

K 1209



ADN PuriPrep-B kit

Extracción y purificación rápida
de ADN a partir de bacterias

USO EN INVESTIGACION
IN VITRO



ADN PuriPrep-B kit

ADN PuriPrep-B kit

ÍNDICE

Presentación.....	6
Importante.....	6
Componentes del kit.....	6
Condiciones de conservación.....	7
Garantía.....	7
Advertencias.....	8
Preparación de reactivos.....	8
El proceso de elución del ADN puro.....	10
Cuantificación del ADN.....	10
Protocolo para muestras de bacterias.....	11
Protocolo para bacterias Gram Negativas.....	12
Protocolo para bacterias Gram Positivas.....	13
Solución de inconvenientes.....	14

PRESENTACIÓN

Highway® ADN PuriPrep-B kit (K1209-50 y K1209-250) permite la extracción y purificación rápida y sencilla de ADN genómico a partir de bacterias.

Se obtiene un ADN puro, libre de proteínas, que coeluye de una minicolumna de sílica con RNA, 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. Luego de la lisis bacteriana con proteinasa K y lisozima (en el caso de Gram Positiva) 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-B kit		
Catálogo	K1209-50	K1209-250
Cantidad de muestras	50	250
Minicolumnas	50	250
Tubos colectores	50	250
Buffer resuspensión bacterias (BRB), ml (B0223)	10	50
Buffer de tejidos (BT), ml (B0202)	11	50
Buffer de lisis (BL), ml (B0220)	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 calidad tipo I pH: 9.0, ml (A0101)	12	60

ADN PuriPrep-B kit

Buffer elución (BE): 10 mM Tris HCl, 0,5 mM EDTA, pH: 9.0.

Agua calidad Tipo I: 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 a 37°C, 56°C y 70°C; micropipetas hasta 50, 200 y 1000 µl; microtubos de 1,5 ó 2,0 ml; buffer TE pH: 8,0, solución salina tamponada (PBS); RNasa A (recomendado); etanol 96-100%, lisozima (E1405) en caso de bacterias Gram Positivas.

CONDICIONES DE CONSERVACIÓN

Highway® ADN PuriPrep-B kit (K1209) buffers y columnas, deben conservarse a temperatura ambiente (15-30°C)

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.

En caso de emplear la lisozima *Highway* (E1405) (no incluida en el kit), se recomienda conservarla a 4°C. Una vez resuspendida en agua bidestilada estéril deberá conservarse a -20°C.

GARANTÍA

Highway® ADN PuriPrep-B kit (K1209) 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 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 (15-30°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 bidestilada, para obtener mejor rendimiento en la elución del ADN.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

- **Resuspensión de la lisozima (no incluida en el kit)**

Al vial conteniendo 200 mg de lisozima liofilizada (E1405) se le adiciona 1 ml de agua bidestilada estéril. Una vez reconstituída, se recomienda conservarla a -20°C.

Si debe descongelarse con frecuencia, se aconseja fraccionarla a fin de evitar sucesivos congelamientos/descongelamientos

ADN PurIPrep-B kit

- **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. Una vez resuspendida conservar a -20°C.

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

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 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).

- **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 calidad tipo I (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.

La tabla siguiente muestra el rendimiento obtenido del ADN a partir de cultivos de 12-16hs de Gram Positivas y Gram Negativas:

Gram negativas	Volumen de cultivo	Rendimiento total de ADN
<i>Escherichia coli</i> DH1 (1,2 x 10 ⁹ UFC/ml)	2 ml	16-20 µl
Gram positivas		
<i>Bacillus choshinensis</i> (1,3 x 10 ⁸ UFC/ml)	2 ml	4-6 µl
<i>Staphylococcus aureus</i> (2 x 10 ⁸ UFC/ml)	2 ml	8-10 µl

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.

ADN PurIPrep-B kit

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.

PROTOCOLO PARA MUESTRAS DE BACTERIAS

Acciones previas:

Calibrar un baño de agua a 37°C, 56°C y 70°C (para mayor rendimiento de ADN).

Permitir que las muestras se equilibren con la temperatura ambiente (15-30°) al igual que los buffers **BRB**, **BT**, **BL**, **BLav 1**, **BLav 2**. Equilibrar una alícuota del BE a 70°C para una mejor elución del ADN.

