

K 1205



ADN PuriPrep-S kit

Extracción y purificación rápida
de ADN a partir de:
Sangre • Plasma • Suero
Médula ósea • Linfocitos • Orina
Hisopados • Sangre de cordón
Líquido cefalorraquídeo

USO EN INVESTIGACION
IN VITRO



ADN PuriPrep-S kit

Índice

Presentación.....	6
Importante.....	6
Componentes del kit.....	7
Condiciones de conservación.....	7
Garantía.....	8
Advertencia.....	8
Preparación de reactivos.....	9
El proceso de elución del ADN puro.....	10
Cuantificación del ADN.....	11
Rango de tamaño del ADN obtenido.....	12
Protocolo para muestras de sangre, médula ósea y linfocitos.....	12
Protocolo para muestras de plasma y suero sanguíneo.....	15
Protocolo a partir de hisopado bucal, uretral y cervical.....	16
Protocolo a partir de raspado prepucial y MCV (moco cérvico vaginal).....	18
Protocolo a partir de células en cultivo.....	20
Protocolo a partir de orina.....	21
Protocolo a partir de sangre seca en papel de filtro.....	22
Solución de inconvenientes.....	24

PRESENTACIÓN

Highway® ADN PuriPrep-S kit (K1205) permite la extracción y purificación rápida y sencilla de ADN total (genómico, mitocondrial y viral) a partir de muestras de sangre entera (fresca o congelada), saliva (fresca, o seca sobre papel de filtro), médula ósea, linfocitos, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, células en cultivo, hisopados (bucal, uretral y cervical), sangre seca en papel de filtro, cultivos líquidos, sangre de cordón y orina. Es compatible con el uso de agentes anticoagulantes como heparina, citrato de sodio y EDTA.

Este kit ha sido probado exitosamente en la extracción de ADN de *Chlamydia trachomatis* en muestras del tracto genitourinario (según protocolo para hisopados u orina).

También se aisló exitosamente ADN de *Trypanosoma vivax* en muestras de plasma, y *Tritrichomonas foetus* en cultivos líquidos.

Se obtiene un ADN puro, libre de proteínas, adecuado para su empleo en PCR, Southern blotting, análisis de restricción. El producto final, eluido de una minicolumna, se puede aplicar directamente a PCR o ser conservado a -20°C. Debido al escaso manipuleo, predominan fragmentos de entre 20-30 kpb, aunque también pueden encontrarse fragmentos de 50 kpb.

Todo 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 Protocolos es importante leer las secciones Condiciones de Conservación, Garantía, Advertencias y Preparación de los reactivos.

ADN PuriPrep-S kit

COMPONENTES DEL KIT

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

<i>Highway</i> [®] ADN PuriPrep-S kit		
Catálogo	K1205-50	K1205-250
Cantidad de muestras	50	250
Minicolumnas con tubos colectores	50	250
Soluc. isotónica de lisis eritrocitos (SILE), ml (B0206)	40	200
Buffer de lisis (BL), ml (B0202)	12	54
Proteasa liofilizada, vial (E1401)	1	5
Buffer resuspensión proteasa (BRP), ml (B0201)	1,2	6
Buffer 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

Buffer elución (BE): 10 mM Tris-HCl; 0,5 mM EDTA, pH:9,0

Agua calidad tipo 1: estéril, libre de DNasa y RNasa, 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 o 2 ml, solución salina tamponada (PBS), etanol 96-100%.

CONDICIONES DE CONSERVACIÓN

Los componentes de *Highway*[®] ADN PuriPrep-S kit (K1205-50 y K1205-250), buffers y columnas, pueden conservarse a temperatura ambiente. Únicamente merece especial cuidado la Proteasa Highway. La misma se entrega en estado liofilizado y se recomienda que una vez recibido el kit, se conserve en heladera, junto con el buffer de resuspensión. En estas condiciones, la proteasa mantendrá su actividad durante 2 años, en cambio si es expuesta a temperatura ambiente, no mayor a 25°C, la actividad se mantendrá durante 6 meses.

