

K 1206



ADN Puriprep-GP kit

Extracción y purificación rápida
de ADN a partir de:

Gel de agarosa
Productos de PCR en solución

USO EN INVESTIGACION
IN VITRO



**INBIO
HIGHWAY**
- BIOLOGIA MOLECULAR -

ADN PuriPrep-GP kit

Versión 1.2
22/02/2021

Índice

Presentación	6
Importante.....	6
Componentes del kit	6
Condiciones de conservación	7
Garantía.....	7
Advertencia	7
Preparación de reactivos.....	8
Protocolo a partir del gel agarosa.....	8
Protocolo a partir de productos de PCR en solución	10
Consideraciones de interés.....	11

PRESENTACIÓN

Highway® ADN PuriPrep-GP kit (K1206) permite la extracción y purificación rápida y sencilla de fragmentos de ADN a partir de productos de amplificación por PCR en solución o a partir de geles de agarosa común o de bajo punto de fusión. Los fragmentos entre 100bp y 10.000bp se separan con una eficiencia entre 60 y 90%, siendo mayor para productos de PCR en solución respecto a los purificados a partir de gel. El kit también permite concentrar una solución diluida de ADN o cambiar el buffer en el que está disuelto.

Se obtiene un ADN puro, eluido de una minicolumna con membrana de sílica, apto para aplicaciones como secuenciación por métodos radioactivos o fluorescencia, amplificación por PCR, digestión con enzimas de restricción, hibridización, marcación, ligación.

Todo el proceso demanda no más de 30-35 minutos, dependiendo del número de muestras, y no requiere el empleo de solventes orgánicos ni fenol.

Capacidad de retención de la membrana de sílica: hasta 20 µg de ADN de doble cadena.

IMPORTANTE

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

COMPONENTES DEL KIT

Se presenta en dos versiones: para 20 y 100 extracciones/purificaciones de ADN.

Highway® ADN PuriPrep-GP kit		
Catálogo	K1206-20	K1206-100
Cantidad de muestras	20	100
Minicolumnas	20	100
Tubos colectores	20	100
Buffer extracción (BGP), ml (B0207)	14	70
Buffer lavado (BLav) conc., ml (B0208)	5,4	27
Buffer elución (BE) pH: 8,0; ml (B0205)	1,2	6
Agua bidestilada estéril pH 8,0; ml (A0101)	1,2	6

ADN PuriPrep-GP kit

Buffer elución (BE): 10 mM Tris HCl; 0,5 mM EDTA pH 8,0.

Agua bidestilada estéril, libre de DNasa y RNasa, pH 8,0.

Materiales que aportará el usuario: Microcentrífuga con rotor para viales de 1,5-2 ml; baño incubación 55°C y 70°C; micropipetas hasta 50, 200 y 1000 µl; microtubos de 1,5 ó 2,0 ml; etanol 96-100%.

CONDICIONES DE CONSERVACIÓN

Los componentes del kit **Highway® ADN PuriPrep-GP (K1206-20 y K1206-100)**, buffers y columnas, deben conservarse a temperatura ambiente (15 a 30°C).

GARANTÍA

Highway® ADN PuriPrep-GP kit (K1206) 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.

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 de lavado 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.
- 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 (varias muestras).
- c) Al procesar muestras múltiples, destapar las columnas una por vez y volverlas a tapar antes de destapar la siguiente en la gradilla.

d) No derramar los reactivos sobre el borde o tapa de la columna ya que produciría aerosoles en la microcentrifuga.

e) Se provee 1 tubo colector de 2 ml de capacidad, por cada mini columna. En él se coleccionará el buffer de extracción (BGP) y los líquidos de lavado, vaciándolo luego de cada centrifugación. La colecta final del ADN purificado se hará empleando un microtubo de 1,5 ml provisto por el usuario.

