

**Manual del protocolo
de purificación manual
para su uso con**

prepiT™·L2P

DNagenotek™

www.dnagenotek.com

Tel.: +1.613.723.5757
support@dnagenotek.com
sales@dnagenotek.com

3000 - 500 Palladium Drive
Ottawa, ON, Canadá K2V 1C2

*Muestras superiores
Rendimiento comprobado*




El protocolo de preplT™•L2P está disponible en otros idiomas en www.dnagenotek.com

El equipo de asistencia técnica está disponible de lunes a viernes (09:00 a 17:00 ET):

- Número gratuito (Norteamérica): 1.866.813.6354, opción 6
- Resto de países: +1.613.723.5757, opción 6
- Correo electrónico: support@dnagenotek.com

Persona responsable en Reino Unido: Emergo Consulting (UK) Limited c/o Cr360 - UL International, Compass House, Vision Park Histon, Cambridge, CB24 9BZ

 Novosanis NV Bijkhoevelaan 32c,
2110 Wijnegem, Bélgica
Correo electrónico: EUAR@novosanis.com

 Arazy Group Swiss GmbH
Bruderholzallee 53, 4059 Basilea, Suiza
Correo electrónico: swiss.ar@arazygroup.com

Patrocinador australiano: Emergo Australia, Level 20, Tower II, Darling Park, 201 Sussex Street, Sídney, NSW 2000 Australia

Índice

Uso/propósito previsto	4
Estabilidad en uso	4
Características	4
Materiales	4
Advertencias y precauciones	4
Limitaciones del uso del producto	5
Transporte de prepIT•L2P	5
Almacenamiento de prepIT•L2P (vida útil)	5
Eliminación	5
Mantenimiento/repares	5
Resumen de las características de rendimiento	5
Presentaciones del producto	5
Garantías	6
Resolución de problemas	6
Protocolo de laboratorio de prepIT para la purificación manual de ADN a partir de:	
500 µl de la muestra	7
Muestra entera	11
Cuantificación del ADN	18

Uso/propósito previsto

Para la purificación del ADN genómico de los kits de recogida de saliva Oragene™ y ORAcollect™.

Estabilidad en uso

PT-L2P-5 (5 ml) y PT-L2P-45 (45 ml) cuentan con 30 meses de estabilidad en uso a temperatura ambiente.

Características

- Química optimizada para la recuperación máxima de ADN de muestras orales recogidas con las líneas de producto Oragene y ORAcollect.
- Se ha demostrado que proporciona resultados consistentes con ADN de alto peso molecular.
- Método de purificación escalable para volúmenes de muestra grandes o pequeños.
- Flujo de trabajo cómodo con asistencia técnica durante todo el proceso desde la recogida hasta la extracción.
- Método rentable que requiere un equipamiento mínimo.

Materiales

- PT-L2P-5 (5 ml) y/o PT-L2P-45 (45 ml)
- Manual del producto prepIT•L2P

Advertencias y precauciones

- Solo para uso en laboratorio.
- NO ingiera el reactivo líquido.
- NO lo utilice si el embalaje está dañado o el sello de la tapa/tapón del embudo está roto o presenta fugas.
- NO utilice prepIT•L2P después de la fecha que se indica en “Usar antes de” que figura en el frasco del reactivo.
- Lávese con agua si el reactivo entra en contacto con los ojos o la piel. NO lo ingiera.
- Notifique cualquier incidente grave a DNA Genotek y a la autoridad competente de su país.
- Consulte la ficha de datos de seguridad para eliminar de forma segura el reactivo que no se haya utilizado.
- La ficha de datos de seguridad (MSDS) está disponible en www.dnagenotek.com.

Limitaciones del uso del producto

Utilice prepIT•L2P solo tal y como lo indica este manual del producto.

Transporte de prepIT•L2P

prepIT•L2P se puede transportar a temperatura ambiente como un reactivo de laboratorio. No es necesario manipularlo de ninguna forma en particular.

Almacenamiento de prepIT•L2P (vida útil)

Almacenar a temperatura ambiente. La vida útil de PT-L2P-5 (5 ml) y PT-L2P-45 (45 ml) será de 30 meses cuando se encuentren debidamente cerrados y almacenados a temperatura ambiente.

Eliminación

Deseche los kits que no se hayan utilizado, que estén dañados o presenten fugas según las normativas municipales, provinciales y nacionales correspondientes a este respecto. Deséchelos como residuo de laboratorio.

Mantenimiento/reparaciones

No corresponde. prepIT•L2P es un reactivo, no es necesario realizar ningún mantenimiento ni reparación.

Resumen de las características de los resultados

El ADN genómico purificado con prepIT•L2P de los kits de recogida de saliva Oragene™ y ORAcollect™ proporciona un ADN de alta calidad y en cantidad suficiente para su uso en aplicaciones posteriores, como PCR, chip de ADN y secuenciación de nueva generación.

Presentaciones del producto

prepIT•L2P está disponible en varios volúmenes, en función del número de preparaciones que sean necesarias. Por ejemplo:

Referencia del producto / número de catálogo	Volumen para preparar la muestra	Número de preparaciones
PT-L2P-5	0,5 ml	200
PT-L2P-45	0,5 ml	2000

Garantías

Todos los términos y condiciones de los productos de DNA Genotek están disponibles en <http://www.dnagenotek.com/ROW/terms/index.html>.

