

K 1209



ADN PuriPrep-B kit

Extracción y purificación rápida
de ADN a partir de bacterias

USO EN INVESTIGACION
IN VITRO



ADN PuriPrep-B kit

ADN PuriPrep-B kit

ÍNDICE

Presentación.....	6
Importante.....	6
Componentes del kit.....	6
Condiciones de conservación.....	7
Garantía.....	7
Advertencias.....	8
Preparación de reactivos.....	8
El proceso de elución del ADN puro.....	9
Cuantificación del ADN.....	10
Protocolo para muestras de bacterias.....	11
Protocolo para bacterias Gram Negativas.....	11
Protocolo para bacterias Gram Positivas.....	13
Solución de inconvenientes.....	14

PRESENTACIÓN

Highway® ADN PuriPrep-B kit (K1209-50) permite la extracción y purificación rápida y sencilla de ADN genómico a partir de bacterias.

Se obtiene un ADN puro, libre de proteínas, que coeluye de una minicolumna de sílica con ARN, el cual podrá digerirse con RNasa A en caso que así se desee. El producto final puede aplicarse inmediatamente a una PCR o ser conservado a -20°C. Luego de la lisis bacteriana con lisozima y proteinasa K, el proceso demanda no más de 90 minutos y no requiere el uso de solventes orgánicos ni fenol.

IMPORTANTE

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

COMPONENTES DEL KIT

Para 50 extracciones/purificaciones de ADN.

Catálogo	K1209-50
Cantidad de muestras	50
Minicolumnas	50
Tubos colectores	50
Buffer resuspensión bacterias (BRB), ml (B0223)	10
Buffer de proteólisis, ml (B0220)	11
Buffer de lisis (BL), ml (B0202)	12
Proteinasa K 40 U/mg (E1403), 960 U; 24 mg, vial	1
Buffer de resuspensión de proteinasa K, ml (B0221)	1,3
Lisozima 50000 U/mg (E1405), 200 mg, vial	1
Buffer TE pH: 8.0, ml (B0401)	60
Buffer de lavado 1 (BLav 1) conc., ml (B0203)	13
Buffer lavado 2 (BLav 2) conc., ml (B0204)	17
Buffer elución (BE), pH: 9.0, ml (B0205)	12
Agua de elución pH: 9.0, ml (A0101)	12

ADN PuriPrep-B kit

Buffer elución (BE): 10 mM Tris HCl, 0,5 mM EDTA, pH: 9.0.

Agua de elución: estéril, libre de DNasas y RNasas, pH: 9.0.

Materiales que aportará el usuario

Microcentrífuga con rotor para viales de 1,5 y 2 ml; baño incubación a 37°C, 56°C y 70°C; micropipetas hasta 50, 200 y 1000 µl; microtubos de 1,5 ó 2,0 ml; solución salina tamponada (PBS); RNasa A (recomendado); etanol 96-100%.

CONDICIONES DE CONSERVACIÓN

Highway® ADN PuriPrep-B kit (K1209) buffers y minicolumnas, deben conservarse a temperatura ambiente (15-30°C).

La proteinasa K (E1403) se entrega liofilizada y a temperatura ambiente. Una vez recibida conservar a 4°C. Luego de resuspenderla en el buffer de proteinasa K (B0221) debe conservarse a -20°C.

A la lisozima *Highway* (E1405), se recomienda conservarla a 4°C. Una vez resuspendida en el buffer TE (B0401), deberá conservarse a -20°C.

GARANTÍA

Highway® ADN PuriPrep-B kit (K1209) 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 la 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*.**

Mini columnas:

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.
- c) Las centrifugaciones deben realizarse a temperatura ambiente (15-30°C) y los buffers de extracción y de lavados deben estar también a la misma temperatura. Se recomienda equilibrar a 70°C la alícuota del buffer de elución o agua de elución, para obtener mejor rendimiento en la elución del ADN.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

- **Resuspensión de la lisozima**

Al vial conteniendo 200 mg de lisozima liofilizada (E1405) se le adiciona 1 ml de buffer TE (B0401). Mezclar por inversión varias veces hasta su completa disolución. Una vez reconstituída, se recomienda conservarla a -20°C.

Si debe descongelarse con frecuencia, se aconseja fraccionarla a fin de evitar sucesivos congelamientos/descongelamientos.

ADN PuriPrep-B kit

- **Proteinasa K**

Se entrega liofilizada en un vial con 24 mg (960 U). Resuspenderla agregando 1,2 ml del buffer de resuspensión provisto (B0221). Mezclar por inversión varias veces hasta su completa disolución. Una vez resuspendida conservar a -20°C.

- **Buffer de lavado 1 (BLav 1)**

Se entrega concentrado. Conservar a temperatura ambiente (15-30°C). Requiere la adición de etanol (96-100%) en las cantidades indicadas a continuación:

BLav 1 conc. (ml)	Etanol (ml)	Vol. final (ml)
13	17	30

Homogeneizar antes de usar. Marcar en la etiqueta la adición de etanol (X).