Una vez reconstituída en el buffer provisto (BRP), debe ser conservada en heladera permanentemente (4 a 8°C), siendo estable durante 6 meses en esas condiciones. A -20°C (freezer) se alarga la vida útil de la proteasa reconstituída, aunque si debe descongelarse con frecuencia, se recomienda el fraccionamiento en varios viales de tal manera que no se someta a congelamiento/descongelamiento más que dos veces.

GARANTÍA

Highway® ADN PuriPrep-S kit (K1205) 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. El buffer BRP contiene azida sódica. 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.

ADN PuriPrep-S kit

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.

c) Las centrifugaciones deben realizarse a temperatura ambiente (15-25°C) y los buffers de lisis y de lavados deben estar también a esa temperatura. Se recomienda equilibrar a 70°C la alícuota del buffer de elución o agua bidestilada, para obtener mejor rendimiento en la elución del ADN.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

a) Resuspensión de la Proteasa

En el kit para 50 preparaciones, al vial con el liofilizado de la Proteasa se le adiciona 1,2ml de buffer BRP. En el kit para 250 preparaciones, provisto con 5 viales de Proteasa, se recomienda reconstituir la enzima a medida que se vaya necesitando ya que es más estable liofilizada. Una vez disuelta la enzima, conservar a 4-8°C. En estas condiciones es estable hasta 6 meses. Puede aumentarse su estabilidad congelándola fraccionada a -20°C de manera que no se someta a varios congelamientos/descongelamientos.

b) Buffer de lavado 1 (BLav 1)

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	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).

c) Buffer de lavado 2 (BLav 2)

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	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 bidestilada de buena calidad (provista en el kit) y mantenerse a 4-8°C por unos pocos días. Sin embargo, si ha de conservarse por largo tiempo, es importante eluirlo en el buffer BE (también provisto en el kit) y mantenerlo a -20°C.

Respecto al rendimiento en 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 columna.

Influencia de sucesivas eluciones de 200 µl sobre el rendimiento de ADN (ug)					
muestra	volumen	elución 1	elución 2	elución 3	Total
sangre entera	200 µl	3 - 5	1 - 2	0 - 1	4 - 8
leucocitos 5 x 10 ⁶ /200 µl	200 µl	10 - 20	6 - 12	2 - 5	18 - 37

Se observa que en el caso de sangre entera, las eluciones 2 y 3 en conjunto recuperan entre 25-40% del ADN total, mientras que a partir de 5 millones de leucocitos, las eluciones 2 y 3 representan una recuperación del 50% del total.

ADN PuriPrep-S kit

La influencia del volumen de elución en la recuperación y concentración de ADN en el eluido, se indica en la Tabla siguiente, partiendo de sangre entera.

Influencia del volumen de elución en rendimiento y concentración de ADN			
Volumen elución μl	Rendimiento μg	%	Conc. ADN $\text{ng}/\mu\text{l}$
50	4,3	87,1	86,0
100	4,6	92,8	46,0
150	4,8	97,1	32,0
200	5,0	100	25,0

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. Normalmente, según los rendimientos esperados a partir de 200 μl de sangre entera, no debería diluirse la alícuota del eluido más de 2 ó 3 veces (50 μl eluido + 50 μl de BE). 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 de ADN en PCR.

Nota: Puede controlarse la extracción del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa 0.6%. A partir de 200 μl de sangre, y eluyendo en 200 μl de BE, se suele emplear 3 a 5 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 se obtiene ADN con tamaño predominante comprendido entre 20-30 kpb, aunque también se pueden encontrar fragmentos que superen los 50 kpb.

PROTOCOLO PARA MUESTRAS DE SANGRE, MÉDULA ÓSEA, LINFOCITOS, SANGRE DE CORDÓN

Acciones previas

Calibrar un baño de agua a 56°C.

Permitir que las muestras se equilibren con la temperatura ambiente (15-25°C).

