

PURO | Genomic DNA/RNA

Purificación de ARN/ADN total a partir
de muestras biológicas



PB-L
Productos
Bio-Lógicos®

Innovación y Desarrollo en Biotecnología

PURO | Genomic DNA/RNA

Cat. no. SA17

Contenido del kit:

Contenido	SA1701 50 reac.	SA1702 100 reac.
Buffer A	10 ml	20 ml
Buffer B	10 ml (+ 40ml de EtOH 96%)	20 ml (+ 80ml de EtOH 96%)
Buffer C	10 ml	20 ml
Proteinasa K (20 mg/ml)	1 ml	2 × 1 ml
Carrier ARN	620 µg	620 µg
ddH ₂ O libre de RNAsas	1 ml	1 ml
Columnas de Centrifugación	50	100
Tubos Colectores 2 ml	50	100
Manual	1	1

Equipamiento y reactivos adicionales requeridos

Buffer fosfato salino (PBS)
Microcentrífuga
Baño térmico
Tips con filtro
Tubos 1,5 ml libres de RNAsas
Etanol 96 %

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

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 centro de la membrana.
- 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.

Preparación de la solución de Carrier ARN

- Agregar 620 µl de ddH₂O libre de RNasas al tubo conteniendo 620 µg de Carrier liofilizado para obtener una solución de 1 µg/µl. Disolver el Carrier completamente, dividirlo en alícuotas de tamaño adecuado y almacenar a -20°C. No congelar-descongelar las alícuotas de Carrier más de 3 veces.
- El Carrier no puede ser disuelto directamente en el Buffer A. Debe ser disuelto primero en ddH₂O libre de RNasas y luego agregado al Buffer A.
- Solución de trabajo de Carrier: Calcular el volumen de mezcla Buffer A/Carrier requerido para cada conjunto de muestras, mediante selección del número de muestras a ser procesadas simultáneamente a partir de la tabla 1. Para un número mayor de muestras, los volúmenes pueden ser calculados usando los

siguientes cálculos:

$$n \times 0,2 \text{ ml} = y \text{ ml}$$

$$n \times 6\mu\text{l} = z \mu\text{l}$$

n = número de muestras a ser procesadas simultáneamente

y = volumen calculado de Buffer A

z = volumen de Carrier/ddH₂O libre de RNAsas que se debe agregar al Buffer A

Número de Muestras	Vol. Buffer A (ml)	Vol. Carrier ARN/ddH ₂ O libre de RNAsas (μl)
1	0,2	6
2	0,4	12
3	0,6	18
4	0,8	24
5	1	30
6	1,2	36
7	1,4	42
8	1,6	48
9	1,8	54
10	2	60

Tabla 1 Volúmenes de mezcla Buffer A y Carrier ARN/ddH₂O libre de RNAsas requerido para el procedimiento

Nota: Mezclar el Buffer A con la solución de Carrier ARN por inversión (No usar vortex para evitar la formación de burbujas).

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

Información de seguridad



Solución A



Proteinasa K

Introducción

PURO Genomic DNA/RNA está basado en la tecnología de membranas de sílica junto a un sistema de soluciones que permite la extracción de ARN y ADN de muestras biológicas (células en cultivo, tejido, sangre completa, suero, plasma, saliva, muestras libres de células). Las columnas que incluyen el kit pueden unir ácidos nucleicos de manera selectiva respecto a otros componentes celulares. Mediante un proceso simple de centrifugación se eliminan por completo los contaminantes e inhibidores enzimáticos, como proteínas, cationes divalentes u otros. Los ácidos nucleicos purificados se recuperan en un buffer de baja salinidad o agua, listo para su uso en aplicaciones posteriores.

Notas Importantes

- Se debe evitar la congelación y descongelación repetida de las muestras almacenadas, de manera de reducir la degradación de los ácidos nucleicos.
- Si se observa un precipitado en el Buffer A, caliente la solución a 50-60 °C hasta que el precipitado se haya disuelto por completo.
- Todos los pasos de centrifugación deben llevarse a cabo en una microcentrífuga de mesa convencional a temperatura ambiente (15-25 °C).

Antes de comenzar:

- Resuspender y alicuotear (en caso de que corresponda) el carrier utilizando el vial de ddH₂O libre de RNAsas.
- Preparar el Buffer B, agregando el volumen de etanol (96-100%) indicado en la botella, y rotular en la misma la ejecución de este paso.
- Encender el baño térmico a 60°C

Protocolo

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

- a)** Para muestras de **sangre, suero, plasma, saliva**, agregar 200 µl de sangre entera al tubo de microcentrífuga. Si el volumen de muestra es inferior a 200 µl, completar el volumen agregando PBS 1x (buffer salino fosfato).
 - b)** Para **cultivo celular**, cosechar 5×10^6 células y centrifugar durante 5 min a 500 xg en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Eliminar el medio y vuelva a suspender el pellet celular en 200 µl de PBS 1x.
 - c)** Para muestra de **tejido**, cortar hasta 100 mg de tejido y colocarlo en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, y agregar 200 µl de PBS 1x.
 - d)** Para **muestras libres de células**, agregar 200 µl de la muestra al tubo de microcentrífuga. Si el volumen de la muestra es menor a 200 µl, agregar el volumen apropiado de PBS 1x.
- Agregar 20 µl de **Proteinasa K** (20 mg/ml), mezclar con vortex.

3. Agregar 200 µl de **Buffer A** a la muestra, mezclar bien con vortex e incubar a 60 °C durante 15 min para obtener una solución homogénea. Centrifugar brevemente 5 segundos (*spin down*) el tubo de microcentrífuga de 1,5 ml para eliminar las gotas del interior de la tapa.

Nota: No agregar la Proteinasa K directamente al buffer A.

4. Agregar 200 µl de etanol (96-100%) a la muestra y mezclar bien con vortex durante 15 seg.

Nota: En ocasiones puede formarse un precipitado al agregar etanol.

5. Agregar la mezcla del paso 4 en la columna con la membrana de sílica (armada con el tubo de recolección de 2 ml) incluyendo el precipitado que pueda haberse formado, y centrifugar a 12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) durante 30 segundos. Desechar el eluato y colocar la columna nuevamente en el tubo de recolección.

6. Agregar 500 µl de **Buffer B** (preparado con el volumen apropiado de etanol 96-100%) a la columna, y centrifugar a 12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) durante 30 seg, luego desechar el eluato y colocar la columna en el tubo de recolección.

7. Centrifugar a 12,000 rpm ($\sim 13,000 \times g$) por 2 min para secar completamente la membrana.

Nota: Residuos de etanol en la columna pueden afectar los resultados obtenidos en aplicaciones posteriores.

8. Colocar la columna de centrifugación en un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 ml limpio y agregar 50-200 µl de **Buffer C** o ddH₂O libre de RNasas (precalentada a 60 °C) directamente en el centro de la membrana. Incubar a temperatura ambiente

(15-25 °C) durante 2-5 min, y luego centrifugar durante 2 min a 12,000 rpm (~ 13,000 ×g).

Nota: si el volumen del buffer de elución es menor a 30 µl, puede afectar el rendimiento de recuperación.

9. Opcional: Agregar 0,5 µl de inhibidor de RNAsas (40 U/µl) luego de la elución y conservar a -80 °C.