- **Buffer de lavado 2 (BLav 2)**

Se entrega concentrado. Conservar a temperatura ambiente (15-30°C). Requiere la adición de etanol (96-100%) en las cantidades indicadas a continuación:

BLav 2 conc. (ml)	Etanol (ml)	Vol. final (ml)
17	39	56

Homogeneizar antes de usar. Marcar en la etiqueta la adición de etanol (X).

EL PROCESO DE ELUCIÓN DEL ADN PURO

Es conveniente conocer cómo una serie de factores operativos pueden afectar el rendimiento, la concentración o la estabilidad del ADN en el eluido.

En principio, si el ADN ha de emplearse inmediatamente en PCR y no existe interés por conservarlo por largo plazo, puede eluirse simplemente en agua de elución (provista en el kit) y mantenerse a 4-8°C en heladera por unos pocos días. Sin embargo, si ha de conservarse por largo tiempo, es importante realizar la elución en el buffer BE (también provisto en el kit) y mantenerlo a -20°C.

La tabla siguiente muestra el rendimiento del ADN obtenido a partir de cultivos de 12-16hs de Gram Positivas y Gram Negativas:

Gram negativas	Volumen de cultivo	Rendimiento total de ADN
<i>Escherichia coli DH5alfa</i> (DO= 1,5)	1,5 ml	10- 15 µg
Gram negativas		
<i>Micrococcus luteus</i> (DO= 3,75)	0,5 ml	8-10 µg

CUANTIFICACIÓN DEL ADN

Se realiza por espectrofotometría a 260 nm. Llevar a cero de absorbancia con buffer BE.

$$\text{ADN } \mu\text{g} = \text{DO}_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{vol. eluido (0,2 ml)} \times \text{dilución}$$

La relación de absorbancia a 260/280 nm, indica el grado de pureza del ADN.

Una relación entre 1,7 y 1,9 está indicando una eliminación muy buena de proteínas y otros contaminantes.

Cabe recordar que el ARN presente en la muestra, coeluye con el ADN. Ello no interfiere en absoluto en la amplificación del ADN en PCR.

Si se desea obtener ADN libre de ARN, ver indicaciones de digestión con RNasa A en el protocolo.

Nota: Puede controlarse la extracción del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa 0,6%. Si se eluye en 200 µl de buffer BE, se suele emplear 1 a 4 µl del eluido para amplificar por PCR en 25 µl totales.

PROTOCOLO PARA MUESTRAS DE BACTERIAS

Acciones previas:

Calibrar un baño de agua a 37°C, 56°C y 70°C (para mayor rendimiento de ADN).

Permitir que las muestras se equilibren con la temperatura ambiente (15-30°C) al igual que los buffers **BRB**, **BP**, **BL**, **BLav 1**, **BLav 2**. Equilibrar una alícuota del buffer **BE** a 70°C para una mejor elución del ADN.

Controlar que los buffers **BLav 1** y **BLav 2** hayan sido preparados como se indicara en "Preparación de los reactivos". En el caso de que el buffer **BL** presentara un precipitado, llevar el frasco a un baño María a 56°C hasta que se disuelva. Luego volver a equilibrar su temperatura a 15-30°C antes de su uso.

Para mejorar la relación 260/230 se puede preactivar la minicolumna. Las instrucciones para realizar dicha preactivación son:

1. Colocar la minicolumna en un tubo colector de 2 ml y agregar 500 µl de etanol 96%.
2. Incubar durante 1 minuto a temperatura ambiente.
3. Centrifugar a 12.000 g durante 1 minuto.
4. En este momento, la minicolumna ha quedado preactivada y lista para utilizarse.

PROTOCOLO PARA BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

1. Transferir hasta 1,5 ml de cultivo de la bacteria Gram Negativa a un microtubo de 1,5 ml. Centrifugar a 12.000 g, 3 minutos y descartar el sobrenadante.

Nota: Para el caso de *E. Coli*, se recomienda utilizar hasta 1,5 ml de un cultivo de DO 1,5. Se debe optimizar en cada caso la cantidad de material de partida para que la lisis sea completa y no sobrecargar las columnas (esto disminuye el rendimiento y la pureza del ADN obtenido).

2. Resuspender el pellet bacteriano con 1 ml de buffer **TE** y volver a repetir la centrifugación anterior. Descartar el sobrenadante.

3. Resuspender el pellet con 178 μ l de buffer **BRB** y 2 μ l de la lisozima (200 mg/ml). Incubar 30 minutos a 37°C. Agitar cada 10 minutos.

4. Agregar 200 μ l de buffer **BP** y 20 μ l de solución de proteinasa K (20 mg/ml). Mezclar con vortex. Incubar durante 30 minutos a 56°C. Agitar cada 10 minutos.

5. Si se requiere ADN libre de ARN (recomendado), adicionar 4 μ l de RNasa A (10 mg/ml), agitar e incubar durante 30 minutos a 37°C.

