

Protocolo laboratorial para purificação manual de ADN de amostra com 0,5 mL

Para a purificação do ADN genómico através das famílias de kits de recolha Oragen® e ORAcollect®.

Visite o nosso website em www.dnagenotek.com para obter informações sobre protocolos e em idiomas adicionais.

O protocolo passo a passo seguinte descreve como purificar ADN de uma alíquota de 500 µL proveniente de uma amostra.

Reagentes incluídos

- prepiT®•L2P (N.º de catálogo: PT-L2P)

Equipamento e reagentes

- Microcentrífuga capaz de funcionar a 15 000 g
- Microtubos de 1,5 mL (por ex., Axygen #MCT-150-C)
- Incubador a ar ou a água a 50° C
- Etanol (95% a 100%) à temperatura ambiente
- Etanol (70%) à temperatura ambiente
- Tampão de armazenamento de ADN: Solução de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) ou solução similar

Procedimento

Passos para a purificação	Notas
1. Misture a amostra no <i>kit</i> DNA Genotek através de inversão e agite suavemente durante alguns segundos.	<ul style="list-style-type: none">• Deste modo é assegurado que as amostras viscosas são misturadas adequadamente.
2. Incube a amostra a 50° C num incubador a água durante um período mínimo de 1 hora ou num incubador a ar durante um período mínimo de 2 horas. Note: Poderá ser preferencial a utilização de um incubador a ar, uma vez que os tubos das amostras podem flutuar num banho de água. Se tiver de ser utilizado um banho de água, garanta que a parte do tubo que contém a amostra permanece submersa em água.	<ul style="list-style-type: none">• Este passo de tratamento térmico é essencial para garantir que o ADN é libertado de forma adequada e que as nucleases são desativadas permanentemente.• Este passo de incubação pode ser executado em qualquer altura depois de a amostra ter sido recolhida e antes de ser purificada.• A amostra completa tem de ser incubada no tubo de recolha original antes da constituição de alíquotas para garantir a homogeneidade da amostra.• A amostra poderá ser incubada a 50° C de um dia para o outro, se for mais conveniente.• É necessário mais tempo num incubador a ar porque o equilíbrio térmico é mais lento do que num incubador a água.
3. Transfira 500 µL da amostra misturada para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL.	<ul style="list-style-type: none">• A parte restante da amostra pode ser armazenada à temperatura ambiente ou congelada (15° C a 20° C).

Passos para a purificação	Notas
4. Nos 500 µL da amostra, adicione 20 µL (1/25 do volume) de PT-L2P ao tubo de microcentrifuga e misture em vortex durante alguns segundos.	<ul style="list-style-type: none"> A amostra tornar-se-á turva uma vez que as impurezas e os inibidores são precipitados.
5. Incube em gelo durante 10 minutos.	<ul style="list-style-type: none"> A incubação à temperatura ambiente pode ser substituída mas será menos eficaz a remover as impurezas.
6. Centrifugue à temperatura ambiente durante 5 minutos a 15 000 g.	<ul style="list-style-type: none"> Um período mais longo de centrifugação (até 15 minutos) poderá ser benéfico na redução da turvação (A₃₂₀ elevado) da solução de ADN final.
7. Transfira cuidadosamente o sobrenadante limpo com a ponta de uma pipeta para um tubo de microcentrifuga novo. Elimine o grânulo que contém impurezas.	<ul style="list-style-type: none"> O grânulo contém impurezas turvas. Se for acidentalmente perturbado, o tubo deverá ser novamente centrifugado.
8. A 500 µL de sobrenadante, adicione 600 µL de etanol de 95% a 100% à temperatura ambiente. Misture suavemente por inversão 10 vezes.	<ul style="list-style-type: none"> Durante a mistura com etanol, o ADN será precipitado. Esta situação poderá aparecer sob a forma de um aglomerado de fibras de ADN ou como um precipitado fino, dependendo da quantidade de ADN existente na amostra. Mesmo se não for visto um aglomerado, o ADN será recuperado seguindo cuidadosamente estes passos seguintes.
9. Permita que a amostra repouse à temperatura ambiente durante 10 minutos para que o ADN se precipite completamente.	<ul style="list-style-type: none"> Não se recomenda a incubação a -20° C porque as impurezas podem se coprecipitar com o ADN.
10. Coloque o tubo na microcentrifuga numa orientação conhecida. Centrifugue à temperatura ambiente durante 2 minutos a 15 000 g.	<ul style="list-style-type: none"> Por exemplo, coloque cada tubo na microcentrifuga com uma porção da dobradiça da tampa virada para o centro do rotor. Depois da centrifugação, a posição do grânulo pode ser localizada (mesmo se for demasiado pequeno para ser facilmente visível), este estará na ponta do tubo debaixo da dobradiça.
11. Remova cuidadosamente o sobrenadante com a ponta da pipeta e elimine-o. Tome cuidado para evitar perturbar o grânulo de ADN.	<ul style="list-style-type: none"> Este grânulo contém ADN. A perda do grânulo resultará na perda de ADN. Se rodar o tubo de modo que o grânulo fique posicionado na parede superior, permitirá que mova com segurança a ponta de uma pipeta ao longo da parede inferior e remova todo o sobrenadante. O sobrenadante pode conter impurezas e deverá ser removido tão completamente quanto possível. Uma secagem excessiva do grânulo pode fazer com que o ADN seja mais difícil de dissolver.

