

HIGH PURITY DANAPLASMID MIDI/MAXI KIT

REF.0702.4 25 Midis

REF.0702.5 10 Maxis

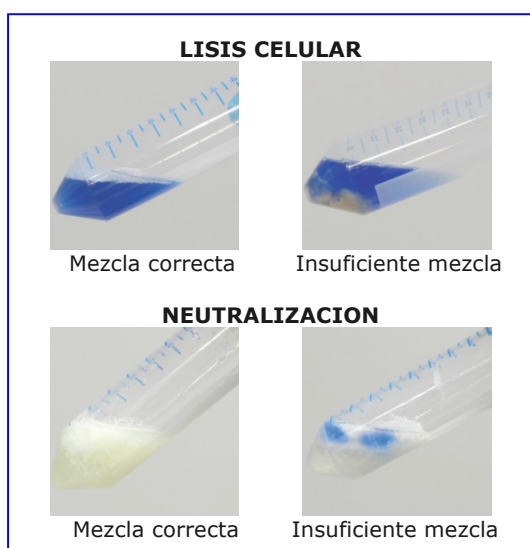
1. INTRODUCCION

DANAGENE PLASMID Midi/Maxiprep Kit proporciona un método simple para purificar **ADN plasmídico a partir de cultivos de E.coli de 25-150 ml.**

Este kit combina el uso del método de lisis alcalina con el uso de **columnas de intercambio aniónico** para purificar **ADN plasmídico grado transfección.**

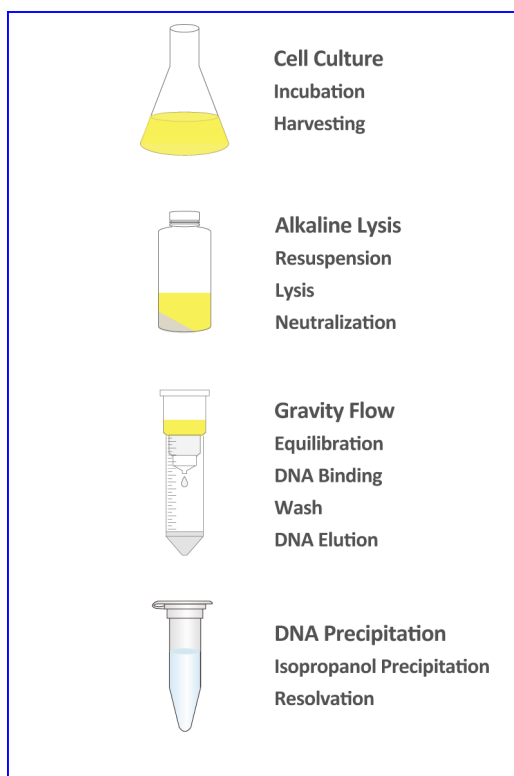
Introduce el **TrueBLUE Lysis control reagent** un indicador de color que proporciona una identificación visual de una óptima mezcla de los tampones. Previene errores que conducen a una eficiente lisis celular o un incompleta precipitación del SDS, ADN genómico o restos celulares. Esto es ideal para investigadores que no tienen mucha experiencia con la preparación de plásmidos y para investigadores con experiencia que desean asegurar un máximo rendimiento.

Visualización de una eficiente lisis celular y precipitación del SDS utilizando el TrueBLUE Lysis control reagent



Características:

- Basado en columnas de intercambio aniónico.
- Elevada pureza: ADN plasmídico grado transfección.
- Columnas disponibles: MIDI (25-50 ml high-copy plasmids / 100ml low-copy plasmids) and MAXI (100-150 ml high-copy plasmids / 500ml low-copy plasmids).
- Incluye filtros especiales para una optima eliminación de los desechos celulares a partir del lisado.



