

K 1207



ADN PuriPrep-P kit

Extracción y purificación rápida
de ADN plasmídico (miniprep)

USO EN INVESTIGACION
IN VITRO



AND PuriPrep-P kit

Versión: 1.5
19/4/2024

Índice

Presentación	6
Importante	6
Componentes del kit.....	6
Condiciones de conservación.....	7
Garantía	7
Advertencia	7
Rendimiento en la purificación del plásmido.....	8
Preparación de los reactivos	8
Protocolo.....	9
Solución de inconvenientes.....	11
Consideraciones de interés.....	11

PRESENTACIÓN

Highway® ADN PuriPrep-P kit (K1207) permite la extracción y purificación rápida y sencilla de ADN plasmídico a partir de cultivos bacterianos (miniprep). 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 minicolumna, se puede utilizar inmediatamente o ser conservado a -20°C. Todo el proceso demanda no más de 30-35 minutos y no requiere el empleo de solventes orgánicos ni fenol. Se obtiene entre 1 y 20 µg de ADN, dependiendo del volumen de cultivo procesado y el número de copia del plásmido.

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 dos versiones: para 20 y 100 extracciones/purificaciones de ADN plasmídico.

Highway® ADN PuriPrep-P kit		
Catálogo	K1207-20	K1207-100
Cantidad de muestras	20	100
Mini columnas	20	100
Tubos colectores	20	100
Buffer de resuspensión (BR), ml (B0209)	6	30
Buffer de lisis (BL), ml (B0210)	6	30
Buffer de neutralización (BN), ml (B0211)	8	40
Buffer lavado 1 (BLav1), conc., ml (B0212)	6,8	35
Buffer lavado 2 (BLav2) conc., ml (B0213)	3,2	16
Buffer elución (BE), pH: 8.0, ml (B0205)	1,2	6
Agua de elución, pH: 8.0, ml (A0101)	1,2	6

Buffer de elución (BE): 10 mM TrisHCl, 0,5mM 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

Microcentrífuga con rotor para viales de 1,5-2 ml; baño de incubación a 70°C, micropipetas hasta 50, 200 y 1000 µl; microtubos de 1,5 ó 2,0 ml; etanol 96-100%.

CONDICIONES DE CONSERVACIÓN

Los componentes del kit **Highway® ADN PuriPrep-P (K1207-20 y K1207-100)**, buffers y minicolumnas, deben conservarse a temperatura ambiente (15-30°C), excepto el buffer **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 los buffers BR y BL; en ese caso llevarlos unos minutos a estufa a 37°C y agitar suavemente por rotación. El precipitado se disuelve.

GARANTÍA

Highway® ADN PuriPrep-P kit (K1207) 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*.**

Minicolumnas

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 minicolumna con el tip cuando se agregan los reactivos. Cambiar de tip cada vez que toque las paredes de una minicolumna, cuando se dispensan los reactivos seriadamente (varias muestras).
- c) Las centrifugaciones deben realizarse a temperatura ambiente (15-25°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.

RENDIMIENTO EN LA PURIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO

Alto número de copia	
Volumen de cultivo (ml)	Rendimiento (µg)
1,5	2-8
5	10-20
Bajo número de copia	
Volumen de cultivo (ml)	Rendimiento (µg)
1,5	1-3
5	5-10

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)
20 minipreps	6,8	4,2	11
100 minipreps	35	21,5	56,5

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)
20 minipreps	3,2	12,8	16
100 minipreps	16	64	80

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 10 ml de medio LB (con el antibiótico apropiado), con una colonia de la bacteria conteniendo el plásmido a purificar. Cultivar 12 a 16 hs con buena agitación. Emplear 1,5-5 ml de cultivo, dependiendo del número de copia del plásmido. Volumen recomendado: 3 ml.
2. Centrifugar el cultivo bacteriano 1 ó 2 minutos a 12.000g en microtubos de 1,5 ml. Eliminar el sobrenadante completamente.
3. Resuspender los sedimentos bacterianos en 250 µl (volumen total) de buffer **BR**, conteniendo RNasa A. Emplear brevemente agitador vortex. Asegurarse de que no queden cúmulos sin resuspender. Reunir los resuspendidos en un único tubo.
4. Agregar 250 µl de buffer **BL** y agitar 5 veces por inversión. **No usar vortex** de ahora en más ya que producirá degradación de ADN cromosómico que pasaría a contaminar al ADN plasmídico. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.

5. Adicionar 350 μ l de buffer **BN** para neutralizar el lisado. Invertir inmediatamente, varias veces el tubo. Se formará un precipitado blanco.
6. Centrifugar 10 minutos a 12.000g. Colocar una minicolumna en un tubo colector.
7. Agregar el sobrenadante a la minicolumna, cuidando que no pasen rastros de sedimento. Centrifugar 1 minuto a temperatura ambiente.
8. Agregar sobre las paredes de la minicolumna 500 μ l de **BLav1**. Centrifugar 1 minuto a 12.000g. Descartar el filtrado. Colocar la minicolumna en el tubo colector.
9. Agregar sobre las paredes de la minicolumna 700 μ l de **BLav2**. Centrifugar 1 minuto a 12.000g. Descartar el filtrado. Colocar la minicolumna en el tubo colector.
10. Centrifugar 3 minutos a 12.000g para eliminar restos de BLav2.
11. Colocar la minicolumna en un microtubo de 1,5 ml rotulado. Dejar la minicolumna destapada por 15 minutos para evaporar restos de etanol.
12. Agregar 50 μ l 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 12.000g. **El ADN plasmídico eluirá al microtubo.** 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 10kpb	<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 minicolumna.

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