

# REAL SPIN MINIPREP KIT

Ref. RBMEPS06: (para 250 EXTRACCIONES)  
Ref. RBMEPS07: (para 1000 EXTRACCIONES)

(for 250 EXTRATION)  
(for 1000 EXTRATION)

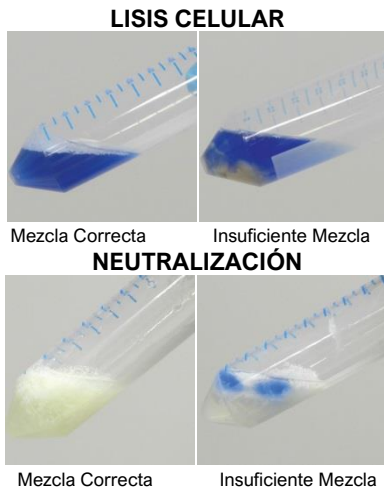
## 1.INTRODUCCIÓN

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 una 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.

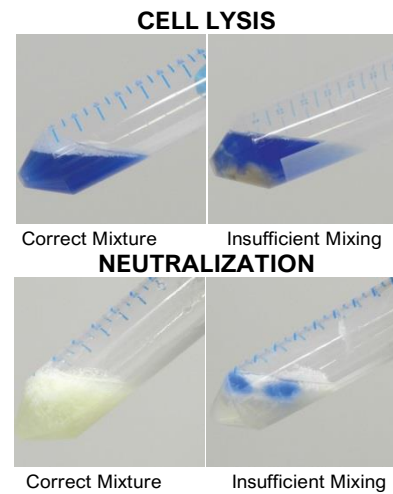
## 1.INTRODUCTION

This kit is designed for rapid extraction and purification of **plasmid DNA from *E.coli* cultures by means of MiniSpin columns.**

The method described employs a modified alkaline lysis and **columns with silica fiber membranes** that selectively bind plasmid DNA in the presence of chaotropic salts. Plasmid DNA is purified with several washing steps to remove impurities and finally eluted.

Introduces the **TrueBLUE Lysis control reagent**, a color indicator that provides visual identification of optimal buffer mixing. It prevents errors that lead to efficient cell lysis or incomplete precipitation of SDS, genomic DNA or cell debris. This is ideal for researchers who do not have much experience with plasmid preparation and for experienced researchers who want to ensure maximum throughput.

**Visualizing efficient cell lysis and SDS precipitation using the TrueBLUE Lysis control reagent**



### Features:

- **Purifies plasmid DNA in as little as 15 minutes.**
- **Convenient:** MiniSpin columns with silica membrane.
- **Plasmid size:** 1-15 kb.
- **High Yield:** Up to 20 µg.
- **Sample volume:** 1.5-3.0 ml of bacterial cultures.

## 2.COMONENTES DEL KIT / KIT COMPONENTS

Componentes REAL	Ref.	Envase (250 PREPS)	Envase (1000 PREPS)	Tª
Resuspension solution	E25	65 ml	260 ml	RT
Lysis solution	EP02	65 ml	260 ml	RT
Washing solution	EP08	2x35 ml	4x35 ml	RT
Neutralization/binding solution	EPS03	90 ml	360 ml	RT
True Blue lysis control	RBLR	750 µl	750 µl	RT
RNase	REA04	10 mg	40 mg	-20°C
Elution solution	REA05	50 ml	200 ml	RT
Columns Spin DNA	RSC04	250 unid.	1000 unid.	RT
CollectionTubes	R30	500 unid.	1000 unid.	RT

### Equipos y reactivos necesarios y no provistos

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

### Equipment and reagents needed and not provided

- \* Ethanol 100%
- \* Microcentrifuge
- \* 1.5 ml microtubes

## 3.PROTOCOLO GENERAL / 3.GENERAL PROCEDURE

### 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 **Neutralization/binding solution** 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 **Resuspension Solution** ya contiene **RNase**. El kit incluye un vial extra de **RNase** 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 **RNase** en la **Resuspension Solution**, luego almacenar a **-20°C**. Esta solución así preparada es estable durante 6 meses.
- Verificar que la **Lysis Solution** no tiene SDS precipitado debido a las bajas temperaturas. Si es necesario, disolver el SDS calentando a 37°C.