6. Agregar 200 μ l de buffer **BL** al microtubo. Mezclar con vortex. Incubar durante 15 minutos a 56°C.

Nota: La homogeneización es esencial para una buena lisis y así lograr un mayor rendimiento en la extracción.

7. Agregar 200 μ l de etanol (96-100%), agitar por inversión 3 veces.

8. Volcar el contenido del microtubo en una minicolumna colocada sobre uno de los tubos colectores de 2 ml. Centrifugar a 12.000 g durante 1 minuto o hasta que haya escurrido todo el contenido. Descartar el filtrado, colocando nuevamente la minicolumna en el tubo colector.

9. Agregar sobre las paredes de la minicolumna 500 μ l de buffer **Blav 1** (verificar el agregado de etanol al buffer Blav 1 concentrado), cuidando que el tip no toque la membrana. Centrifugar 1 minuto a 12.000 g. Descartar el filtrado, colocando nuevamente la minicolumna en el tubo colector.

10. Lavar la minicolumna con 500 μ l de buffer **Blav 2** (verificar el agregado de etanol al buffer Blav 2 concentrado), siguiendo las precauciones indicadas en el lavado anterior. Centrifugar 3 minutos a 12.000 g.

11. Repetir el paso anterior.

12. Descartar el tubo colector y colocar la minicolumna en un microtubo de 1,5 ml. Centrifugar 3 minutos a 12.000 g.

Nota: Es muy importante que se haya eliminado todo vestigio de buffer Blav 2 de la minicolumna, ya que puede resultar inhibitor en varias técnicas a realizar con el ADN final.

ADN PuriPrep-B kit

13. Colocar la minicolumna en un nuevo microtubo de 1,5 ml rotulado. Agregar 200 µl de buffer **BE** pH: 9,0 (equilibrado a 70°C) sobre el centro de la membrana de sílica, sin tocarla con el tip. Incubar 5-10 minutos a temperatura ambiente (15-30°C).

14. Centrifugar 2 minutos a 12.000. El ADN eluirá en el microtubo. Conservar a 4°C o a -20°C si no se ha de emplear en los próximos 3-5 días.

PROTOCOLO PARA BACTERIAS GRAM POSITIVAS

1. Transferir hasta 1,5 ml de cultivo de la bacteria Gram Positiva a un microtubo de 1,5 ml. Centrifugar a 12.000 g, 3 minutos y descartar el sobrenadante.

Nota: Para el caso del *Micrococcus Luteus* se recomienda utilizar hasta 0,5 ml de un cultivo de DO 3,75. Se debe optimizar en cada caso la cantidad de material de partida para que la lisis sea completa y no sobrecargar las minicolumnas (esto disminuye el rendimiento y la pureza del ADN obtenido).

2. Resuspender el pellet bacteriano con 1 ml de buffer **TE** y volver a repetir la centrifugación anterior. Descartar el sobrenadante.

3. Resuspender el pellet con 162 µl de buffer **BRB** y 18 µl de la lisozima (200 mg/ml). Incubar 30 min a 37°C.

Nota: Para la mayoría de las bacterias Gram Positivas, el tratamiento con lisozima es suficiente para debilitar la pared celular. De ser necesario, se puede aumentar el tiempo de incubación con la lisozima. Sin embargo, muchas especies de *Staphylococcus* requieren un tratamiento adicional con 1 mg/ml de lisostafina (no incluida en el kit) para que la lisis sea eficiente.

Continuar con el paso 4 del protocolo para Gram Negativas.

SOLUCIÓN DE INCONVENIENTES

Inconvenientes	Posibles causas y/o sugerencias
Poco rendimiento de ADN en el eluido	<ul style="list-style-type: none"> - Baja concentración de bacterias en el cultivo procesado. Partir de un cultivo fresco con buena agitación durante 12-16 hs. - Deficiente resuspensión del pellet bacteriano con el buffer BRB. - Deficiente lisis bacteriana. Asegurarse de respetar las condiciones y temperaturas de incubación indicadas en el manual. - Adición incorrecta del etanol (96-100%) en los buffers de lavado. - Asegurarse de haber empleado el buffer BE o agua provista en el kit para la elución. Si no es así, asegurarse de que el mismo sea alcalino (pH: 8.0-8.5)
Bajo cociente A260/A280	<ul style="list-style-type: none"> - Asegurarse la correcta incubación de la suspensión bacteriana con la proteinasa K. Chequear su correcta conservación según indicaciones del manual. - Adición incorrecta del etanol (96-100%) en los buffers de lavado. - Lisis deficiente. Asegurarse la completa resuspensión del pellet bacteriano y respetar los tiempos y temperaturas de incubación.
Alto cociente A260/A280	<ul style="list-style-type: none"> - El buffer BL se adicionó antes del agregado de la RNasa A. - Alta concentración de ARN en el eluido. Proceder a la incubación con la RNasa A.

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