

K 1207-M10



MAXI ADN PuriPrep-P kit

Extracción y purificación rápida
de ADN plasmídico

USO EN INVESTIGACION
IN VITRO



Maxi ADN PuriPrep-P kit

Versión: 1.4
19/4/2024

Índice

| | |
|------------------------------------|----|
| Presentación | 6 |
| Importante | 6 |
| Componentes del kit..... | 6 |
| Condiciones de conservación..... | 7 |
| Garantía | 7 |
| Advertencia | 7 |
| Preparación de los reactivos | 8 |
| Protocolo..... | 9 |
| Solución de inconvenientes..... | 11 |
| Consideraciones de interés..... | 11 |

PRESENTACIÓN

Highway® Maxi ADN PuriPrep-P kit (K1207-M10) permite la extracción y purificación rápida y sencilla de ADN plasmídico a partir de cultivos bacterianos. Se obtiene un ADN puro, libre de proteínas y ARN, adecuado para su empleo en PCR, secuenciación, análisis de restricción, ligación. El producto final, eluido de una maxicolumna, se puede utilizar inmediatamente o ser conservado a -20°C . El proceso no requiere el empleo de solventes orgánicos ni fenol.

IMPORTANTE

Antes de dirigirse a la sección de **Protocolos** es importante leer las secciones **Condiciones de Conservación**, **Garantía**, **Advertencias** y **Preparación de los reactivos**.

COMPONENTES DEL KIT

Se presenta en una versión para 10 extracciones/purificaciones de ADN plasmídico.

| Catálogo | K1207-M10 |
|--|------------------|
| Cantidad de muestras | 10 |
| Maxicolumnas | 10 |
| Tubos colectores | 10 |
| Buffer de resuspensión (BR), ml (B0209) | 85 |
| Buffer de lisis (BL), ml (B0210) | 85 |
| Buffer de neutralización (BN), ml (B0211) | 120 |
| Buffer lavado 1 (BLav1), conc., ml (B0212) | 74 |
| Buffer lavado 2 (BLav2) conc., ml (B0213) | 24 |
| Buffer elución (BE), pH: 8.0, ml (B0205) | 28 |
| Agua de elución, pH: 8.0, ml (A0101) | 28 |

Buffer de elución (BE): 10 mM TrisHCl, 0,5 mM EDTA pH: 8.0
Agua de elución, estéril, libre de DNAsa y RNAasa, pH: 8.0

ADN PuriPrep-P kit

Materiales que aportará el usuario

Centrífuga con rotor para tubos de 50 ml; baño de incubación a 70°C, pipetas de 10 ml; tubos de 50 ml; etanol 96-100%.

CONDICIONES DE CONSERVACIÓN

Los componentes del kit **Highway® Maxi ADN PuriPrep-P (K1207-M10)**, buffers y columnas, deben conservarse a temperatura ambiente, excepto **BR** que por contener RNasa A es conveniente conservarlo a 4°C. Si la temperatura del laboratorio es muy baja puede aparecer un precipitado en el buffer BL; en ese caso llevarlo unos minutos a estufa a 37°C y agitar suavemente por rotación. El precipitado se disuelve.

GARANTÍA

Highway® Maxi ADN PuriPrep-P kit (K1207-M10) debe emplearse siguiendo las especificaciones y aplicaciones indicadas en el Manual de procedimientos provisto. El uso en aplicaciones no especificadas será responsabilidad del usuario quien deberá realizar la validación correspondiente. Cualquier falla que se produjera en el uso del kit, habiendo respetado los protocolos del fabricante, queda cubierta por garantía de **Inbio Highway**. En ese caso se reemplazará el kit por otro semejante.

Por otra parte, el fabricante atenderá toda duda planteada por el cliente, en el empleo del kit o interpretación del Manual.

ADVERTENCIAS

Algunos de los reactivos contienen sustancias caotrópicas y detergentes no iónicos. Se recomienda el uso de guantes de látex en el empleo de este kit, ya sea para evitar la contaminación de las muestras o para prevenir posibles irritaciones de la piel. No obstante, en caso de salpicaduras lavar con abundante agua y jabón. **Producto para investigación de uso *in vitro*.**

Maxicolumnas

A los fines de mantener sus propiedades selectivas respecto a la unión del ADN, y evitar la contaminación cruzada en el procesamiento de muestras múltiples, se recomienda:

- a) Trabajar con guantes de látex.
- b) No tocar la membrana del fondo de la columna con el tip cuando se agregan los reactivos. Cambiar de tip cada vez que toque las paredes de una columna, cuando se dispensan los reactivos seriadamente (varias muestras).
- c) Las centrifugaciones deben realizarse a temperatura ambiente (15-30°C) y los buffers de extracción y lavados deben estar también a esa temperatura. Se recomienda equilibrar a 70°C la alícuota del buffer de elución, para obtener mejor rendimiento en la elución del ADN.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

1. Buffer de lavado 1 (BLav1)

Se entrega **concentrado**. Requiere la adición de etanol (96-100%) en las cantidades indicadas a continuación:

| Tipo de kit | BLav1 conc. (ml) | Etanol (ml) | Vol. final (ml) |
|-------------|------------------|-------------|-----------------|
| 10 maxiprep | 74 | 46 | 120 |

Homogeneizar antes de usar.

IMPORTANTE: luego de agregar etanol al buffer BLav1, marcar una (X) en el casillero de la etiqueta, a la derecha del texto “**ADICIÓN DE ETANOL**”.

