

K1213



Easy Plant PCR directo

200 reacciones

**Amplificación rápida por PCR
a partir de hojas y semillas**

Fórmula optimizada

**USO EN INVESTIGACION
*IN VITRO***

Easy Plant PCR directo

Presentación

El kit (K1213) contiene:

- 2 viales con 1,25 ml c/u de Master Mix 2X Easy Plant (M031) para 200 reacciones x 25 µl finales
- 1 vial con 150 µl de Mix Primers control positivo (M200)
- 1 vial con 1,5 ml de Componente A (B0511)
- 1 vial de 1,2 ml de Componente B (B0512)
- 1 frasco con 12 ml de Solución Neutralizante (B0513)
- 1 frasco con 20 ml de agua ultrapura para PCR (A0103)

Descripción

El Kit Easy Plant PCR directo (K1213) permite realizar la reacción de PCR a partir de plantas mediante lisis de hojas o semillas, sin necesidad de purificación previa del ADN.

El kit incluye una Master Mix 2X (M031), que contiene todos los componentes necesarios para realizar la PCR de punto final, y está especialmente diseñado para neutralizar la acción de posibles inhibidores presentes en la muestra.

La concentración final de $MgCl_2$ será de 1,5 mM.

El Componente A (B0511) y el Componente B (B0512) del buffer de lisis, junto con la Solución Neutralizante (B0513) han sido desarrollados para optimizar la extracción del material genético del tejido vegetal.

Se provee también de un mix de primers correspondientes a una región conservada del ADN del cloroplasto para ser empleados como control positivo, y de agua calidad biología molecular para usarla en la preparación del buffer de lisis y en el cocktail de reacción.

Acciones previas:

Preparación del Buffer de lisis

Por cada muestra vegetal a procesar se deben preparar, en el momento, 50 μ l de **Buffer de Lisis**, respetando las siguientes proporciones:

CANTIDAD DE MUESTRAS	1	5	10	20
COMPONENTE A (μl)	5	25	50	100
COMPONENTE B (μl)	5	25	50	100
AGUA ULTRAPURA (μl)	40	200	400	800
VOLUMEN FINAL (μl)	50	250	500	1000

Protocolo para hojas o semillas

1. Preparar la cantidad de **Buffer de lisis** necesaria, según las proporciones indicadas en “Acciones previas”.
2. Cortar una sección de hoja de aproximadamente 5 mm de lado y colocarlo en un vial con 50 µl de **Buffer de lisis**. Disgregarlo sobre el fondo con la ayuda de un tip. La solución se tornará verdosa.

Nota: en caso de partir de semillas, emplear un bisturí para obtener una porción de aproximadamente este tamaño (●), disgregarlo con el tip o con la ayuda de un triturador de tejidos de punta cónica (Bel-Art™ SP Scienceware™ F19921-0001).

3. Incubar durante 10 minutos a 95°C.
4. Agregar 50 µl de **Solución Neutralizante** y mezclar con pipeta up-down.
5. Emplear el extracto obtenido directamente en la reacción de PCR, como templado.

Usar 0,5 µl de este lisado para una PCR de 25 µl de volumen final. Puede ser necesario optimizar esta cantidad según los resultados obtenidos con el control positivo o con la amplificación específica. Recordar que la Master Mix 2X provista contiene agentes que neutralizan la acción de inhibidores de PCR de una gran variedad de especies, aunque esto también dependerá del grado de dilución de la muestra en el Buffer de lisis.

Protocolos

1. Control positivo

a. Preparación del cocktail de PCR para el CONTROL POSITIVO

Para 25 μ l volumen final de reacción:

REACTIVO	VOLUMEN	CONCENTRACIÓN FINAL
Master Mix 2X Easy Plant Highway (M031)	12,5 μ l	1X
Mix Primers Control Positivo Highway (M200)	1,3 μ l	0,26 μ M
MUESTRA	0,5 μ l de lisado	
Agua ultrapura Highway (A0103)	c.s.p 25 μ l	

Mantener los viales en frío durante toda la preparación hasta su termociclado.

b. Programa de termociclado

Duración total: 26 min.

Tamaño de amplímero: 297 pb

ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
Desnaturalización inicial	94°C	5 min	1
Desnaturalización	94°C	5 seg	40
Annealing	62°C	5 seg	
Extensión	72°C	20 seg	
Extensión final	72°C	1 min	1

2. Muestras

a. Preparación del cocktail de PCR para las MUESTRAS CON PRIMERS ESPECÍFICOS

Para 25 μ l volumen final de reacción:

REACTIVO	VOLUMEN	CONCENTRACIÓN FINAL
Master Mix 2X Easy Plant Highway (M031)	12,5 μ l	1X
Primer Forward 10 μ M	1,25-2,5 μ l	0,5-1 μ M
Primer Reverse 10 μ M	1,25-2,5 μ l	0,5-1 μ M
MUESTRA	0,5 μ l de lisado (variable)	
Agua ultrapura Highway (A0103)	c.s.p 25 μ l	

Mantener los viales en frío durante toda la preparación hasta su termociclado.

El programa de PCR de la muestra dependerá de los primers que emplee el usuario.

Conservación: -20°C

La Master Mix y el Mix de Primers deben conservarse a -20°C. El Componente A, el Componente B, el Agua Ultrapura y la Solución Neutralizante se sugiere que una vez recibidos se conserven a temperatura ambiente (15-30°C). Se podrán separar los componentes que llevan diferente temperatura de conservación, cortando sobre la línea de termosellado de la bolsita.

Para uso en investigación *in vitro*.

Inbio Highway S.A.

Serrano 1414 (7000) Tandil | Prov Bs. As. | Argentina
Tel. +54 249 4420193

contacto@inbiohw.com.ar
www.inbiohw.com.ar

Directora Técnica: Bioq. A. Carolina Prokopiuk

 **PRODUCIDO EN ARGENTINA** 

ES UN PRODUCTO DE