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

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

1. Buffer de lavado (BLav)

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

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

Tipo de kit	BLav conc. (ml)	Etanol (ml)	Vol. final (ml)
20	5,4	21,6	27
100	27	108	135

PROTOCOLO A PARTIR DE GEL DE AGAROSA

Este Kit puede emplearse a partir de gel de agarosa común o de bajo punto de fusión, preparado con buffer TBE o TAE. Sin embargo, debido a que el **ácido bórico** interfiere en la unión del ADN a la membrana de sílica, se obtiene **mayor rendimiento si se emplea TAE** en la preparación del gel de agarosa y para la electroforesis.

Acciones previas

- ✓ Pesar un microtubo estéril de 1,5 ó 2 ml.
- ✓ Disponer de un baño de agua a 55°C y otro a 70°C.
- ✓ El buffer de extracción (**BGP**) y el de lavado (**BLav**) deben estar a temperatura ambiente.
- ✓ Asegurarse que el **BLav** haya sido diluido con etanol (**X** en etiqueta) según indicaciones en "Preparación de reactivos".
- ✓ Se recomienda equilibrar a 70°C la alícuota del buffer de elución, para obtener mejor rendimiento en la elución del ADN.

PROTOCOLO

1. Colocar el gel de agarosa sobre el transiluminador UV de longitud de onda no menor a 300nm y usando un bisturí perfectamente limpio cortar el mínimo volumen de gel que contenga la/s banda/s de ADN a purificar (usualmente entre 100 y 200 mg). Pueden cortarse hasta 3 bandas procurando no sobrepasar los 200 mg. Introducirlo en el microtubo previamente pesado. Obtener por diferencia el peso exacto de gel.

Importante: Usar guantes de látex, delantal de mangas largas y protector facial contra UV; exponerse a la radiación UV el menor tiempo posible. Notar que también el ADN puede sufrir cortes por la acción del UV por lo que la operación debe ser rápida.

2. Agregar 300 µl de buffer **BGP** por cada 100 mg de gel de agarosa común o emplear la mitad del volumen si se tratara de agarosa de bajo punto de fusión.

3. Colocar el tubo en baño a 55°C durante 10 minutos, o hasta disolución completa del gel. Es conveniente agitar por inversión cada 2 minutos para acelerar la disolución. No se recomienda el uso del vortex para fragmentos del orden de 5kbp o más, ya que puede dañar el ADN.

Importante:

- ✓ Si el color del buffer variara al celeste, agregar 10 µl de acetato de sodio o potasio 3M pH 5, para que recupere el color (pH inferior a 7,5). Por encima de pH 7.5 - 8.0 el ADN se unirá débilmente a la membrana de sílica.
- ✓ Los restos de gel sin solubilizar obstruirían la membrana de sílica.
- ✓ Para fragmentos de ADN $\leq 500\text{pb}$ y $\geq 4\text{ kb}$, agregar 1 volumen de isopropanol para incrementar el rendimiento y luego mezclar. Por ejemplo, si se emplearon 100mg de agarosa se deben agregar 100 µl de isopropanol. No centrifugar la muestra en este punto.

4. Agregar el solubilizado anterior (no más de 700 µl) a la minicolumna con membrana de sílica, montada en un tubo colector de 2 ml (provisto). Incubar 1 minuto a temperatura ambiente. Centrifugar a 12.000 g durante 1 min. Descartar el filtrado, colocando nuevamente la minicolumna en el tubo colector. Si el volumen de solubilizado superara los 700 µl, el resto podrá aplicarse a la columna repitiendo el ciclo de centrifugación.

5. Agregar sobre las paredes de la minicolumna 600 µl de buffer de lavado (**BLav**), cuidando que el tip no toque la membrana. Centrifugar 1 min a 12.000g. Descartar el filtrado y colocar la columna nuevamente en el tubo colector.

