

K 1208



ADN PuriPrep-T kit

Extracción y purificación rápida de
ADN a partir de tejidos sólidos:

Biopsias · Hígado · Bazo · Cola de ratón
Tejidos fijados · Hueso disgregado
Bulbo capilar

USO EN INVESTIGACION
IN VITRO



ADN PuriPrep-T kit

Versión: 1.5
22/4/2024

ÍNDICE

Presentación.....	6
Importante	6
Componentes del kit	6
Condiciones de conservación	7
Garantía.....	7
Advertencia.....	7
Preparación de reactivos	8
El proceso de elución del ADN puro	9
Cuantificación del ADN	10
Rango de tamaño de ADN obtenido	10
Protocolo para muestras de tejidos.....	11

PRESENTACIÓN

Highway® ADN PuriPrep-T kit (K1208-50 y K1208-250) permite la extracción y purificación rápida y sencilla de ADN total (genómico y mitocondrial) a partir de muestras de tejidos sólidos (biopsias, hígado, bazo, riñón, cola de ratón, tejidos fijados, hueso disgregado, bulbo piloso). En este aspecto representa un buen complemento del PuriPrep-S, aplicable especialmente a muestras de sangre y células libres.

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. Predominan fragmentos de 20-30 kpb y aún mayores, debido al escaso manipuleo. Luego de la digestión del tejido con Proteinasa K (provista), el proceso demanda no más de 30-35 minutos y no requiere el empleo 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

Se presenta en dos versiones: para 50 y 250 extracciones/purificaciones de ADN.

Highway® ADN PuriPrep-T kit		
Catálogo	K1208-50	K1208-250
Cantidad de muestras	50	250
Minicolumnas	50	250
Tubos colectores	50	250
Buffer de proteólisis (BP), ml (B0220)	11	50
Buffer de lisis (BL), ml (B0202)	12	60
Proteinasa K 40 U/mg (E1403), 960 U; 20 mg/ml final, vial	1	5
Buffer de resuspensión de proteinasa K, ml (B0221)	1,3	10
Buffer de lavado 1 (BLav 1) conc., ml (B0203)	19	95
Buffer lavado 2 (BLav 2) conc., ml (B0204)	13	66
Buffer elución (BE), pH:9.0, ml (B0205)	12	60
Agua de elución pH: 9.0; ml (A0101)	12	60

ADN PuriPrep-T 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 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 (opcional); etanol 96-100%.

CONDICIONES DE CONSERVACIÓN

Los componentes de **Highway® ADN PuriPrep-T kit (K1208-50 y K1208-250)**, buffers y minicolumnas, deben conservarse a temperatura ambiente.

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) especialmente formulado por **INBIO HIGHWAY®** debe conservarse a -20°C.

GARANTÍA

Highway® ADN PuriPrep-T kit (K1208) 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 esa 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

- **Proteinasa K**

Se entrega liofilizada en viales con 24 mg cada uno (960 U totales). Resuspenderla agregando 1,2 ml del buffer de resuspensión provisto (B0221) por cada vial. Mezclar por inversión varias veces hasta completa disolución.

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

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

Tipo de kit	BLav 1 conc. (ml)	Etanol (ml)	Vol. final (ml)
50	19	25	44
250	95	125	220

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

ADN PuriPrep-T kit

- **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:

Tipo de kit	BLav 2 conc. (ml)	Etanol (ml)	Vol. final (ml)
50	13	30	43
250	66	160	226

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. Respecto al rendimiento de la recuperación del ADN en el proceso de elución, empleando buffer BE, equilibrado a 70°C, la Tabla siguiente muestra la influencia de sucesivos agregados de 200 µl BE a la minicolumna.

Influencia de sucesivas eluciones de 200 µl sobre el rendimiento:

Muestra	Volumen	Elución 1	Elución 2	Elución 3	Total
Hígado 25 mg	200 µl	20-42	18-40	6-15	44-97
Corazón 25 mg	200 µl	12-22	6-12	2-5	20-39
Riñón 25 mg	200 µl	24-38	20-25	1-12	50-75
Cerebro 25 mg	200 µl	20-27	8-20	4-11	32-58
Bazo 10 mg	200 µl	12-22	7-15	2-6	21-43

Influencia del volumen de elución en el rendimiento y concentración:

Volumen elución μl	Rendimiento μg	%	Conc. ADN $\text{ng}/\mu\text{l}$
50	14,0	70	280,0
100	16,4	82	164,0
150	18,8	94	125,3
200	20,0	100	100,0

Se observa que, aunque la concentración aumenta al disminuir el volumen de buffer BE empleado en la elución, hay paralelamente un decaimiento en la cantidad de ADN recuperado en el eluido.

CUANTIFICACIÓN DEL ADN

Se realiza por espectrofotometría a 260 nm. A los fines de minimizar el error es conveniente que la absorbancia no sea inferior a 0,08 ni superior a 0,80. Llevar a cero de absorbancia con 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. Un cociente entre 1,7 y 1,9 está indicando una eliminación muy buena de proteínas y otros contaminantes.

Cabe recordar que el RNA 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 Protocolo.