### 3.1 Preliminary considerations

- Several factors can influence the obtaining of plasmid DNA. These include vector copy number, DNA insert, host strain, growth conditions and medium.
- The use of host strains containing a mutation in the Endonuclease I (end A) gene are recommended, such as JM109, DH5alpha, DH10B, XL1-Blue. DNA extraction with strains containing the endonuclease I gene product, such as HB101 and MC106, can produce samples with traces of endonucleases, therefore these strains should be avoided. If it is necessary to use these strains, please contact DanaGen-BioTed technical support who will provide you with an additional protocol.

### 3.2 Preliminary Preparations

- **CAUTION:** The **Neutralization/Binding Solution** contains guanidine hydrochloride which is an irritant agent, therefore the use of gloves and safety goggles is recommended for handling.
- The **Resuspension Solution** already contains **RNase**. The kit includes an extra vial of **RNase** for those users who need a larger amount of this enzyme to obtain a plasmid free of RNA contamination. Thus, if necessary, dissolve the **RNase** powder in the **Resuspension Solution**, then store at **-20°C**. This solution thus prepared is stable for 6 months.
- Verify that the **Lysis Solution** does not have precipitated SDS due to low temperatures. If necessary, dissolve the SDS by heating to 37°C.

- **Añadir 140 ml de Etanol 100 % a cada una de las botellas de la Washing Solution.** 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 **Elution Solution 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 x 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 OD600= 2-6 unidades. No utilizar cultivos bacterianos sobrecrecidos (< 16 horas de incubación a 37°C con agitación). Utilizar sólo cultivos frescos.

2. **Resuspender el pellet en 250 µl de Resuspension Solution + 2.50 µl de TRUEBLUE Lysis control reagent** mediante agitación con vortex o pipeta, asegurándose de la completa resuspensión de las células.

**NOTA:** Preparar suficiente **Resuspension Solution 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 µl de Lysis Solution.** 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 350µl de Neutralization / Binding Solution.** 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 Columns Spin DNA con su tubo de recogida.**
7. **Centrifugar a máxima velocidad durante 30- 60 segundos.** Sacar la Spin microcolumna del **collection tube** y colocar en un nuevo **collection tube**.
8. **Añadir 600 µl de Washing Solution en el reservorio de la Columns Spin DNA.** Centrifugar a máxima velocidad durante 60 segundos. Eliminar el líquido.
9. **Realizar un 2º lavado. Añadir 600 µl de Washing Solution en el reservorio de la Columns Spin DNA.** 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 **Columns Spin DNA** en un microtubo de 1.5 ml nuevo. **Añadir 50- 100 µl de Elution Solution en el reservorio de la spin microcolumna.**
12. **Incubar 1 minuto.** Se recomienda que el tampón esté a 55°C.
13. **Centrifugar a máxima velocidad durante 60 segundos.** El microtubo contiene ahora el ADN plasmídico.

- **Add 140 ml of 100% Ethanol to each of the bottles of Washing Solution.** Keep the bottle tightly closed to prevent evaporation of the ethanol.
- Elution can be carried out at room temperature, although the yield can be increased by 20 % if the **Elution Solution is heated to 55°C.**

### **3.3 Protocol for extraction of plasmid DNA from 1-3 ml cultures**

1. Centrifuge **1.5 ml** of an overnight culture of E.coli at > 12,000 x g for 60 seconds. Remove the supernatant by aspiration without touching the pellet. 1.5 ml of the culture can be collected in the same microtube for repeat collection.

**NOTE:** The use of bacterial cultures with OD600= 2-6 units is recommended. Do not use overgrown bacterial cultures (< 16 hours incubation at 37°C with shaking). Use only fresh cultures.

2. **Resuspend the pellet in 250 µl Resuspension Solution + 2.50 µl TRUEBLUE Lysis control reagent by vortexing or pipetting,** ensuring complete resuspension of the cells.

**NOTE:** Prepare sufficient EP01/ TRUEBLUE Lysis control reagent **Resuspension Solution** for the number of minipreps to be performed. A precipitate will form after addition of TRUEBLUE lysis control reagent which will not affect. Shake to dissolve.