6. Repetir el lavado anterior en las mismas condiciones. Vaciar el tubo colector y colocar la columna en él.

7. Centrifugar 3 minutos a 12.000 g para asegurarse de la eliminación de rastros de buffer BLav.

8. Colocar la minicolumna en un microtubo estéril de 1,5 ml rotulado. Dejar la columna destapada por 15 minutos para evaporar restos de etanol.
9. Agregar 50 µl de buffer **BE** (se recomienda equilibrarlo a 70°C) directamente sobre el centro de la membrana de sílica, sin tocarla con el tip. Incubar 5- 10 minutos a temperatura ambiente.
10. Centrifugar 2 minutos a 12.000g. **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: 8,0) fueran incompatibles con alguna 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 PRODUCTOS DE PCR EN SOLUCIÓN

Acciones previas

- ✓ Disponer de un baño de agua a 70°C.
- ✓ El buffer de extracción (**BGP**) y el de lavado (**BLav**) deben estar a temperatura ambiente.
- ✓ Asegurarse que el **BLav** haya sido diluído con etanol (**X** en etiqueta) según indicaciones en “Preparación de reactivos”.
- ✓ Al momento de usar, es recomendable que la alícuota del buffer de elución (**BE**) esté equilibrada a 70°C, para obtener un mejor rendimiento en la recuperación de ADN.

PROTOCOLO

1. Rotular un microtubo de 1,5 ml. Agregar al mismo 10 a 100 µl del producto final de PCR (evitando arrastrar aceite mineral, aunque mínimas cantidades de éste no interfieren). Agregar 5 veces volúmenes de buffer **BGP** y mezclar bien (máximo 500 µl).

***Nota:** este mismo protocolo se puede seguir en caso de que la muestra de ADN se tratase de productos de digestión con enzimas de restricción que se desearan concentrar o cambiar el buffer de restricción.*

2. Agregar la mezcla anterior en la minicolumna con membrana de sílica, montada en un tubo colector de 2 ml (provisto). Incubar 1 minuto a temperatura ambiente. Centrifugar 1 min a 12.000 g. Descartar el filtrado, colocando nuevamente la minicolumna en el tubo colector.

ADN PuriPrep-GP kit

3. Agregar sobre las paredes de la minicolumna 600 µl de buffer de lavado (**BLav**), cuidando que el tip no toque la membrana. Centrifugar 1 min a 12.000g. Descartar el filtrado y colocar la columna nuevamente en el tubo colector.
4. Repetir el lavado anterior en las mismas condiciones. Vaciar el tubo colector y colocar la columna en él.
5. Centrifugar 3 minutos a 12.000 g para asegurarse de la eliminación de rastros de BLav.
6. Colocar la minicolumna en un microtubo estéril de 1,5 ml rotulado. Dejar la columna destapada por 15 minutos para evaporar restos de etanol.
7. Agregar 30-50 µl de buffer **BE** (se recomienda equilibrarlo a 70°C) directamente sobre el centro de la membrana de sílica, sin tocarla con el tip. **Incubar 5- 10 minutos a temperatura ambiente.**
8. 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 BE (10 mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA pH: 8,0) fueran incompatibles con alguna 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.

CONSIDERACIONES DE INTERÉS

- ✓ Si el rendimiento en la recuperación de ADN fuera bajo puede deberse a una deficiente elución. El ADN no se desprenderá de la membrana de sílica a pH ácido. De emplearse otro buffer, distinto al BE provisto, asegurarse que sea alcalino (pH 8.0-8.5). Para fragmentos de ADN superiores a 5kpb es imprescindible precalentar el buffer BE a 70°C antes de adicionarlo a la mini columna.
- ✓ En la electroforesis emplear buffer TBE o TAE fresco (se recomienda TAE). El uso repetido de éstos los hace más alcalinos, pudiendo interferir en la recuperación de ADN.
- ✓ Evitar operaciones drásticas (enérgica agitación por vortex) cuando se procesan fragmentos de ADN superiores a 5kbp ya que puede desnaturalizarse y permanecer de simple cadena en el eluido, dificultando algunas aplicaciones posteriores. De sospecharse esta situación, calentar el ADN eluido 2 minutos a 95°C y dejar enfriar lentamente a temperatura ambiente para permitir la renaturalización.

INBIO HIGHWAY S.A.

Serrano 1414 - (7000) - Tandil - Argentina

Dir. Téc. Dra. Yanil R. Parma

Tel: +54 (249) 442 0193

Habilitado por ANMAT.

contacto@inbiohw.com.ar

www.inbiohw.com.ar



PRODUCIDO
EN ARGENTINA

ES UN PRODUCTO DE

