

K 1210



ADN PuriPrep-SUELO kit

Extracción y purificación rápida de
ADN a partir de microorganismos
del suelo o materia fecal

USO EN INVESTIGACION
IN VITRO



ADN PuriPrep-SUELO kit

Índice

Presentación.....	6
Importante.....	6
Componentes del Kit	6
Condiciones de conservación.....	7
Garantía.....	7
Advertencia.....	7
Preparación de reactivos	8
Elución y conservación del ADN	9
Protocolo para muestras de suelo / materia fecal	9

PRESENTACIÓN

Highway[®] ADN PuriPrep-SUELO kit (K1210-50 y K1210-250) permite la extracción y purificación rápida y sencilla de ADN de comunidades de microorganismos a partir de muestras de suelo y materia fecal. Representa un buen complemento para llevar adelante estudios de metagenómica.

Durante el proceso se logra una eficiente eliminación de los inhibidores de la PCR contenidos en el suelo, como son los ácidos húmicos, sin necesidad de emplear equipamiento sofisticado. El ADN eluído puede aplicarse directamente a una PCR o ser conservado a -20°C. El proceso demanda no más de 35-40 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.

<i>Highway[®] ADN PuriPrep-SUELO kit</i>		
Catálogo	K1210-50	K1210-250
Cantidad de muestras	50	250
Minicolumnas con tubos colectores	50	250
Tubos con buffer resuspensión y perlas.	50	250
Buffer de lisis (BL), ml (B0227)	13	65
Buffer de floculación (BF), ml (B0228)	16	80
Buffer de binding (BB), ml (B0202)	25	120
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 bidestilada pH: 9.0; ml (A0101)	12	60

ADN PuriPrep-SUELO kit

Buffer elución (BE): 10 mM Tris HCl, 0.5 mM EDTA, pH: 9.0.

Materiales que aportará el usuario:

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

CONDICIONES DE CONSERVACIÓN

Los componentes de **Highway® ADN PuriPrep-SUELO kit (K1210)**, buffers y columnas, deben conservarse a temperatura ambiente.

GARANTÍA

Highway® ADN PuriPrep-SUELO kit (K1210) 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 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 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 en el procesamiento de varias muestras.

c) Las centrifugaciones deben realizarse a temperatura ambiente (15-25°C) y los buffers de extracción y de lavados deben estar también a esa temperatura. Es común que aparezca un precipitado en el BL, en ese caso disolver calentando en bañomaría a 70°C. Se recomienda equilibrar a 70°C la alícuota del buffer de elución y dejarlo en contacto con la columna 5 a 10 min, 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)
50	19	25	44
250	95	125	220

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**. Conservar a temperatura ambiente (15-25°C). Requiere la adición de etanol (96-100%) en las cantidades indicadas a continuación:

Tipo de kit	BLav2 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).

ELUCIÓN Y CONSERVACIÓN DEL ADN

Recordar termostatar una alícuota del BE a 70°C inmediatamente antes de su uso y dejarlo en contacto con la membrana de la columna 5 a 10 min antes de proceder a la centrifugación.

En principio, si el ADN ha de emplearse inmediatamente en PCR y no existe interés por conservarlo por largo plazo, puede mantenerse a 4-8°C en heladera por unos 2 ó 3 días.

Nota: Puede controlarse la extracción del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa 1 %, sembrando 10 - 15 µl. Si se eluye en 100 µl de BE, se suele emplear 1 o 2 µl puro o en diluciones 1/10 hasta 1/40, según la flora del suelo, para amplificar por PCR en 25 µl totales.

PROTOCOLO PARA MUESTRAS DE SUELO / MATERIA FECAL

Acciones previas:

Calibrar un baño de agua a 70°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 indica en "**Preparación de los reactivos**". En el caso de que el buffer BL presentara un precipitado, calentar el frasco a 70°C hasta que se redisuelva. Puede adicionarse en caliente.

PROTOCOLO

1. Para cada muestra a procesar rotular un vial de 2 ml conteniendo buffer y perlas (provisto). Agregar al mismo 150 mg del suelo. Dependiendo de la flora microbiana supuesta esta masa podrá incrementarse hasta 250 mg. (En el caso de materia fecal partir de 150 mg).
2. Vortexear durante 30 segundos y adicionar 220 μ l de buffer **BL** previamente calentado hasta disolver completamente el sedimento que pudiera contener. Colocar horizontalmente sobre la plataforma de un Vortex y sujeto con cinta adhesiva. Agitar a máxima velocidad durante 10 minutos.
3. Centrifugar a 10.000 x g durante 2 min. Transferir el sobrenadante a un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Enfriar el tubo durante 2 min en hielo.
4. Agitar el buffer **BF** y agregar 275 μ l al microtubo. Mezclar por inversión 3 veces. Repetir el enfriamiento durante 2 min.
5. Centrifugar 2 min a 10.000 x g y transferir el sobrenadante a un nuevo Eppendorf. Agregar 425 μ l de buffer **BB** y mezclar por inversión. Centrifugar nuevamente a 10.000 x g durante 5 min. Pasar el sobrenadante a un nuevo Eppendorf.
6. Agregar 425 μ l de **etanol** (96-100%), agitar por inversión 3 veces.
7. Transferir 650 μ l del sobrenadante a una minicolumna colocada sobre un tubo colector de 2 ml (provisto). Centrifugar a 12.000 x g durante 1 minuto o hasta que haya escurrido todo el contenido. Descartar el filtrado, colocando nuevamente la minicolumna en el tubo colector. Repetir estos pasos hasta pasar todo el sobrenadante por la minicolumna.
8. Agregar sobre las paredes de la minicolumna 500 μ l de buffer **BLav1**, cuidando que el tip no toque la membrana. Centrifugar 1 minuto a 12.000 x g. Descartar el filtrado, colocando nuevamente la minicolumna en el tubo colector.

9. Lavar la columna con 500 µl de buffer **BLav2**, siguiendo las precauciones indicadas en el lavado anterior. Centrifugar 3 minutos a 12.000 x g. Es muy importante que se haya eliminado todo vestigio de **BLav2** de la columna, ya que puede resultar inhibitor en varias técnicas a realizar con el ADN final. De ser necesario, repetir la centrifugación anterior.

10. Descartar el tubo colector y colocar la columna en un Eppendorf de 1,5 ml rotulado al que se ha cortado la tapa. Agregar 100 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.

11. Centrifugar 2 minutos a 12.000 x 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. Puede visualizarse el ADN obtenido corriéndolo en un gel de agarosa al 1%, sembrando 10 o 15 µl.

Nota

- Para realizar una amplificación del ADN obtenido se **recomienda** emplear el kit *T-Plus* ADN polimerasa *Highway* Resistente a inhibidores (K1006), el cual incluye un **buffer de reacción especialmente formulado para estas muestras**. En caso de no obtener amplificación con el ADN eluído puro, se aconseja realizar diluciones del mismo.
- 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 calidad tipo I estéril libre de DNasas y RNasas, incluida en el kit.

INBIO HIGHWAY

Serrano 1414 - (7000) - Tandil - Argentina

Dir. Téc. Dra. Bioq. Yanil R. Parma

Tel: + 54 (249) 442 0193

contacto@inbiohw.com.ar

www.inbiohw.com.ar



**PRODUCIDO
EN ARGENTINA**

ES UN PRODUCTO DE