Equilibrar los buffers BL, BLav 1, BLav 2, a temperatura ambiente. Equilibrar una alícuota del buffer BE a 70°C para una mejor elución del ADN.

Controlar que la Proteasa y los buffers BLav 1, BLav 2 hayan sido preparados como se indicara en “**Preparación de los reactivos**”. En el caso que el buffer BL presentara un precipitado, llevar el frasco a un baño María a 56°C hasta que se redisuelva. Luego volver a equilibrar su temperatura a 15-25°C antes de su uso.

Con 200 µl de sangre entera se suelen obtener 3-5 µg de ADN, dependiendo de las condiciones y tiempo de conservación. El empleo de la capa de sangre rica en leucocitos (interfase entre eritrocitos y plasma, luego de centrifugar sangre anticoagulada durante 10 min a 2500 g) permite obtener un rendimiento de ADN entre 4 y 7 veces superior.

Preparación de fracción rica en leucocitos

A partir de sangre entera puede prepararse una fracción enriquecida en leucocitos de manera que al aplicar 200 µl de esa suspensión celular al procedimiento descrito para sangre entera, puede incrementarse el rendimiento entre 4 a 7 veces. Para obtener esta fracción se centrifuga sangre entera a 2500 g durante 10 minutos. La capa intermedia, situada entre el plasma y el paquete de eritrocitos, constituye la fracción enriquecida en leucocitos. Extraer esta capa con micropipeta cuidando de no remover demasiado la capa inferior. No deben procesarse más de 5.000.000 de leucocitos por columna.

PROTOCOLO

1. Para cada muestra a procesar rotular un microtubo de 1,5 ml (cónico). Agregar al mismo tubo 200 µl de sangre (o médula ósea, o concentrado de leucocitos). En el caso de leucocitos no usar más de 5 millones de células. Si el volumen de muestra a procesar es menor a 200 µl, completar hasta ese volumen con PBS.

Nota: en caso que se necesite procesar el doble de muestra (400 µl), emplear 900 µl de SILE en el paso 2, sin variar las cantidades de los demás reactivos.

2. Agregar 600 µl de Solución isotónica de lisis de eritrocitos (**SILE**) y homogeneizar por inversión 3 veces. Luego de incubar 3 ó 4 minutos se observa transparencia. Centrifugar 1 minuto a 6500 g ó 5 min a 3000 g. Descartar el sobrenadante por inversión. Suele quedar un resto de 50 a 70 µl, en contacto con las células. Retirar con micropipeta parte de ese sobrenadante, dejando 10 o 20 µl para no arrastrar las células blancas del sedimento.

3. Agregar 20 µl de la **solución de Proteasa** y 150 µl de PBS. Agitar en vortex de manera de resuspender bien el sedimento celular.

4. Agregar 200 µl de buffer **BL** al microtubo. Vortexear unos segundos. Esta homogeneización es esencial para una buena lisis. Dar un pulso de 5 segundos en la microcentrífuga.

5. Incubar 10-15 minutos a 56°C. Al finalizar dar un pulso en microcentrífuga, a fin de hacer bajar las microgotas condensadas en la tapa del tubo durante la incubación.

6. Se agrega 200 µl de **etanol** (96-100%), se agita por inversión 3 veces y se repite el pulso en microcentrífuga del paso 5.

7. Ahora, el contenido del microtubo se vuelca a 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 columna con 500 μ l de buffer **BLav 2**, siguiendo las precauciones indicadas en el lavado anterior. Centrifugar 3 minutos a 12.000g. Es muy importante que se haya eliminado todo vestigio de BLav 2 de la columna ya que puede resultar inhibidor 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 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.**
11. 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, 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 bidestilada estéril libre de DNasas y RNasas, incluida en el kit.

Nota: Efectuando otra elución con 200 μ l de buffer BE se puede incrementar la cantidad de ADN recuperado de la columna 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 buffer BE para eluir, por ejemplo pasar de 200 μ l a 50 μ l, pero esto disminuye significativamente el rendimiento.