Controlar que los buffers **BLav 1** y **BLav 2** 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 redisuelva. Luego volver a equilibrar su temperatura a 15-30°C antes de su uso.

PROTOCOLO PARA BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

1. Partir de 2 ml de cultivo crecido durante 12-16 hs de bacteria Gram Negativa. Centrifugar a 10.000 g, 5 min y descartar el sobrenadante.
2. Resuspender el pellet bacteriano con 1 ml buffer TE y volver a repetir la centrifugación anterior. Descartar el sobrenadante.
3. Resuspender el pellet con 180 µl de Buffer **BRB**. Incubar 30 min a 37°C.
4. Agregar 200 µl de Buffer **BT** y 20 µl de solución de proteinasa K. Mezclar con vortex. Incubar 30 min a 56 °C.
5. Si se requiere ADN libre de ARN (recomendado), adicionar 4 µl de RNasa A (10 mg/ml), agitar e incubar durante 30 min a 37°C.
6. Agregar 200 µl 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 seg. luego del agregado del buffer BL. Dar un pulso de 5 segundos en la microcentrífuga.
7. 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.
8. Agregar 200 µl de etanol (96-100%), agitar por inversión 3 veces y repetir el pulso en microcentrífuga del paso 5.
9. 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.
10. 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.

ADN PurIPrep-B kit

11. Lavar la columna con 500 µl 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 columna, ya que puede resultar inhibitorio en varias técnicas a realizar con el ADN final. De ser necesario, repetir la centrifugación anterior.

12. Descartar el tubo colector y colocar la columna en un microtubo de 1,5 ml rotulado. Agregar 200 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.

13. 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.

PROTOCOLO PARA BACTERIAS GRAM POSITIVAS

1. Partir de 2 ml de cultivo crecido durante 12-16 hs de bacteria Gram Positiva. Centrifugar a 10.000 g, 5 min y descartar el sobrenadante.

2. Resuspender el pellet bacteriano con 1 ml buffer TE y volver a repetir la centrifugación anterior. Descartar el sobrenadante.

3. Resuspender el pellet con 162 µl de Buffer **BRB** y 18 µl de la lisozima resuspendida (no incluida en el kit). Incubar 30 min a 37°C.

Nota: Para la mayoría de las bacterias Gram Positivas, el tratamiento con lisozima es suficiente para debilitar la pared celular. Sin embargo, muchas especies de Staphylococcus requieren un tratamiento adicional con 1 mg/ml de lisostafina (no incluida en el kit) para que la lisis sea eficiente.

Continuar con el paso 4 del protocolo para Gram Negativas.

SOLUCIÓN DE INCONVENIENTES

Inconvenientes	Posibles causas y/o sugerencias
<p>Poco rendimiento de ADN en el eluido</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Baja concentración de bacterias en el cultivo procesado. Partir de un cultivo fresco con buena agitación durante 12-16 hs. - Deficiente resuspensión del pellet bacteriano con el buffer BRB. - Deficiente lisis bacteriana. Asegurarse de respetar las condiciones y temperaturas de incubación indicadas en el manual. - Adición incorrecta del etanol (96-100%) en los buffers de lavado. - Asegurarse de haber empleado el buffer BE o agua provista en el kit para la elución. Si no es así, asegurarse de que el mismo sea alcalino (pH: 8.0-8.5)
<p>Bajo cociente A260/A280</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Asegurarse la correcta incubación de la suspensión bacteriana con la proteínasa K. Chequear su correcta conservación según indicaciones del manual. - Adición incorrecta del etanol (96-100%) en los buffers de lavado. - Lisis deficiente. Asegurarse la completa resuspensión del pellet bacteriano y respetar los tiempos y temperaturas de incubación.
<p>Alto cociente A260/A280</p>	<ul style="list-style-type: none"> - El buffer BL se adicionó antes del agregado de la RNasa A. - Alta concentración de ARN en el eluido. Proceder a la incubación con la RNasa A.

INBIO HIGHWAY

Serrano 1414 - (7000) - Tandil - Argentina

Tel: +54 (249) 442 0193

Dir. Téc. Dra. Yanil R. Parma

Habilitado por ANMAT

contacto@inbiohw.com.ar

www.inbiohw.com.ar



PRODUCIDO
EN ARGENTINA

ES UN PRODUCTO DE