Passos para a purificação	Notas
<p>12. Banho de etanol: Adicione cuidadosamente 250 µL de etanol a 70%. Deixe repousar à temperatura ambiente durante um minuto. Remova completamente o etanol sem perturbar o grânulo.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • É importante que remova todo o etanol da amostra. A transferência de etanol pode causar impacto no desempenho da análise. • Tome cuidado para não perturbar o grânulo de ADN. • O grânulo de ADN poderá ser pequeno. • Na eventualidade do grânulo se soltar, centrifugue a amostra durante 5 minutos a 15 000 g. • Depois de remover o etanol a 70%, o tubo pode ser centrifugado de forma intermitente para permitir a remoção de etanol residual.
<p>13. Adicione 100 µL de solução de TE (consulte a página 1) para dissolver o grânulo de ADN. Centrifugue em vortex durante pelo menos 5 minutos.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Se desejar obter uma concentração mais elevada de ADN, deverá utilizar 50 µL de TE. • Note: Grandes quantidades de ADN de alto peso molecular podem ser mais lentas de hidratar (dissolver) completamente. • Uma hidratação incompleta do ADN é a causa de inexatidão ao estimar a concentração de ADN e de falha na extração de aplicações subsequentes, tal como a PCR (Reação em cadeia da polimerase).
<p>14. Para garantir uma reidratação completa do ADN (grânulo e esfregaço), incube-o à temperatura ambiente de um dia para o outro, seguido de centrifugação em vortex ou a 50° C durante uma hora com centrifugação em vortex ocasional.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Uma reidratação incompleta do ADN é a causa de inexatidão ao estimar a concentração de ADN e de potencial falha na extração de aplicações subsequentes, tal como PCR.
<p>15. Opções de armazenamento para o ADN completamente reidratado:</p> <ol style="list-style-type: none"> a) Recomenda-se em solução de TE, em alíquotas a -20° C para armazenamento a longo prazo, ou b) Em solução de TE a 4° C durante 2 meses. 	<ul style="list-style-type: none"> • A congelação do ADN purificado em solução de TE fará com que o ADN se precipite. Quando descongelar uma amostra de ADN purificado congelado, preste muita atenção à reidratação, tal como debatido no passo 14.

Quantificação do ADN

Pelo método da fluorescência

As análises que utilizam pigmentos fluorescentes são mais específicas do que a absorvência a 260 nm para a quantificação da quantidade de ADN de cadeia dupla (dsDNA) numa amostra de ADN. Recomendamos a utilização de pigmentos fluorescentes, tal como PicoGreen® ou SYBR® Green I, para quantificar o dsADN, uma vez que existe uma menor interferência pela contaminação de ARN. Um protocolo económico através da utilização de SYBR Green I está descrito em PD-PR-075, *Quantificação de ADN através da utilização de pigmento SYBR Green I e um leitor de microplacas*¹. Alternativamente, podem ser utilizados os kits disponíveis comercialmente, tal como o kit de análise Quant-iT™ PicoGreen dsDNA da Invitrogen (N.º de cat. Q-33130). Para qualquer um dos protocolos, recomendamos que o ADN purificado seja diluído de 1:50 com uma solução de TE e que 5 µL sejam utilizados na análise de quantificação.

Pelo método da absorvância

Se escolher quantificar o ADN através de absorvância, recomendamos que primeiro trate a amostra purificada com RNase para digerir a contaminação de ARN e depois remova os fragmentos ARN através de uma precipitação de etanol do ADN. O protocolo detalhado está descrito em PD-PR-040, *Remoção de ARN através de digestão com RNase dupla*². Por favor, note que o ADN de uma amostra oral normalmente contém consideravelmente mais ARN do que aquele que pode ser encontrado em amostras de sangue. Certifique-se de que o ADN precipitado através de álcool está completamente dissolvido antes de ler a absorvância.

Fator de conversão: Uma absorvância de 1,0 a 260 nm corresponde a uma concentração de 50 ng/μL (50 μg/mL) para dsADN puro.

Certifique-se de que os valores de absorvância se encontram dentro do intervalo linear do espectrofotómetro. Volte a diluir e volte a medir as amostras que não se encontrem dentro do intervalo linear. Para mais informações, consulte a documentação do dispositivo.