A partir de 200 μ l de sangre entera, conteniendo alrededor de 5000-6000 leucocitos por μ l, se suele obtener entre 3 a 5 μ g de ADN en 200 μ l de buffer BE (15-25 ng/ μ l).

Normalmente se emplea entre 3 y 5 μ l del ADN obtenido para una amplificación por PCR de 25 μ l de cocktail. Se aconseja que cada usuario encuentre su valor óptimo.

PROTOCOLO PARA MUESTRAS DE PLASMA, SUERO SANGUÍNEO, SALIVA, LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO Y CULTIVOS LIQUIDOS

Acciones previas

Son las mismas indicadas en el protocolo para muestras de sangre.

PROTOCOLO

1. Rotular un microtubo de 1,5 ml (cónico). Agregar al mismo 20 µl de la solución de **Proteasa** y 200 µl de muestra. Puede procesarse hasta el doble (400µl) del volumen indicado si se considerara conveniente. En ese caso se deberá duplicar también el volumen de Proteasa y buffer BL.
2. Agregar 200 µl de buffer **BL** al microtubo. Vortexear unos segundos. Esta homogeneización es esencial para una buena lisis. Dar un pulso de 5 segundos en la microcentrífuga.
3. Incubar 30 minutos a 56°C. Al finalizar dar un pulso en microcentrífuga, a fin de hacer bajar las microgotas condensadas en la tapa del tubo durante la incubación.
4. Continuar con el protocolo indicado para muestras de sangre, **a partir del paso 6.**

PROTOCOLO A PARTIR DE HISOPADO BUCAL, URETRAL Y CERVICAL

El sistema de extracción y purificación **Highway® ADN PuriPrep-S kit** es también apto para muestras obtenidas mediante hisopado bucal, uretral y cervical, con hisopos de algodón o dacrón; tamaño de cabeza 2 a 2,5 mm de diámetro.

La muestra se toma raspando con firmeza 5 veces el hisopo sobre la cara interna de cada mejilla. No usar medios de transporte. Colocar el hisopo en un tubo cerrado si ha de ser transportado. Si el hisopo pierde el exceso de humedad, resultará beneficioso en la extracción.

Equilibrar un baño de agua a 56°C. Los buffers BLav 1 y BLav 2 deben estar a temperatura ambiente y haber sido preparados como se indica en “**Preparación de los reactivos**”. Cualquier turbidez en el buffer BL desaparecerá colocándolo a 56°C unos minutos; luego equilibrar nuevamente a temperatura ambiente. Las centrifugaciones se realizan a temperatura ambiente. Equilibrar una alícuota del buffer BE a 70°C para una mejor elución del ADN.

PROTOCOLO

1. Dejar caer la cabeza del hisopo con la muestra, en un microtubo de 1,5 ó 2,0 ml, conteniendo 350 µl de PBS y 20 µl de la **solución de Proteasa** en buffer BRP.

Nota: en caso de usar hisopos de algodón, puede incrementarse el volumen de PBS a 600 µl con 20 µl de proteasa, en un microtubo de 2 ml.

2. Agregar 350 µl de buffer **BL** y agitar en vortex durante 20 ó 30 segundos.

Nota: en caso de haber empleado 600 µl de PBS en el paso anterior, usar 600 µl de BL.

3. Incubar a 56°C en baño de agua durante 10-15 minutos (incrementar a 30 minutos en caso de haber empleado 600 µl de PBS en el paso 1). Centrifugar 5 segundos para bajar las gotitas adheridas a la tapa. En este paso, se coloca el sobrenadante en un nuevo tubo, descartando el hisopo.

4. Agregar 350 μ l **etanol** (96 ó 100%), agitar bien por inversión. Centrifugar 5 segundos para bajar las gotitas de la tapa.

Nota: en caso de haber empleado 600 μ l de PBS en el paso 1, usar 600 μ l de etanol.

5. Pasar el sobrenadante anterior a una minicolumna colocada sobre un tubo colector de 2 ml (provisto), en uno o más pasos, dependiendo del volumen (capacidad máxima de columna: 700 μ l). Centrifugar 1 minuto a 12.000 g. Descartar el filtrado, colocando nuevamente la minicolumna en el tubo colector.

