



PURO | Plásmido

Purificación de ADN plasmídico



PB-L
Productos
Bio-Lógicos®

Innovación y Desarrollo en Biotecnología

<http://www.pb-l.com.ar>

PURO | Plásmido

Cat. no. SA01

Contenido del Kit:

Contenido	SAxx01 50 reac.	SAxx02 100 reac.
Solución 1	15 ml	30 ml
Solución 2	15 ml	30 ml
Solución 3	20 ml	40 ml
Solución 4	10 ml (+ 30 ml de EtOH 96%)	20 ml (+ 60 ml de EtOH 96%)
Solución 5	5 ml	10 ml
RNasa A (10 mg/ml)	75 µl	150 µl
Columnas y tubos colectores	50	100
Manual	1	1

Equipamiento y reactivos adicionales requeridos

- Micropipetas
- Microcentrífuga con velocidad mínima de 5000 xg
- Microtubos de 1,5 ml estériles

Almacenamiento

Almacenar a temperatura ambiente todos los componentes del kit excepto la Solución 1 (**con la Ribonucleasa adicionada**) que se recomienda almacenar a 4 °C.

En caso de no armar la Solución 1 con RNasa, almacenar la RNasa A entre 4 °C y -20 °C hasta el momento de uso.

Nota: almacenar la Solución 2 a menos de 10 °C genera la precipitación del SDS. En caso de observar precipitado incubar

la solución a 65 °C durante 10 min.

Rendimiento

Fuente	Rendimiento	Observaciones
<p>Cultivo: 3 ml de cultivo líquido de <i>E. coli</i> (DH5α, DO₆₀₀ = 3) en medio LB.</p> <p>Plásmido: PBL-T (origen de replicación de alto número de copia).</p>	<p>10-12,5 μg (rendimiento máx. 20 μg)</p>	<p>El rendimiento máximo se obtiene a partir de plásmidos con origen de replicación de alto número de copia. Sin embargo, el rendimiento puede variar dependiendo de diferentes factores tales como: características de la construcción plasmídica, tipo de cepa, volumen de cultivo, densidad celular y medio de cultivo.</p>

Garantía de satisfacción

Productos Bio-lógicos garantiza el correcto funcionamiento de sus productos al ser utilizados según la descripción que se indica en el manual del usuario correspondiente.

Es responsabilidad del usuario determinar la conveniencia del producto para su uso particular.

En el caso de no obtener un correcto funcionamiento del producto por cualquier otra razón que no sea el uso erróneo, Productos Bio-lógicos repondrá sin cargo el producto o devolverá el monto del producto.

En el caso de que el producto no cumpla sus expectativas o tenga dudas respecto de su funcionamiento, comuníquese con el área de servicio técnico, serviciotecnico@pb-l.com.ar.

Controles de calidad

Los productos de Productos Bio-lógicos han sido sometidos a estrictos controles de calidad para satisfacer los requerimientos de nuestros clientes.

Manejo de las columnas de purificación

Para la correcta performance de las columnas de purificación, y para evitar contaminación cruzada entre productos se recomienda:

- Incorporar la muestra a la columna de purificación sin tocar con el tip la resina.
- Si el volumen a incorporar a la columna es menor a 100 μ l, tenga la precaución de depositarlo en el medio del anillo que sostiene la resina.
- Cambiar el tip de uso entre muestras.
- Para evitar la contaminación cruzada, recomendamos centrifugar brevemente los tubos luego de cada agitación con vortex, de esta manera se eliminan las gotas en la tapa del tubo.
- Siempre cerrar la tapa de las columnas de purificación antes del paso de centrifugación.
- Utilizar guantes en todo momento. Si el guante entra en contacto con alguna muestra, descartarlos.
- Abrir una columna de purificación a la vez, evitando la generación de aerosoles y la contaminación cruzada de muestras.

Recomendaciones de uso

• Si detecta bajo rendimiento

- 1- Comprobar el número de copias del plásmido. Para plásmidos de bajo número de copias se recomienda partir de mayor cantidad de cultivo (> 10 ml) y/o utilizar un kit de midiprep.
- 2- Las características inherentes de cada construcción plasmídica (toxicidad, tamaño, etc.) y de cada cepa

pueden afectar el número de moléculas de plásmido por célula.

- 3- Controlar que el cultivo sea fresco, no más de 16 hs a 37 °C, 220 rpm. Se recomienda utilizar medio LB.
- 4- Controlar la etapa de resuspensión del *pellet* de bacteria. Asegúrese de que no haya quedado *pellet* sin resuspender, agitar con vórtex hasta obtener una solución homogénea.
- 5- Verificar que en la etapa de lisis (**Solución 2**) se haya logrado obtener una solución completamente translúcida. Incubar las células mezclando por inversión hasta lograrlo.
- 6- Asegurarse de que la **Solución 4** contenga el volumen de etanol indicado.
- 7- Asegurarse de agregar la **Solución 5** de elución en el centro de la membrana de la columna.
- 8- No utilizar volúmenes de elución menores a 30 μ l, dado que esto afecta significativamente el rendimiento de recuperación de plásmido.

