

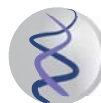
PURO | Plásmido

Purificación de ADN plasmídico



PB-L
Productos
Bio-Lógicos

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



PURO | Plásmido

Cat. no. SA01

Contenido del Kit:

Contenido	SA0101 50 reac.	SA0102 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
Columnas Centrifugación	50	100
Tubos Descarte 2 ml	50	100
Manual	1	1

Componentes no incluidos

Micropipetas

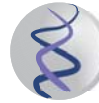
Microcentrífuga con velocidad mínima de 5000 xg

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.

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.



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 20000 pb.

Rendimiento de ADN

Fuente	Rendimiento	Observaciones
Cultivo: 3 ml de cultivo líquido de <i>E. coli</i> (DH5 α , DO ₆₀₀ = 3) en medio LB. Plásmido: PBL-T (origen de replicación de alto número de copia).	10-12,5 μ g. (rendimiento máx. 20 μ g)	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.

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 12000 xg durante 1 min y descartar todo el sobrenadante.
2. (**Agregar 75 µl de la solución de RNAsa cada 15 ml de la Solución 1**). Resuspender las células en **250 µL de Solución 1** y homogeneizar con vortex hasta que todo el pellet esté bien disgregado.
3. Agregar **250 µL 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 µL de Solución 3** y homogeneizar por inversión inmediatamente. Verificar la formación de abundante precipitado de color blanco.
5. Centrifugar a 12.000 xg 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 xg durante 30 segundos, descartar el filtrado y volver a colocar la columna en el tubo recolector.
7. Agregar **750 µL de Solución 4 (verificar el agregado de Etanol 96% según especificaciones)** y centrifugar a 8.000 xg 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 xg durante 30 seg., descartar el filtrado y volver a colocar la columna en el tubo recolector. Este paso permite eliminar trazas de proteínas y endotoxinas.



8. Centrifugar a 12.000 xg 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 ó H₂O (dd estéril)** en el centro de la membrana de la columna y centrifugar a 8.000 xg durante 1 min. El ADN recuperado puede ser almacenado a -20 °C o utilizado en el momento.

Recomendaciones

- **Si detecta bajo Rendimiento**

- 1- Comprobar el número de copia 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 260/280nm. 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 medio más ricos como TB o SOC puede utilizarse 1 - 3 ml de cultivo para obtener el mismo rendimiento.