6. Agregar a la columna 500 μ l de **BLav 1**. Centrifugar 1 minuto a 12.000 g. Descartar el filtrado, colocando nuevamente la minicolumna en el tubo colector.

7. Adicionar 500 μ l de **BLav 2** a la columna. Centrifugar a 12.000 g durante 3 minutos. Descartar el tubo colector con el filtrado. Colocar como colector un microtubo de 1,5 ml rotulado.

8. Agregar 150 μ l de buffer **BE** (equilibrado a 70°C) sobre el centro de la membrana de sílica, sin tocarla con el tip. **Incubar 5-10 minutos a temperatura ambiente.**

9. Centrifugar 2 minutos a 12.000 g. El **ADN eluirá al microtubo**. Puede aumentarse algo el rendimiento repitiendo la operación con 100 μ l más de buffer BE pero ello reducirá la concentración de ADN en el eluido. A partir de hisopado bucal normalmente se obtiene 1-3 μ g de ADN ($A_{260}/A_{280} = 1,7 - 1,9$), 6-20 ng/ μ l. Para conservación a largo plazo, guardar a -20°C.

Nota: Si los componentes del buffer BE (10 mM Tris, 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 bidestilada estéril libre de DNasas y RNasas, incluida en el kit.

PROTOCOLO A PARTIR DE RASPADO PREPUCIAL Y MCV (MOCO CÉRVICO VAGINAL)

El sistema de extracción y purificación *Highway*[®] **ADN PuriPrep-S kit** es también apto para muestras de raspado prepucial y MCV (moco cérvico vaginal). Colocar la muestra en un tubo que contenga 5 ml de PBS estéril, conservarla refrigerada hasta su llegada al laboratorio. En caso de que el tiempo entre la toma de la muestra y su procesamiento sea mayor a 24 hs, conservarlas congeladas a – 20°C.

Acciones previas

Equilibrar un baño de agua a 60°C. Los buffers BLav 1 y BLav 2 deben estar a temperatura ambiente y haber sido preparados como se indica en “**Preparación de los reactivos**”. Cualquier turbidez en el buffer BL desaparecerá calentándolo unos minutos; luego equilibrar nuevamente a temperatura ambiente. Las centrifugaciones se realizan a temperatura ambiente. Equilibrar una alícuota del buffer BE a 70°C para una mejor elución del ADN.

PROTOCOLO

1. Agitar el tubo de PBS que contienen la muestra, dejar decantar 2 minutos. Tomar 500 µl con micropipeta utilizando tip con filtro. Colocar en un microtubo de 1,5 ml ó 2 ml.
2. Centrifugar 5 minutos a 12.000 g.
3. Descartar el sobrenadante con micropipeta utilizando tips con filtro, evitando levantar el sedimento y dejando aprox. 20-30 µl de solución.
4. Agregar 20 µl de la **solución de Proteasa** y 150 µl de PBS, agitar con vortex durante 1 minuto o hasta que el sedimento se resuspenda por completo.
5. Agregar 200 µl de buffer **BL** y agitar nuevamente con vortex. Incubar 15 minutos a 60°C.
6. Agregar 200 µl **etanol** (96 ó 100%), agitar por inversión varias veces. Centrifugar 5 segundos para bajar las gotitas de la tapa.

ADN PuriPrep-S kit

7. Pasar el contenido del microtubo a 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 µl 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 columna con 500 µl de buffer **BLav 2**, siguiendo las precauciones indicadas en el lavado anterior. Centrifugar 3 minutos a 12.000g. Es muy importante que se haya eliminado todo vestigio de BLav 2 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 microtubo de 1,5 ml rotulado. Agregar 50 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 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, 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 bidestilada estéril libre de DNAsas y RNAsas, incluida en el kit.