- **Si detecta presencia de RNA**

Comprobar que se haya agregado la RNasa A en la **Solución 1** y que el almacenamiento de la misma haya sido a 4 °C.

- **Si detecta bandas de plásmido lineal**

Controlar que en la etapa de lisis no se utilice *vórtex*. Mezclar la **Solución 2** mediante inversión del tubo hasta obtener una solución translúcida.

- **Bajo índice A_{260}/A_{280}**

Algunos medios de cultivo contienen componentes con afinidad a la membrana de las columnas del kit y pueden interferir con el índice de absorbancia 260/280 nm. Se recomienda utilizar medio de cultivo LB.

Para obtener plásmidos ultrapuros y eliminar posibles trazas de proteínas o moléculas interferentes, se recomienda lavar el *pellet* de células con TE o agua antes de agregar **Solución 1** y realizar el paso de lavado opcional con **Solución 4**.

- **Masa inicial de células**

Tener en cuenta que la cantidad de células utilizadas es un parámetro importante para obtener buenos rendimientos de plásmidos. Para plásmidos de alto número de copias recomendamos centrifugar 1 - 4,5 ml de cultivo de cepas de *E. coli* crecidas en medio LB ($DO_{600} = 2 - 4$). Sin embargo, para cepas crecidas en medios más ricos como TB o SOC puede utilizarse 1 - 3 ml de cultivo para obtener el mismo rendimiento.

Este producto está desarrollado únicamente para investigación, no para diagnóstico o tratamiento de enfermedades, ni para comida, cosméticos, etc.

Información de seguridad



Solución 3

Introducción

El kit PURO Plásmido está diseñado para la extracción y purificación plasmídica a partir de cultivos líquidos de *E. coli*. No requiere etapas de extracción orgánica ni precipitación de ADN. La purificación de plásmidos se realiza mediante una columna que contiene una matriz basada en sílica, que permite separar los ácidos nucleicos de las proteínas y restos celulares. Este sistema permite obtener moléculas plasmídicas ultrapuras en

menos de 15 min. listas para ser utilizadas en técnicas de digestión, marcado enzimático, clonado, amplificación por PCR, transcripción *in vitro* y secuenciación. Este sistema funciona para plásmidos de hasta 20.000 pb.

Protocolo

Todos los pasos de centrifugación son realizados a temperatura ambiente.

Realizar la purificación a partir de **1 – 4,5 ml de cultivo de *E. coli***.

1. Recolectar las células mediante centrifugación a 12.000 \times g durante 1 min y descartar todo el sobrenadante.
2. **(Agregar 75 μ l de la solución de RNasa cada 15 ml de la Solución 1)**. Resuspender las células en **250 μ l de Solución 1** y homogeneizar con *vórtex* hasta que todo el *pellet* esté bien disgregado.
3. Agregar **250 μ l de Solución 2** y homogeneizar suavemente mediante repetidas inversiones del tubo. La suspensión debe tornarse completamente transparente. No incubar durante más de 5 min. con la Solución 2.
4. Agregar **350 μ l de Solución 3** y homogeneizar por inversión inmediatamente. Verificar la formación de abundante precipitado de color blanco.
5. Centrifugar a 12.000 \times g durante 10 min y transferir el sobrenadante a la columna de purificación, evitando arrastrar restos del precipitado blanco.

6. Centrifugar la columna de purificación a 8.000 ×g durante 30 segundos, descartar el filtrado y volver a colocar la columna en el tubo colector.
 7. Agregar **750 µL de Solución 4 (verificar el agregado de Etanol 96% según especificaciones)** y centrifugar a 8.000 ×g durante 30 seg., descartar el filtrado y volver a colocar la columna en el tubo recolector.
- Opcional:* realizar un nuevo lavado con **250 µL de Solución 4**, centrifugar a 8.000 ×g durante 30 seg., descartar el filtrado y volver a colocar la columna en el tubo colector. Este paso permite eliminar trazas de proteínas y endotoxinas.
8. Centrifugar a 12.000 ×g durante 1 minuto para eliminar todo resto de Solución 4.
 9. Colocar la columna en un microtubo de 1,5 ml estéril, agregar **50 µl de Solución 5 o H₂O (dd estéril)** en el centro de la membrana de la columna y centrifugar a 8.000 ×g durante 1 min. El ADN recuperado puede ser almacenado a -20 °C o utilizado en el momento.