2. COMPONENTES

Producto	REF: 0702.4	REF: 0702.5	Tª stock
Tampón de Resuspensión	110 ml	110 ml	4°C
Tampón de Lisis	110 ml	110 ml	RT
Tampón de Neutralización	110 ml	110 ml	4°C
Tampón de Equilibración PEQ	130 ml	130 ml	RT
Tampón de Lavado PW	360 ml	360 ml	RT
Tampón de Elución PEL	220 ml	130 ml	RT
TRUEBLUE Lysis control reagent	1500 µl	1500 µl	RT
Plasmid Midi / Maxi Columns	25 columnas	10 columnas	RT
RNasa (50 mg/ml)	200 µl	200 µl	4°C
Filtros de papel	25 filtros	10 filtros	RT

2.1 Equipos y reactivos necesarios y no suministrados

- * Etanol 70 %.
- * Centrifuga y tubos para recolectar los cultivos bacterianos y precipitar el ADN capaces de velocidades > 15.000 x g.
- * Tubos para recoger y precipitar el ADN plasmídico eluido.
- * Isopropanol.
- * TE.

3. PROTOCOLO

3.1 Condiciones preeliminarias

Varios factores pueden influir en la obtención del ADN plasmídico. Estos incluyen el número de copias de vector, el inserto de ADN, la cepa huésped, condiciones de crecimiento y el medio.

	MIDI	MAXI
Binding Capacity	100 µg	500 µg
High-copy plasmids culture volume	25-50 ml	100-150 ml
Low-copy plasmids culture volume	100 ml	500 ml

3.2 Preparaciones preliminares

- Añadir la RNasa suministrada al Tampón de Resuspensión y conservar a 4°C.
- Verificar que la Solución de Lisis no tiene SDS precipitado debido a las bajas temperaturas. Si es necesario, disolver el SDS calentando a 37°C.

3.3 Protocolo para extracción de ADN plasmídico a partir de HIGH-COPY PLASMID > 20 copias/célula

MIDI (25-50ml) / MAXI 100-150 ml)

1. Preparar un cultivo bacteriano

Empezar aislando una colonia bacteriana a partir de una placa e inocular un cultivo iniciador de 2-5 ml de caldo LB que contenga el antibiótico apropiado. Incubar durante aproximadamente 8h a 37°C con agitación constante (aprox.300 rpm). Diluir el cultivo iniciador 1/500 o 1/1000 en un medio selectivo, crecer a 37°C durante 12-16 horas con agitación constante (aprox.300 rpm).

2. Recolectar las células bacterianas.

Recolectar las células bacterianas centrifugando a **6,000 x g durante 15 min at 4°C**. Cuidadosamente descartar el sobrenadante.

3. Lisis Celular

a) Resuspender el pellet bacteriano en **4 ml / 10 ml** de **Tampón de Resuspensión (+RNasa A) +40 µl/ 100µl de TRUEBLUE Lysis control reagent asegurándose de la completa resuspensión de las células**. Una incompleta resuspensión en este paso producirá un bajo rendimiento de ADN. Utilizar un tubo de centrifuga capaz de soportar altas velocidades.

NOTA: Preparar suficiente Solución de Resuspensión / TRUEBLUE Lysis control reagent para el número de preparaciones que se han de realizar. Se formará un precipitado después de la adición del TRUEBLUE lysis control reagent que no afectará. Agite para su disolución.

b) Añadir **4 ml / 10 ml Tampón de Lisis** a la suspensión . Suavemente invertir el tubo 8-10 veces hasta que la mezcla aparezca clara y viscosa. No utilizar vortex. Se puede incubar 3 minutos, pero nunca más de 5 minutos.

c) Añadir **4 ml / 10 ml Tampón de Neutralización (4°C)** a la suspensión . Suavemente invertir el tubo 8-10 veces hasta que se forme una suspensión homogénea que contenga un floculado blanco. Se recomienda la **incubación durante 10-15 minutos en hielo**. Equilibrar la columna durante este periodo de tiempo.

4. Equilibrar la columna

Equilibrar una **MIDI / MAXI** Columna con **5 ml / 10 ml Tampón de Equilibración**. Permitir que la columna se llene por gravedad y eliminar el líquido que fluye a través de la columna.

5. Clarificar el lisado.

Clarificar el lisado siguiendo una de las 2 siguientes opciones descritas a continuación.

Este paso es extremadamente importante; un exceso de flóculos en la suspensión puede obturar la columna en los siguientes pasos.

Opción 1: Filtrar la suspensión. Colocar un filtro (suministrados) en un pequeño embudo, humedecer el filtro con algunas gotas de Tampón de equilibración o agua libre de nucleasas. Añadir el lisado bacteriano y recoger el líquido que fluye en un tubo libre de nucleasas. Este método produce un lisado limpio pero el rendimiento de ADN plasmídico puede ser menor que con el método de centrifugación aunque es un método más rápido y sin flóculos residuales.