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

RANGO DE TAMAÑO DEL ADN OBTENIDO

Puede determinarse mediante electroforesis de campo pulsado (PFGE). Normalmente, predomina ADN con tamaño comprendido entre 20-30 kpb,

aunque también se pueden encontrar fragmentos que superen los 50 kpb.

PROTOCOLO PARA MUESTRAS DE TEJIDOS

Acciones previas:

- Calibrar un baño de agua a 56°C.
- Permitir que las muestras se equilibren con la temperatura ambiente (15-30°C).
- Equilibrar una alícuota del BE a 70°C para una mejor elución del ADN.
- Controlar que los buffers BLav1 y BLav2 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.

Consideraciones a tener en cuenta:

- Los tejidos con alta actividad transcripcional (bazo, hígado, riñón) contienen alto porcentaje de ARN; esto no interfiere en absoluto con reacciones de PCR, pero sí para otras aplicaciones (digestión con enzimas de restricción, por ejemplo). En ese caso deberá realizarse su digestión mediante el agregado de RNasa (libre de DNasa) según se indica en el paso 3.
- El tiempo de lisis puede ser reducido aplicando a la muestra un tratamiento con nitrógeno líquido a partir de 25 mg de tejido (8-10 mg si se trata de bazo). Puede emplearse también un homogenizador de tejidos tratando 25 mg del tejido junto con 60 µl de PBS. Luego se continúa con el agregado del Buffer BP del paso 1 del protocolo.
- Se recomienda el tratamiento previo con xileno-etanol para tejidos parafinados o de PBS en el caso de tejidos en formol, empleando 25 mg de muestra. Luego se podrá seguir con el paso 1 del protocolo. La calidad y el rendimiento del ADN obtenido a partir de estas muestras dependerá del fijador, el tiempo de fijación, el tamaño del tejido fijado y la edad del bloque procesado.

PROTOCOLO

1. Para cada muestra a procesar rotular un microtubo de 1,5 ml (cónico). Agregar al mismo 25 mg del tejido (10 mg si se trata de bazo), cortado en pequeños trocitos a fines de reducir el tiempo de lisis. Agregar 180 μ l de buffer de protéolisis **BP**.
2. Agregar 20 μ l de la **solución de proteinasa K**, mezclar con agitador vortex; incubar a 56°C hasta que el tejido se haya desintegrado. Vortexear cada 15-20 min durante esta incubación o bien usar un baño termostatzado con agitación. El tiempo necesario para lograr la lisis total depende del tejido pero oscila entre 1 a 3 hs. También se puede dejar la muestra digiriendo toda la noche.
3. Si se requiere ADN libre de ARN, adicionar 4 μ l de RNasa A (10 mg/ml), agitar e incubar 30 minutos a 37°C. Si no se requiere eliminar el ARN, obviar el paso 3 y luego del 2 pasar directamente al 4.
4. Agregar 200 μ l de buffer **BL** al microtubo. Mezclar por inversión 3 veces. Esta homogeneización es esencial para una buena lisis. Para lograr un mayor rendimiento en la extracción, se puede agitar en vortex durante 10-20 segundos. luego del agregado del buffer BL. Dar un pulso de 5 segundos en la microcentrífuga.
5. Incubar 10-15 minutos a 56°C. Al finalizar dar un pulso en la microcentrífuga, a fin de hacer bajar las microgotas condensadas en la tapa del tubo durante la incubación.
6. Agregar 200 μ l de etanol (96-100%), agitar por inversión 3 veces y repetir el pulso en microcentrífuga del paso 5.
7. Volcar el contenido del microtubo en una minicolumna colocada sobre uno de los tubos colectores de 2 ml (provisto). 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.

8. Agregar sobre las paredes de la minicolumna 500 μ l de buffer **BLav 1**, 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.

9. Lavar la minicolumna con 500 μ l de buffer **BLav 2**, siguiendo las precauciones indicadas en el lavado anterior. Centrifugar 3 minutos a 12.000 g. Es muy importante que se haya eliminado todo vestigio de BLav 2 de la minicolumna, ya que puede resultar inhibitor en varias técnicas a realizar con el ADN final. Es recomendable repetir la centrifugación anterior.

10. Colocar la minicolumna en un microtubo de 1,5 ml rotulado. Dejar la minicolumna destapada durante 15 minutos para evaporar restos de etanol.

11. Descartar el tubo colector y colocar la minicolumna en un microtubo de 1,5 ml rotulado. Agregar 200 μ l 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.

12. Centrifugar 2 minutos a 12.000 g. El ADN 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 los componentes del buffer BE (10 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA; pH: 9.0) resultaran incompatibles con algunas de las técnicas que se aplicarán al ADN, la elución puede realizarse con agua de elución estéril libre de DNasas y RNasas, incluida en el kit.

Nota: efectuando otra elución con 200 μ l de BE puede incrementar la cantidad de ADN recuperado de la minicolumna en 10-20% pero baja notablemente su concentración. No se incrementa la eficiencia si se reemplaza la elución con 200 μ l por dos eluciones con 100 μ l.

Si se deseara obtener ADN más concentrado puede reducirse el volumen de BE para eluir, por ejemplo, pasar de 200 μ l a 50 μ l, pero esto disminuye significativamente el rendimiento.

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