PROTOCOLO A PARTIR DE CÉLULAS EN CULTIVO

Cosecha de las células en cultivo.

a) Células en suspensión

Tomar una alícuota del cultivo en suspensión; determinar la concentración celular y procesar un volumen que contenga no más de 5.000.000 células (eucarióticas, de cariotipo normal). Centrifugar en microtubo a 500 g durante 5 minutos. Eliminar el sobrenadante con cuidado de no perder el sedimento celular. Resuspender las células en 200 μ l de PBS. Continuar con el protocolo.

b) Células en monocapa.

- b1) mediante tripsinización: aspirar el medio de cultivo, lavar la monocapa con PBS y descartar el líquido de lavado. Tripsinizar las células hasta que se desprendan del recipiente. Cosechar en medio de cultivo; contar las células y pasar a microtubo de 1,5 ml un volumen que no contenga más de 5.000.000 de células. Centrifugar a 700-800 g durante 5 minutos. Descartar el sobrenadante completamente, cuidando de no remover las células. Resuspender las células en 200 μ l de PBS. Continuar con el protocolo.

- b2) mediante un “policeman” de goma: trabajar la monocapa con el “policeman” de goma, desprendiendo las células adheridas al recipiente. Pasar un volumen conteniendo no más de 5.000.000 de células a un microtubo de 1,5 ml. Centrifugar a 700-800 g durante 5 minutos. Eliminar el sobrenadante cuidando de no remover el sedimento. Resuspender las células en 200 μ l de PBS. Continuar con el protocolo.

PROTOCOLO

1. Agregar 20 μ l de **solución de Proteasa** al microtubo conteniendo los 200 μ l de suspensión celular (aprox. 5.000.000 células). Homogeneizar en vortex.

2. Continuar con el protocolo indicado para muestras de sangre, **a partir del paso 4.**

PROCOLO A PARTIR DE ORINA

Acciones previas

Son las mismas indicadas en el protocolo para muestras de sangre.

Obtención de la muestra: Recolectar 2 ml de orina en un microtubo estéril. Si no se procesará inmediatamente, conservar a -20°C.

PROCOLO

1. Descongelar las muestras a temperatura ambiente, centrifugar de 5 a 10 minutos a 12.000 g. Corroborar que el pellet este presente.
2. Descartar el sobrenadante y agregar 350 µl de PBS 1X y 20 µl de la solución de la **solución de Proteasa**. Agregar 350 µl de buffer **BL** y agitar en vortex durante 20 ó 30 segundos.
3. Incubar a 56°C por 30 minutos en baño seco. Vortexear cada 15 min.
4. Dar un pulso en microcentrífuga. Agregar 350 µl de etanol (96-100%), agitar por inversión y volver a dar un pulso en microcentrífuga.
5. Pasar el sobrenadante a una minicolumna, incubar 2 minutos y centrifugar 1 minuto a 12.000 g. Descartar el filtrado y colocar nuevamente la minicolumna en el tubo colector.
6. Agregar 500 µl de Buffer **BLav1**, incubar 2 minutos y centrifugar 1 minuto a 12.000 g. Descartar el filtrado y colocar nuevamente la minicolumna en el tubo colector.
7. Agregar 500 µl de Buffer **BLav2**, incubar 2 minutos y centrifugar 3 minutos a 12.000 g. Es muy importante que se haya eliminado todo vestigio de BLav 2 de la columna ya que puede resultar inhibidor en varias técnicas a realizar con el ADN final. De ser necesario, repetir la centrifugación anterior.

8. Colocar la minicolumna en un microtubo de 2 ml rotulado. Agregar 50 μ l de Buffer BE (equilibrado a 70°C) sobre el centro de la membrana de sílica, sin tocarla con el tip. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
9. Centrifugar 2 minutos a 12.000 g. **El ADN eluira al microtubo.** Conservar a 4°C o a -20°C si no se ha de emplear en los próximos 3-5 días.

PROTOCOLO A PARTIR DE SANGRE SECA EN PAPEL DE FILTRO

Acciones previas

Son las mismas indicadas en el protocolo para muestras de sangre.