Opción 2: Centrifugar la suspensión. Centrifugar a $>15,000 \times g$ durante **30 min / 40 min** a 4°C. Si la suspensión contiene floculados residuales después de la primera centrifugación, repetir este paso.

6. Unir el ADN plasmídico a la columna.

Añadir el lisado clarificado del paso 5 a la columna equilibrada. Permitir que el líquido fluya por gravedad.

7. Lavar la columna.

Lavar la columna con **12 ml / 36 ml de Tampón de Lavado** . Eliminar el líquido que fluye a través de la columna.

8. Eluir el ADN

Eluir el ADN plasmídico con **8ml / 12 ml Tampón de Elución** y recolectar la muestra por gravedad en un tubo de centrifugación libre de nucleasas. Precipitar el eluido tan pronto como sea posible, de todas formas, puede ser almacenado a 4°C durante varias horas. En este caso, es muy importante que el eluido alcance la temperatura ambiente antes de la precipitación del ADN plasmídico

9. Precipitar el ADN

Añadir **6 ml / 9 ml de isopropanol** para precipitar el ADN plasmídico. Mezclar con cuidado y centrifugar a **15,000 x g durante 30 min a 4°C**. Cuidadosamente eliminar el sobrenadante para no perder ADN plasmídico.

10. Lavar y secar el pellet de ADN.

a. Añadir **2 ml / 5 ml 70% etanol** al pellet como se indica a continuación. Vortex breve y centrifugar a **15,000 x g durante 10 min** .

b. Cuidadosamente eliminar todo el etanol del tubo con una punta de pipeta, permitir secar el pellet **10-20 min a temperatura ambiente (20-25°C)**. No sobresecar el pellet ya que sino el ADN será difícil de resuspender.

11. Resuspender el ADN

Redisolver el pellet de ADN plasmídico en una cantidad apropiada de TE o agua libre de nucleasas con constante y suave agitación durante 10-60 minutos o redisolver el pellet lavando las paredes para recuperar todo el ADN plasmídico, especialmente si se utilizan tubos de vidrio para centrifugar.

3.4 Protocolo para extracción de ADN plasmídico a partir de LOW-COPY PLASMID < 20 copias/célula

MIDI (10-100 ml) / MAXI (100-500 ml)

Si se trabaja con vectores "low copy", será beneficioso incrementar los volúmenes de los tampones para aumentar la eficiencia de la lisis alcalina y de esta forma el rendimiento del ADN plasmídico. Si se necesita cantidades adicionales de tampones, sus composiciones se suministran en el apéndice A.

1. Preparar un cultivo bacteriano

Empezar aislando una colonia bacteriana a partir de una placa e inocular un cultivo iniciador de 2-5 ml de caldo LB que contenga el antibiótico apropiado. Incubar durante aproximadamente 8h a 37°C con agitación constante (aprox.300 rpm). Diluir el cultivo iniciador 1/500 o 1/1000 en un medio selectivo, crecer a 37°C durante 12-16 horas con agitación constante (aprox.300 rpm).

2. Recolectar las células bacterianas.

Recolectar las células bacterianas centrifugando a **6,000 x g durante 15 min at 4°C**. Cuidadosamente descartar el sobrenadante.

3. Lisis Celular:

a) Resuspender el pellet bacteriano en **8 ml / 24 ml** de **Tampón de Resuspensión (Rnasa A) +80 µl/ 240 µl de TRUEBLUE Lysis control reagent asegurándose de la completa resuspensión de las células**. Una incompleta resuspensión en este paso producirá un bajo rendimiento de ADN. Utilizar un tubo de centrifuga capaz de soportar altas velocidades.

NOTA: Preparar suficiente Solución de Resuspensión / TRUEBLUE Lysis control reagent para el número de preparaciones que se han de realizar. Se formará un precipitado después de la adición del TRUEBLUE lysis control reagent que no afectará. Agite para su disolución.

b) Añadir **8 ml / 24 ml** de **Tampón de Lisis** a la suspensión . Suavemente invertir el tubo 8-10 veces hasta que la mezcla aparezca clara y viscosa. No utilizar vortex. Se puede incubar 3 minutos, pero nunca más de 5 minutos.

c) Añadir **8 ml / 24 ml** de **Tampón de Neutralización** a la suspensión. Suavemente invertir el tubo 8-10 veces hasta que se forme una suspensión homogénea que contenga un floculado blanco. Se recomienda la **incubación durante 10-15 minutos en hielo**. Equilibrar la columna durante este periodo de tiempo.