2. Buffer de lavado 2 (BLav2)

Se entrega **concentrado**. Requiere la adición de etanol (96-100%) en las cantidades indicadas a continuación:

| Tipo de kit | BLav2 conc. (ml) | Etanol (ml) | Vol. final (ml) |
|-------------|------------------|-------------|-----------------|
| 10 maxiprep | 24 | 96 | 120 |

Homogeneizar antes de usar.

IMPORTANTE: luego de agregar etanol al buffer BLav2, marcar una (X) en el casillero de la etiqueta, a la derecha del texto “**ADICIÓN DE ETANOL**”.

PROTOCOLO

1. Inocular el medio LB (con el antibiótico apropiado), con la bacteria conteniendo el plásmido a purificar. Cultivar 12 a 16 hs con buena agitación. Emplear 150-200 ml de cultivo, dependiendo del número de copia del plásmido.
2. Centrifugar el cultivo bacteriano 1 ó 2 minutos a 12.000 g. Eliminar el sobrenadante completamente.
3. Resuspender los sedimentos bacterianos en 7,5 ml de buffer **BR** conteniendo RNasa A. Emplear brevemente agitador vortex, asegurarse que no queden cúmulos sin resuspender. Reunir los resuspendidos en un único tubo (en caso de que se haya realizado en tubos de 50 ml).
4. Agregar 7,5 ml de buffer **BL** y agitar 5 veces por inversión. **No usar vortex** de ahora en más, ya que produciría degradación de ADN cromosómico que pasaría a contaminar al ADN plasmídico. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
5. Adicionar 10 ml de buffer **BN** para neutralizar el lisado. Invertir inmediatamente varias veces el tubo. Se formará un precipitado blanco.
6. Centrifugar 10 minutos a 12.000 g. Colocar una maxicolumna en un tubo colector.
7. Agregar el sobrenadante a la maxicolumna (volumen máximo 10 ml), cuidando que no se pasen rastros de sedimento. Centrifugar 1 minuto a 12.000 g y repetir hasta pasar todo el sobrenadante. Vaciar el tubo colector y colocar la maxicolumna nuevamente en él.

8. Agregar sobre las paredes de la maxicolumna 10 ml de buffer **Blav1**. Centrifugar 1 minuto a 12.000 g. Descartar el filtrado. Colocar la maxicolumna en el tubo colector.
9. Agregar sobre las paredes de la maxicolumna 10 ml de buffer **Blav2**. Centrifugar 1 minuto a 12.000 g. Descartar el filtrado. Colocar la maxicolumna en el tubo colector.
10. Centrifugar 3 minutos a 10.000 g para eliminar restos de Blav2.
11. Colocar la maxicolumna en un tubo tipo Falcon de 50 ml. Dejar la maxicolumna destapada por 15 minutos para evaporar restos de etanol.
12. Agregar 2 ml de buffer **BE** pH: 8.0 (se recomienda equilibrarlo a 70°C) sobre el centro de la membrana de sílica, sin tocarla con el tip. Incubar 5-10 minutos a temperatura ambiente.
13. Centrifugar 2 minutos a 12.000 g. El ADN plasmídico eluirá al tubo de 50 ml. Conservar a 4°C, o a -20°C si no se ha de emplear en los próximos 3-5 días. |

Nota: Si el buffer BE (10 mM Tris-HCl; 0.5 mM EDTA pH: 8.0) resultara incompatible con el uso que se le dará al plásmido purificado puede eluirse con agua de elución, libre de nucleasas, pH: 8.0 (provista en el kit).

SOLUCIÓN DE INCONVENIENTES

| Inconveniente | Posible causa |
|---|--|
| Pobre desarrollo bacteriano | <ul style="list-style-type: none"> • Inoculación a partir de un cultivo no fresco. • Deficiente agitación. |
| Deficiente lisis | <ul style="list-style-type: none"> • Se ha empleado demasiadas células. • Deficiente resuspensión celular. |
| Bajo rendimiento de plásmido | <ul style="list-style-type: none"> • Insuficiente cantidad de bacterias ($DO_{600} < 1.3$). • El crecimiento del cultivo se extendió más de 16 hs. • El plásmido no se propagó por inactividad del antibiótico. • Deficiente elución del ADN. Controlar el pH del BE o solución empleada para eluir. El pH debe estar entre 7.0 y 8.5. • La solución de elución no tomó contacto con la membrana de sílica. |
| Contaminación con ADN genómico | <ul style="list-style-type: none"> • Prolongada incubación con BL. • Enérgica agitación en paso 4 del Protocolo. |
| Pobre recuperación de plásmidos de más de 10 kpb | <ul style="list-style-type: none"> • En esos casos efectuar la elución a 70°C para mejorar el rendimiento. |
| En gel de agarosa se observa banda algo más rápida que el plásmido supercoiled. | <ul style="list-style-type: none"> • Reducir el tiempo de lisis (paso 4 del Protocolo). |

CONSIDERACIONES DE INTERÉS

Si el rendimiento en la recuperación del ADN fuera bajo, puede deberse a una deficiente elución. El ADN no se desprenderá de la membrana de sílica a pH ácido. De emplearse otro buffer, distinto al BE provisto, asegurarse que sea alcalino (pH:8.0-8.5). Para fragmentos de ADN superiores a 5 kpb es imprescindible precalentar el buffer BE a 70°C antes de adicionarlo a la maxicolumna.

INBIO HIGHWAY S.A.

Serrano 1414 - (7000) - Tandil - Argentina

Tel: +54 (249) 442 0193

Dir. Tec. Bioq. A. Carolina Prokopiuk

contacto@inbiohw.com.ar

www.inbiohw.com.ar

 PRODUCIDO
EN ARGENTINA

ES UN PRODUCTO DE

 **INBIO**
HIGHWAY