



PURO Stool

Para purificación de ADN
genómico de muestras fecales.



PB-L
Productos
Bio-Lógicos®

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



PURO Stool

Cat. N° SA13

Contenidos del kit

Contenido	SA1301 50 preps	SA1302 100 preps
Tubos con Beads	50	100
Solución S1	4,5 ml	9 ml
Solución S2	20 ml	40 ml
Solución S3	15 ml	30 ml
Solución S4	90 ml	2 x 90 ml
Solución S5	20 ml (+ 20 ml de Etanol 96%)	40 ml (+ 40 ml de Etanol 96%)
Solución S6	10 ml	20 ml
Columnas y tubos colectores	50	100
Manual	1	1

Almacenamiento

PURO Stool puede ser almacenado a temperatura ambiente (20 - 25 °C) y es estable durante 24 meses.

Introducción

PURO Stool proporciona un método de minipreparación de ADN genómico rápido y simple para aplicaciones de laboratorio de rutina del área de biología molecular. El kit utiliza la tecnología de columnas con membrana de sílice, donde el ADN es retenido en la misma, mientras que los contaminantes, como proteínas y otros componentes orgánicos, se eliminan de manera eficiente. El kit contiene un primer paso de disrupción mecánica y química de la muestra utilizando partículas de granate (Garnet Beads).

Esto maximiza la recuperación de ADN, especialmente en muestras altamente granuladas.

El ADN purificado es adecuado para ser utilizado como molde de PCR, para la digestión con enzimas de restricción, generación de bibliotecas, técnicas de hibridación como *Southern Blot* o para secuenciación.

Notas Importantes

1. Se debe evitar la congelación y descongelación repetida de las muestras almacenadas, ya que esto reduce el tamaño de las moléculas de ADN genómico.
2. Asegúrese de que la Solución S5 haya sido preparado con el volumen apropiado de etanol (96-100%), como se indica en la botella y agite bien.
3. Todos los pasos de centrifugación deben llevarse a cabo en una microcentrífuga de mesa convencional a temperatura ambiente (20 - 25 °C).

El producto está desarrollado solo para investigación, no para el diagnóstico o tratamiento de una enfermedad, ni para la comida o los cosméticos.

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 muestras 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.

Información de seguridad



Tubos con Beads y Solución S4

Componente determinado como dañino:



Tiocianato de guanidinio.

Protocolo

Asegúrese de que la Solución S5 haya sido preparada con el volumen apropiado de etanol (96-100%), como se indica en la botella y agite bien.

1. Pesar hasta 250 mg o 200 μ l de muestra e incorporarla dentro del tubo con las *Garnet Beads*.
Nota: si la muestra es en aspecto muy heterogénea, es importante realizar una disrupción previa de la misma de forma mecánica, de manera de homogenizarla, tal que la muestra que sea procesada sea representativa. Si no fuera posible la homogenización, se recomienda pesar los 250 mg a partir de distintas fracciones/localizaciones de la muestra.
2. Si la muestra posee alto contenido de agua, se recomienda remover el líquido contenido en el tubo con las *Garnet Beads*, y almacenarlo temporalmente en un nuevo tubo de 1,5 ml estéril. Una vez removido el líquido del tubo con las *Garnet Beads*, incorporar la muestra al mismo y centrifugar a 10.000 xg durante 1 minuto (este paso permite que los microorganismos presentes en la fase acuosa de la muestra precipiten). Una vez realizada la centrifugación remover la mayor cantidad de líquido posible e incorporar nuevamente la solución almacenada temporalmente en el tubo de 1,5 ml.
3. Agregar al tubo con las *Garnet Beads* y la muestra pesada, 60 μ l de **Solución S1**. Mezclar suavemente con vortex.
Nota: si observa un precipitado en la **Solución S1**, incúbelo a 55 °C hasta lograr su total homogenización.

4. Agitar los tubos con vórtex u homogenizador a máxima velocidad durante 10 minutos. Se recomienda utilizar un adaptador para tubos de 1,5 ml de manera que los mismos se agiten en posición horizontal.

Nota: la ruptura mecánica es crítica para la eficiencia de recuperación de ADN. Por lo tanto variaciones en este paso pueden afectar el rendimiento global del proceso.

Asegúrese de que las *Garnet Beads* se muevan libremente por el tubo durante la etapa de agitación.

Un método de ruptura alternativo (especialmente si los microorganismos presentes en la muestra son difíciles de romper) incluye la incubación durante 10 minutos a 70 °C de la muestra luego del agregado de la **Solución S1**, seguido por el paso de ruptura mecánica.

5. Centrifugar los tubos a 10.000 xg durante 1 minuto.
6. Recuperar el sobrenadante y transferir el mismo a un nuevo tubo de 1,5 ml.
7. Agregar 250 µl de **Solución S2** y agitar con vortex. Incubar a 4 °C durante 10 minutos.
8. Centrifugar los tubos a 10.000 xg durante 1 minuto.
9. Recuperar el sobrenadante y transferir el mismo a un nuevo tubo de 1,5 ml (no recuperar volúmenes mayores a 600 µl).
10. Agregar 200 µl de **Solución S3** y agitar con vortex. Incubar a 4 °C durante 10 minutos.
11. Centrifugar los tubos a 10.000 xg durante 1 minuto.
12. Recuperar el sobrenadante y transferir el mismo a un nuevo tubo de 2 ml (no recuperar volúmenes mayores a 750 µl).
13. Agregar 1200 µl de **Solución S4** y agitar con vortex.

Nota: Agitar la **Solución S4** antes de usar, para su correcta homogenización.

14. Incorporar el resultado del paso 13 a la columna de sílica y centrifugar los tubos a 10.000 xg durante 1 minuto. La columna de sílica puede contener hasta 750 µl, por lo que probablemente sea necesario repetir tres veces este procedimiento, tal que todo el volumen obtenido en el paso 13 sea incorporado a la columna de sílica.

Descartar el líquido contenido en el colector de columna.

15. Lavar la columna de sílica con 750 µl de **Solución S5**. Centrifugar los tubos a 10.000 xg durante 1 minuto.

Nota: asegúrese de que la **Solución S5** haya sido preparada con el volumen apropiado de etanol (96-100%), como se indica en la botella y agite bien.

16. Descartar el líquido contenido en el colector de columna y centrifugar nuevamente los tubos a 10.000 xg durante 1 minuto, para eliminar residuos de etanol.

17. Descartar el colector de columna, y colocar la columna de sílica en un nuevo tubo de 1,5 ml.

18. Eluir el ADN con 100 µl de **Solución S6**. Centrifugar los tubos a 10.000 xg durante 1 minuto.

Nota: si el volumen de solución de elución es menor a 100 µl aumenta la concentración de ADN obtenido, sin embargo esto disminuye de manera significativa el rendimiento del procedimiento.

Es posible eluir el ADN en agua bidestilada estéril, aunque sugerimos utilizar la **Solución S6** (la mismo no contiene EDTA), dado que el pH levemente alcalino (pH 8) de la misma maximiza el rendimiento.

19. Opcional: repetir el paso de elución en un tubo nuevo, agregando nuevamente 100 µl de **Solución S6**.

20. Almacenar el ADN a -20 °C o -80 °C.

Nota: para analizar la calidad e integridad del ADN obtenido, se recomienda evaluar por electroforesis en gel de agarosa sembrando un 10% del volumen obtenido. En el caso de que el contenido de ácidos nucleicos de la muestra sea muy bajo, se recomienda concentrar el mismo mediante una precipitación alcohólica.