4. Equilibrar la columna

Equilibrar una **MIDI / MAXI** Columna con **5 ml / 10 ml** **Tampón de Equilibración**. Permitir que la columna se llene por gravedad y eliminar el líquido que fluye a través de la columna.

5. Clarificar el lisado.

Clarificar el lisado siguiendo una de las 2 siguientes opciones son descritas a continuación. **Este paso es extremadamente importante;** un exceso de flóculos en la suspensión puede obturar la columna en los siguientes pasos.

Opción 1: Filtrar la suspensión. Colocar un filtro en un pequeño embudo, humedecer el filtro con algunas gotas de Tampón de equilibración o agua libre de nucleasas. Añadir el lisado bacteriano y recoger el líquido que fluye en un tubo libre de nucleasas. Este método produce un lisado limpio pero el rendimiento de ADN plasmídico puede ser menor que con el método de centrifugación aunque es un método más rápido y sin flóculos residuales.

Opción 2: Centrifugar la suspensión. Centrifugar a $>15,000 \times g$ durante **30 min / 40 min** a 4°C . Si la suspensión contiene floculados residuales después de la primera centrifugación, repetir este paso.

6. Unir el ADN plasmídico a la columna.

Añadir el lisado clarificado del paso 5 a la columna equilibrada. Permitir que el líquido fluya por gravedad.

7. Lavar la columna.

Lavar la columna con **12 ml / 30 ml de Tampón de Lavado**. Eliminar el líquido que fluye a través de la columna.

8. Eluir el ADN

Eluir el ADN plasmídico con **8 ml / 12 ml Tampón de Elución** y recolectar la muestra por gravedad en un tubo de centrifugación libre de nucleasas. Precipitar el eluido tan pronto como sea posible, de todas formas, puede ser almacenado a 4°C durante varias horas. En este caso, es muy importante que el eluido alcance la temperatura ambiente antes de la precipitación del ADN plasmídico

9. Precipitar el ADN

Añadir **6 ml / 9 ml de isopropanol** para precipitar el ADN plasmídico. Mezclar con cuidado y centrifugar a **15,000 x g durante 30 min a 4°C** . Cuidadosamente eliminar el sobrenadante para no perder ADN plasmídico.

10. Lavar y secar el pellet de ADN.

a. Añadir **2 ml / 5 ml 70% etanol** al pellet como se indica a continuación. Vortex breve y centrifugar a **15,000 x g durante 10 min**.

b. Cuidadosamente eliminar todo el etanol del tubo con una punta de pipeta. permitir secar el pellet **10-20 min a temperatura ambiente ($20-25^{\circ}\text{C}$)**. No sobresecar el pellet ya que sino el ADN será difícil de resuspender.

11. Resuspender el ADN

Redisolver el pellet de ADN plasmídico en una cantidad apropiada de TE o agua libre de nucleasas con constante y suave agitación durante 10-60 minutos o redisolver el pellet lavando las paredes para recuperar todo el ADN plasmídico, especialmente si se utilizan tubos de vidrio para centrifugar.

APENDICE A:

Tampón de resuspensión: 50mM Tris.Cl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 100 μg Rnasa A.

Disolver 6.06 gr Tris base, 3.72 gr $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 800 ml agua destilada. Ajustar el pH a 8.0 con HCl. Ajustar el volumen a un 1 litro con agua destilada. Añadir 100 μg Rnasa A.

Tampón de Lisis: 200 mM NaOH, 1% SDS (w/v)

Disolver 8.0 gr NaOH pellets en 950 ml agua destilada, 50 ml 20% SDS(w/v) solución. El volumen final debería ser de 1 litro.

Tampón de Neutralización: 3.0 M acetato de potasio, pH 5.5

Disolver 294.5 gr acetato potásico en 500 ml agua destilada. Ajustar el pH a 5.5 con glacial ácido acético glacial (aprox 110 ml). Ajustar el volumen a 1 litro con agua destilada.