Método:

1. Dilua uma alíquota de 10 μL de ADN purificado tratado com RNase com 90 μL de solução de TE (diluição de 1/10). Misture suavemente, pipetando para cima e para baixo. Espere que as bolhas desapareçam.
2. Utilize a TE na célula de referência (em branco).
3. Meça a absorvância a 320 nm, 280 nm e 260 nm.
4. Calcule os valores corretos de A_{280} e A_{260} através da subtração da absorvância a 320 nm (A_{320}) a partir dos valores A_{280} e A_{260} .
5. Concentração de ADN em ng/μL = A_{260} corrigido \times 10 (fator de diluição) \times 50 (fator de conversão).
6. Rácio A_{260}/A_{280} : Divida o A_{260} corrigido pelo A_{280} corrigido.

Exemplo

1. Assuma os valores medidos de $A_{320} = 0,025$, $A_{280} = 0,175$ e $A_{260} = 0,295$
2. A concentração de ADN na amostra não diluída será de:
 $(A_{260} - A_{320}) \times 10$ [fator de diluição] \times 50 [fator de conversão]
 $= (0,295 - 0,025) \times 10 \times 50$
 $= 0,270 \times 10 \times 50$
 $= 135 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ou $135 \text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$
3. O rácio A_{260}/A_{280} corrigido será:
 $(A_{260} - A_{320}) \div (A_{280} - A_{320})$
 $= (0,295 - 0,025) \div (0,175 - 0,025)$
 $= 0,270 \div 0,150$
 $= 1,80$

Referências

- 1 A quantificação de ADN através da utilização da análise de Fluorescência/DNase (F/D). Substituído por quantificação de ADN através da utilização de pigmento SYBR Green I e um leitor de microplacas. DNA Genotek. PD-PR-075.
- 2 Remoção de ARN através de digestão com RNase dupla. DNA Genotek. PD-PR-040.

O Apoio Técnico está disponível de segunda a sexta-feira (9h00 às 17h00, horário da costa leste dos EUA):

- Número gratuito (América do Norte): 1 866 813 6354, opção 6
- Todos os outros países: 613 723 5757, opção 6
- Correio eletrónico: support@dnagenotek.com

Oragene®-DNA e ORAcollect®-DNA não se encontram disponíveis para venda nos Estados Unidos.

Oragene®-DISCOVER destina-se apenas a fins de investigação e não deverá ser utilizado para procedimentos de diagnóstico.

Alguns produtos DNA Genotek poderão não estar disponíveis em todas as regiões geográficas.

*Oragene, prepIT e ORAcollect são marcas comerciais registadas da DNA Genotek Inc. Todas as outras marcas e designações referidas no presente documento são propriedade dos respetivos proprietários.

Todos os protocolos, documentos técnicos e notas explicativas da DNA Genotek estão disponíveis na secção de apoio do nosso *website* em www.dnagenotek.com.

Manual de referência rápida:

Protocolo laboratorial para purificação manual de ADN de amostra com 0,5 mL

Passos para a purificação
1. Misture a amostra no kit DNA Genotek através de inversão e agite suavemente durante alguns segundos.
2. Incube a amostra a 50° C num incubador a água durante um período mínimo de 1 hora ou num incubador a ar durante um período mínimo de 2 horas.
3. Transfira 500 µL da amostra para um tubo de microcentrifuga.
4. Adicione 20 µL do volume de PT-L2P e misture em vortex durante alguns segundos.
5. Incube em gelo durante 10 minutos.
6. Centrifugue à temperatura ambiente (TA) durante 5 minutos a 15 000 g.
7. Transfira cuidadosamente a maior parte do sobrenadante limpo com a pipeta para um tubo de microcentrifuga novo. Elimine o grânulo.
8. Adicione 600 µL de etanol a 95% a 100% à TA para limpar o sobrenadante. Misture suavemente por inversão 10 vezes.
9. Deixe que a amostra repouse à temperatura ambiente durante 10 minutos para que o ADN se precipite completamente.
10. Coloque o tubo na microcentrifuga com uma orientação conhecida. Centrifugue à TA durante 2 minutos a 15 000 g.
11. Pipete cuidadosamente o sobrenadante e elimine-o. Tome cuidado para evitar perturbar o grânulo de ADN.
12. Adicione 250 µL de etanol a 70% e deixe repousar à TA durante um minuto. Remova completamente o etanol sem perturbar o grânulo.
13. Adicione 100 µL de solução de TE e centrifugue em vortex a amostra durante pelo menos 5 segundos.
14. Incube de um dia para o outro à TA ou a 50° C durante uma hora, centrifugando em vortex ocasionalmente.
15. Armazenamento: Em alíquotas a -20° C para armazenamento a longo prazo (recomendado) ou a 4° C para armazenamento até 2 meses.