PURO | Bacteria DNA

Purificación de ADN genómico de bacterias

PB-L
Productos
Bio-Lógicos®

Innovación y Desarrollo en Biotecnología

PURO|Bacteria DNA

Cat. no. SA07

Contenido del Kit:

Contenido	SA0701 50 reac.	SA0702 100 reac.
Solución BR	15 ml	30 ml
Solución BA	15 ml	30 ml
Solución BB	6 ml (+ 24 ml de EtOH 96%)	12 ml (+ 48 ml de EtOH 96%)
Solución BC	20 ml	40 ml
Proteinasa k (20 mg/ml)	1 ml	2x1 ml
Columnas y tubos colectores	50	100
Manual	1	1

Equipamiento y reactivos adicionales requeridos

- Solución fosfato (PBS)
- Microcentrífuga
- RNasa A (10 mg/ml)
- Etanol (96 - 100%)
- Lisozima
- Micropipetas
- Microtubos de 1,5 ml estériles

Almacenamiento

Almacenar a temperatura ambiente todos los componentes del kit, lejos de sustancias químicas y fuentes de polvo. Para una óptima conservación durante periodos prolongados, conservar la Proteinasa K a -20°C

Rendimiento

Fuente	DNA obtenido
Cultivo Bacteriano (10^6 - 10^8 cells)	5 - 20 µg

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 µl, 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

1. Se debe evitar la congelación y descongelación repetidas de las muestras almacenadas, ya que esto reduce el tamaño del ADN.
2. Si se ha formado un precipitado en la solución BA, incubar a 56 °C hasta que el precipitado se haya disuelto completamente.
3. Todos los pasos de centrifugación deben realizarse en una microcentrífuga de mesa convencional a temperatura ambiente (15-25 °C).

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

Información de seguridad

Solución BA

Proteinasa K

Introducción

PURO Bacteria DNA se basa en la tecnología de membrana de sílice y en un sistema tampón especial para muchos tipos de extracción de ADNg de muestras. La columna hecha de membrana de sílice puede unirse al ADN de manera óptima en condiciones de sal y pH dadas. El simple proceso de centrifugación elimina por completo los contaminantes y los inhibidores enzimáticos, como las proteínas y los cationes divalentes. El ADN purificado se eluye en solución tampón de baja concentración salina o en agua, y está listo para ser utilizado en aplicaciones posteriores (análisis de restricción, análisis de PCR, ensayos de *Southern blot* y biblioteca de ADNc).

Protocolo

Asegúrese de que la Solución BB se haya preparado con el volumen apropiado de etanol (96 - 100%) como se indica en la botella y agite bien.

1. Recolectar las células (1 a 5 ml de cultivo bacteriano) mediante centrifugación a 12.000 ×g durante 1 min y descartar todo el sobrenadante.
2. Agregar **200 µl de Solución BR**. Mezclar vigorosamente.
   Nota: para las bacterias Gram-positivas difíciles de romper, puede omitir el Paso 2 y agregar lisozima. El método específico es: agregar 180 µl de solución de lisis enzimática (Tris-HCl 20 mM, pH 8.0; EDTA sódico 2 mM; Triton® X-100 al 1.2%; agregar lisozima a 20 mg/ml inmediatamente antes de usar) e incubar por al menos 30 min a 37 °C. Opcional: tratamiento con RNasa de la muestra. Agregar 4 µl de RNasa A (10 mg/ml), mezclar por vórtex e incubar durante 5 minutos a

temperatura ambiente (15-25 °C).

3. Agregar **20 µl de Proteinasa K**. Mezclar vigorosamente.
4. Agregar **220 µl de Solución BA** a la muestra. Mezclar vigorosamente e incubar a 70 °C durante 10 min para obtener una solución homogénea. Centrifugar brevemente el tubo para eliminar las gotas del interior de la tapa. **Nota: no agregar la Proteinasa K directamente a la Solución BA.**
5. Agregar **220 µl de etanol** (96 - 100%) a la muestra y mezcle bien por vórtex durante 15 seg. Se puede formar un precipitado blanco con la adición de etanol. Centrifugar a 10.000 ×g durante 2 minutos para eliminar las gotas del interior de la tapa.
6. Transferir la mezcla del paso 5 en la columna de purificación (en el tubo colector) y centrifugue a 12,000 rpm (~ 13,400 ×g) durante 30 seg. Desechar el filtrado y volver a colocar la columna en el tubo colector.
7. Agregar **500 µl de Solución BB (preparada con el volumen apropiado de etanol 96 - 100%)** a la columna y centrifugar a 12,000 rpm (~ 13,400 ×g) durante 30 seg. Luego desechar el filtrado y volver a colocar la columna en el tubo colector.
8. Centrifugar a 12,000 rpm (~ 13,400 ×g) durante 2 min para secar la membrana completamente. **Nota: restos de etanol de la solución BB pueden afectar el resultado de aplicaciones posteriores.**
9. Colocar la columna en un nuevo tubo de centrífuga limpio de 1,5 ml y agregar **50 - 200 µl de Solución BC o agua destilada** directamente al centro de la membrana. Incubar a temperatura ambiente (15-25 °C) durante 2 a 5 min y luego centrifugar durante 2 min a 12,000 rpm (~ 13,400 ×g).

   Nota: si el volumen de elución es inferior a 50 µl, puede afectar la eficiencia de recuperación. Además, el valor de pH de la

solución de elución tendrá cierta influencia en la misma, por lo que sugerimos elegir la Solución BC o agua destilada (pH 7.0 - 8.5) para eluir el DNAg. Para el almacenamiento a largo plazo del DNA, se recomienda eluir en Solución BC y almacenar a -20 °C, ya que el ADN almacenado en agua está sujeto a hidrólisis ácida.

9. Un segundo paso de elución con otros **50 - 200 µl de solución BC** puede incrementar el rendimiento de DNAg.