



INBIO HIGHWAY S.A.
Serrano 1414 (7000) Tandil
Tel/Fax: +54 (249) 4420193
contacto@inbiohw.com.ar
www.inbiohw.com.ar

Kit EASY PLANT PCR DIRECTO *Highway*

Presentación

El kit (K1211) contiene:

- 2 viales con 1,25 ml c/u de Master Mix 2X Easy Plant (M030) para 200 reacciones x 25 µl ó 100 reacciones x 50 µl
- 1 vial con 150 µl de Mix Primers control positivo (M200)
- 3 viales con 1,4 ml c/u de Buffer de lisis (B0510)
- 1 vial con 1,8 ml de agua ultrapura para PCR (A0103)

Descripción

El Kit Easy Plant PCR directo (K1211) permite realizar la reacción de PCR directamente a partir de plantas mediante lisis de hojas o semillas, sin necesidad de purificación previa del ADN.

El kit incluye una Master mix 2X, que contiene todos los componentes necesarios para realizar la PCR de punto final (buffer de reacción, MgCl₂, dNTPs, Taq T-Plus). El buffer de reacción está especialmente diseñado para neutralizar la acción de posibles inhibidores presentes en la muestra. Esta mix permite además la siembra directa en gel de agarosa tras la amplificación debido a la presencia de dos colorantes. Esto no afecta aplicaciones posteriores del amplicón como secuenciación, enzimas de restricción, ligación. La concentración final de MgCl₂ será de 1,5 mM.

Se provee de agua calidad biología molecular y de un par de primers correspondientes a una región conservada del ADN del cloroplasto para ser empleados como control positivo u optimizar las condiciones de la reacción, si fuera necesario. Se incluye un buffer de lisis/dilución para preparación de muestras difíciles y/o realizar múltiples reacciones de una misma muestra.

PROTOCOLOS

1. CONTROL POSITIVO

a. Preparación del cocktail de PCR para el CONTROL POSITIVO

Para 25 µl volumen final de reacción:

REACTIVO	VOLUMEN	CONCENTRACIÓN FINAL
MINT Master Mix 2X Easy Plant <i>Highway</i> (M030)	12,5 µl	1X
Mix Primers Control Positivo <i>Highway</i> (M200)	1,3 µl	0,26 µM
Agua ultrapura <i>Highway</i> (A0103)	c.s.p 25 µl	
MUESTRA	Porción de hoja-semilla o 0,5 µl de lisado	

b. Programa de termociclado

Duración total: 26 min

Tamaño del amplímero: 297 pb

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización Inicial	94°C	5 min	1
Desnaturalización	94°C	5 seg	40
Annealing	62°C	5 seg	
Extensión	72°C	20 seg	
Extensión final	72°C	1 min	1

2. MUESTRAS

a. Preparación del cocktail de PCR para las muestras

Para 25 µl volumen final de reacción:

REACTIVO	VOLUMEN	CONCENTRACIÓN FINAL
MINT Master Mix 2X Easy Plant Highway (M030)	12,5 µl	1X
Primer Forward 10 µM	1,25-2,5 µl	0,5-1 µM
Primer Reverse 10 µM	1,25-2,5 µl	0,5-1 µM
Agua ultrapura Highway (A0103)	c.s.p 25 µl	
MUESTRA	Porción de hoja- semilla o 0,5 µl de lisado	

b. Preparación de muestras de HOJAS

-Por PCR directo

Permite realizar una única amplificación, colocando la muestra directamente en el cocktail de PCR.

Preferentemente elegir hojas frescas y jóvenes, aunque también pueden usarse muestras conservadas en heladera o congeladas. A partir de la hoja seleccionada cortar un trocito de aproximadamente 0.5 mm de lado, empleando un bisturí; colocar la muestra en un vial conteniendo el cocktail de PCR aplastándolo contra en fondo del vial con el tip de la pipeta de manera de disgregarlo ligeramente. Si se procesarán varias muestras diferentes, limpiar bien el bisturí entre muestra y muestra. Mantener los viales en frío hasta su termociclado. Cuidar que la muestra haya quedado sumergida en la mix. En el termociclado es aconsejable una desnaturalización de 5 min en el paso inicial para completar la liberación del ADN de la muestra.

- Por Lisis/Dilución previa

Empleando el Buffer de lisis/dilución, se extrae el ADN de la muestra que es suficiente para realizar varias PCRs.

En este caso cortar un trocito de hoja de 2 mm de lado y colocarlo en un vial con 20 µl de Buffer de lisis/dilución. Tratar de disgregarlo sobre el fondo con el tip de la pipeta como en el procedimiento anterior. La solución se tornará verdosa. Eliminar los restos de la hoja por centrifugación. Guardar el sobrenadante a -20°C para largo tiempo o a 4°C durante una semana. Usar 0.5 µl de este lisado para una PCR de 25 µl de volumen final o variar según los resultados obtenidos con el control positivo o con la amplificación específica. Recordar que la Master mix 2X provista contiene agentes que neutralizan la acción de inhibidores de PCR de una gran variedad de especies aunque también depende del grado de dilución de la muestra en el Buffer de lisis/dilución. Mantener los viales en frío hasta su termociclado.

c. Preparación de muestras de SEMILLAS

El rendimiento en la extracción de ADN depende de la naturaleza de cada semilla, porcentaje de humedad, contenido lipídico y de carbohidratos. Se recomienda para el caso de semillas el protocolo por lisis y dilución previa.

- Por PCR directo

En el caso de partir de semillas secas, la hidratación previa facilita la toma de la muestra. Con un bisturí de punta fina separar la capa externa de la semilla y extraer un trocito del interior no mayor a este tamaño (●); colocarlo directamente en un vial conteniendo el cocktail de PCR y tratar de disgregarlo contra en fondo y paredes del vial con el tip de una pipeta. Mantener los viales en frío hasta su termociclado. Cuidar que la muestra haya quedado sumergida en la mix. En el termociclado es aconsejable una desnaturalización de 5 min en el paso inicial para completar la liberación del ADN de la muestra.

- Por Lisis/Dilución previa

Empleando un bisturí de punta fina tomar una muestra del interior de la semilla de aproximadamente este tamaño (●); colocarlo en 20 μ l de Buffer de lisis/dilución y vortexear 10 a 15 segundos. Dejar 3 a 4 min a temperatura ambiente cuidando que restos de la muestra hayan quedado sumergidos en el buffer. Luego de una breve centrifugación, pasar el sobrenadante a un nuevo vial y usar 0.5 μ l para una PCR de 25 μ l final. El volumen de templado podrá depender del tipo de semilla. La conservación del lisado puede hacerse a -20°C para largo plazo o a 4°C para usar dentro de la semana.

Conservación: -20°C. El buffer de dilución puede conservarse a 4°C

Para uso en investigación *in vitro*.