PROTOCOLO

1. A un microtubo de 1,5 ml (cónico) agregar la cantidad de papel de filtro correspondiente a una gota de sangre (recortar cuadraditos de aproximadamente 3 mm de lado), se puede aumentar la cantidad de muestra secando dos gotas de sangre superpuestas. Agregar 200 μ l de **PBS**.
2. Agregar 600 μ l de **SILE**. Invertir 3 veces. Dejar en reposo 3 ó 4 min. Centrifugar 1 minuto a 6.500 g ó 5 min a 3.000 g. Descartar el sobrenadante cuidando de no arrastrar el papel de filtro.
3. Agregar 20 μ l de **solución de Proteasa** y 150 μ l de **PBS**. Mezclar con el tip de la pipeta, asegurar que el papel de filtro quede sumergido. Incubar 1 hora a 56°C.
4. Agregar 200 μ l de buffer **BL**. Mezclar muy bien por inversión 3 veces. Dar un pulso de 5 segundos en la microcentrífuga.
5. Incubar 10 minutos a 70°C. Al finalizar dar un pulso de microcentrífuga. Continuar con el sobrenadante, pasándolo a un nuevo tubo.
6. Agregar 200 μ l de **etanol** (96-100%), agitar por inversión 3 veces. Dar un pulso de microcentrífuga.

7. Pasar el contenido del microtubo a 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 µl 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 columna con 500 µl de buffer **BLav 2**, siguiendo las precauciones indicadas en el lavado anterior. Centrifugar 3 minutos a 12.000g. Es muy importante que se haya eliminado todo vestigio de BLav 2 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 microtubo de 1,5 ml rotulado. Agregar a la minicolumna 50 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.** Centrifugar 2 minutos a 12.000 g. El incremento de volumen de BE por encima de 50 µl mejora la recuperación de ADN pero disminuye su concentración.

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. De ser necesario, puede reemplazarse el BE por el agua bidestilada pH: 9.0 (provista).

Nota: Si los componentes del buffer BE (10 mM Tris, 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 bidestilada estéril libre de DNasas y RNasas, incluida en el kit.

SOLUCIÓN DE INCONVENIENTES

Inconveniente	Posible Causa
<p>Bajo rendimiento en el ADN eluído</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Incrementar el tiempo de incubación de la proteasa (30 min a overnight) • Verificar que la proteasa resuspendida se haya conservado en heladera • Chequear que la proteasa no sea adicionada directamente al BL • Asegurarse de haber realizado una buena agitación, luego del agregado del BL y de respetar el tiempo de incubación a 56°C • Revisar que se haya adicionado etanol, antes de volcar el contenido en la minicolumna • Chequear el correcto agregado de etanol (96-100%) en los Buffers de lavado • Precalentar el Buffer BE a 70°C • Revisar que el agua empleada para eluir tenga un pH alcalino. El pH del agua del kit es pH: 9,0. • No eluir con menos de 50 µl de volumen

<p>Baja relación A_{260}/A_{280} en el eluído</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Incrementar el tiempo de incubación de la proteasa (30 min a overnight) • Verificar que la proteasa resuspendida se haya conservado en heladera • Chequear que la proteasa no sea adicionada directamente al BL • Asegurarse de haber realizado una buena agitación, luego del agregado del BL y de respetar el tiempo de incubación a 56°C • Revisar que se haya adicionado etanol, antes de volcar el contenido en la minicolumna • Chequear el correcto agregado de etanol (96-100%) en los Buffers de lavado
<p>Alta relación A_{260}/A_{280} en el eluído</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Adicionar un paso con incubación de RNAsa A antes del agregado del BL
<p>Falla en reacciones enzimáticas posteriores del ADN eluído</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Ver “Bajo rendimiento en el ADN eluído” • Presencia de inhibidores en el eluído. Ver “Baja relación A_{260}/A_{280} en el eluído” • Presencia residual de Buffer Lavado 2. Repetir centrifugación • Chequear que el orden en el que se usaron los buffers de lavado sea el indicado en el manual

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

