaging the gel.
6. Centrifuge for 2 minutes at 750 xg. The purified sample is collected in the 1.5 ml collecting microtube. **Molecules smaller than**

the exclusion size will be retained in the DTR Real Spin.

*** All the centrifugations are done at 750 xg in a conventional microcentrifuge. The correct speed for each microcentrifuge can be calculated with the following formula:**

$$\text{rpm} = 1000 \times (750 / 1.12 r)^{1/2}$$

Where r = motor radius in mm

4. GUIA DE PROBLEMAS Y POSIBLES SOLUCIONES **TROUBLESHOOTING**

1. **Resultados pobres:**
 - 1.1. **Elevada velocidad de centrifugación.** Es muy importante establecer la velocidad de centrifugación adecuada. Si se aplica una velocidad mayor no se formará la matriz en gel de manera correcta.
 - 1.2. **Colocación de la muestra incorrectamente.** Se ha de evitar tocar el gel con la punta de la micropipeta.
 - 1.3. **Colocación de la Real Spin DTR incorrectamente.** Al realizar la primera centrifugación se forma el gel matrix con un parte superior inclinada. La Real Spin DTR se colocará en el rotor con esta parte inclinada tocando el exterior del rotor.
2. **Dilución de la muestra**

Debido a aplicar una velocidad más baja de la indicada, de forma que no se eliminará todo el tampón de equilibrio y en el segundo paso de centrifugación será recogido con la muestra y se producirá una dilución de la muestra.

Para evitar errores al establecer la velocidad de trabajo se recomienda que la primera vez que se trabaje con las Real Spin DTR, se realice una centrifugación corta de 30-60 segundos después de la centrifugación del paso 3 del protocolo. Si se observa más cantidad de tampón será necesario aumentar levemente la velocidad, o bien, aumentar el tiempo de centrifugación en el paso 3.

Tal y como se recomienda en el protocolo, la velocidad adecuada son 750 xg; con estas condiciones no debe encontrarse problemas en este sentido
1. **Poor results**
 - 1.1. **High centrifugation speed.** It is very important to set the correct centrifugation speed. If a higher speed is applied, the matrix gel will not be formed in the correct way.
 - 1.2. **The sample has been placed incorrectly.** You must avoid touching the gel with the micropipette end.
 - 1.3. **The DTR Real Spin has been placed incorrectly.** The gel matrix is formed in the first centrifugation, with its upper part leaned. The DTR Real Spin will be placed on the rotor with this leaned part touching the outside of the rotor.
2. **Sample dilution**

Due to the application of a lower speed than the one indicated, the equilibration buffer will be not totally removed and it will be collected in the second centrifugation step, producing the sample dilution.

To avoid mistakes when setting de work speed it is recommended to do a short centrifugation, for 30-60 seconds after step 3 of the protocol, the fist time you work with the DTR Real Spin DTR. If there is a higher buffer quantity, it will be necessary to increase the speed, or to increase the centrifugation time in step 3. As it is recommended in the protocol, the correct speed is 750 xg; you will not have problems if you follow these conditions.