3. **Lyse the cells with 250 µl of Lysis Solution.** Gently invert the tube 8- 10 times until the mixture appears clear and viscous. **Do not vortex.** Incubate for 3 minutes, but never more than 5 minutes.
4. **Neutralize by adding 350µl of Neutralization / Binding Solution.** Gently invert the tube 8-10 times. Incubation for 5 minutes on ice is recommended.
5. **Centrifuge at maximum speed in a microcentrifuge for 5 minutes.** If there are particles floating in the supernatant, centrifuge again.
6. **Carefully transfer the supernatant to Columns Spin DNA with its collection tube.**
7. **Centrifuge at maximum speed for 30-60 seconds.** Remove the Spin microcolumn from the **collection tube** and place in a new **collection tube**.
8. **Add 600 µl of Washing Solution to the Columns Spin DNA reservoir. Centrifuge at maximum speed for 60 seconds.** Remove the liquid.
9. **Perform a 2nd wash. Add 600 µl of Washing Solution to the Columns Spin DNA reservoir. Centrifuge at maximum speed for 60 seconds.** Eliminate the liquid.
10. **Centrifuge at maximum speed for 3 minutes to remove residual ethanol.**
11. Insert the **Columns Spin DNA** into a new 1.5 ml microtube. **Add 50- 100 µl of Elution Solution into the spin microcolumn reservoir.**
12. **Incubate for 1 minute.** It is recommended that the buffer be at 55°C.
13. Centrifuge at maximum speed for 60 seconds. The microtube now contains the plasmid DNA.

## 4. ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

- Todos los componentes son estables durante 12 meses desde la fecha de la compra siendo almacenados como se indica.

## STORAGE AND STABILITY

- All components are stable for 12 months from date of purchase when stored as directed.

## 5. GUIA DE PROBLEMAS Y POSIBLES SOLUCIONES / TROUBLESHOOTING

### 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 sobresecado:** 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.

### 1. Low or negative DNA yield:

- 1.1. Due to insufficient number of cells:** possibly the culture is old. Prepare a new culture. Confirm cell density.
- 1.2. Due to poor plasmid replication:** Confirm that the cells were grown in appropriate medium under optimal conditions.
- 1.3. Due to insufficient antibiotic activity:** Many antibiotics are light sensitive and degrade in prolonged storage at 2-8°C.
- 1.4. Due to prolonged alkaline lysis:** Reduce the lysis time.
- 1.5. Due to incomplete precipitation of cell debris:** Reduce initial culture volume.
- 1.6. Due to incomplete lysis:** Reduce the initial culture volume or Increase the lysis time.

### 2. Contaminated or poor quality DNA:

- 2.1. Genomic DNA:** Mixing of bacterial lysates has been performed too vigorously. Do not use vortexing. Do not use cultures that have been grown for more than 24 h.
- 2.2. Degraded and genomic DNA:** Make sure that no particles pass from the lysate to the supernatant.
- 2.3. RNA:** Digestion with RNAsa was insufficient. Confirm that RNase has been added to the EP01 solution. If the EP01 solution is older than 6 months, it is recommended to add more RNAsa.

If the EP01 solution is older than 6 months, it is recommended to add more RNAsa.

- 2.4. Nucleases:** Confirm that the solutions are free of nucleases.

### 3. Low A260/280 of purified DNA:

- 3.1. Purification is incomplete due to a large amount of DNA:** Reduce the initial volume of the cell culture.

### 4. Difficulty to redissolve plasmid DNA:

- 4.1. pellet was over dried:** air dry and heat TE or sterile water to 60-70°C.
- 4.2. Low pH:** Verify that the pH of the TE is >8.0.
- 4.3. Resuspension volume too low.**

### 6. Additional plasmid bands.

### 7.

- 5.1. Denatured plasmid DNA appears as a band below the supercoiled DNA:** Do not allow the lysis reaction to exceed 3 min.

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

We recommend contacting the technical service of **DURVIZ S.L** laboratory for any additional questions regarding work protocols or problems that may arise during the work.

## 6.SIMBOLOS / SYMBOLS

	Número de catálogo / <i>Catalogue number</i>		Fabricante / <i>Manufacturer</i>
	Limitación de temperatura / <i>Temperature limitation</i>		Uso exclusivo en investigación / <i>Research use only</i>
	Fecha de caducidad / <i>Expiration date</i>		Irritante, sensibilizante y nocivo / <i>Irritant, sensitizing and harmful</i>
	Lote / <i>Lot</i>		Corrosivo / <i>Corrosive</i>
	Contiene suficiente para n pruebas / <i>Contains enough for n tests</i>		



B65699985