Resolución de problemas

Póngase en contacto con el equipo técnico de DNA Genotek en support@dnagenotek.com o llame al +1 (613) 723-5757, opción 6.

Protocolo de laboratorio de prepIT™ para la purificación manual de ADN a partir de 500 µl de muestra

El siguiente protocolo detallado explica cómo purificar el ADN a partir de una alícuota de 500 µl de una muestra.

Reactivos incluidos

prepIT•L2P (núm. catálogo PT-L2P-5 o PT-L2P-45)

Equipamiento y reactivos

- Microcentrífuga que pueda generar 15 000 × g
- Microtubos de 1,5 ml (p. ej., núm. catálogo MCT-150-C de Axygen®)
- Incubadora de aire o agua a 50 °C
- Etanol (95 % a 100 %) a temperatura ambiente
- Etanol (70 %) a temperatura ambiente
- Tampón de almacenamiento de ADN: TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) o una solución similar

Procedimiento

Pasos para la purificación	Notas
1. Mezclar la muestra de Oragene/ORACollect mediante inversión o agitando suavemente durante unos segundos.	• De esta manera se garantiza que las muestras viscosas se mezclan correctamente.

Pasos para la purificación	Notas
<p>2. Incubar la muestra a 50 °C en una incubadora de agua durante al menos 1 hora o en una incubadora de aire durante al menos 2 horas.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Este paso de tratamiento térmico es fundamental para maximizar la obtención de ADN y garantizar que las nucleasas se inactivan permanentemente. • Este paso de incubación se puede realizar en cualquier momento después de que la muestra se haya recogido y antes de que se haya purificado. • La muestra entera debe incubarse en el tubo de recogida original antes de alicuotar para garantizar la homogeneidad de la muestra. • La muestra se puede incubar a 50 °C durante la noche si resulta más práctico. • Se requiere más tiempo en el caso de la incubadora de aire, ya que la temperatura se equilibra con mayor lentitud que en una incubadora de agua. <p>Nota: El uso de una incubadora de aire podría ser preferible, ya que los tubos de Oragene/ORACollect pueden flotar en un baño de agua. Si debe utilizarse un baño de agua, asegúrese de que la parte del tubo que contiene la muestra quede sumergida en el agua.</p>
<p>3. Transferir 500 µl de muestra mezclada a un tubo de microcentrifugado de 1,5 ml.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • El remanente de la muestra puede almacenarse a temperatura ambiente (entre 15 °C y 25 °C) o congelarse. • Si se desea, la muestra puede almacenarse congelada en un tubo de Oragene/ORACollect a -20 °C o la muestra puede transferirse a un criovial para su almacenamiento a largo plazo a -80 °C.
<p>4. Añadir 20 µl (1/25ª parte del volumen) de prepIT•L2P al tubo de microcentrifugado y mezclar mediante vórtex durante unos segundos.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • La muestra se volverá turbia a medida que se precipiten las impurezas y los inhibidores.
<p>5. Incubar en hielo durante 10 minutos.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Se puede sustituir por incubación a temperatura ambiente, pero resultará menos eficaz a la hora de eliminar las impurezas.

Pasos para la purificación	Notas
6. Centrifugar a temperatura ambiente durante 5 minutos a 15 000 × g.	<ul style="list-style-type: none"> • Aplicar un periodo de centrifugación más largo (hasta 15 minutos) puede ser beneficioso para reducir la turbidez (A₃₂₀ alto) de la solución de ADN final.
7. Transferir cuidadosamente el sobrenadante claro con la punta de una pipeta a un tubo de centrifugado limpio. Desechar el precipitado que contenga impurezas.	<ul style="list-style-type: none"> • El precipitado contiene impurezas turbias. Si se altera de manera accidental, el tubo debe volver a centrifugarse.
8. Añadir 600 µl de etanol al 95-100 % a temperatura ambiente. Mezclar suavemente 10 veces mediante inversión.	<ul style="list-style-type: none"> • Durante la mezcla con etanol, el ADN se precipitará. Puede aparecer como un conjunto de fibras de ADN o como un precipitado fino, dependiendo de la cantidad de ADN que haya en la muestra. • Aunque no se vea, el ADN puede recuperarse realizando los siguientes pasos cuidadosamente.
9. Dejar la muestra a temperatura ambiente durante 10 minutos para permitir que el ADN se precipite por completo.	<ul style="list-style-type: none"> • No se recomienda la incubación a -20 °C porque las impurezas podrían precipitarse junto con el ADN.
10. Colocar el tubo en la microcentrifugadora en una orientación conocida. Centrifugar a temperatura ambiente durante 2 minutos a 15 000 × g.	<ul style="list-style-type: none"> • Por ejemplo, colocar cada uno de los tubos en la microcentrifugadora, con la parte de la bisagra de la tapa apuntando hacia el lado opuesto del centro del rotor. Después de la centrifugación, la posición del precipitado puede localizarse (aunque sea demasiado pequeño para visualizarse); se encontrará en la tapa del tubo debajo de la bisagra.
11. Retirar cuidadosamente el sobrenadante con la punta de una pipeta y desechar. Evitar alterar el precipitado de ADN.	<ul style="list-style-type: none"> • Este precipitado contiene ADN. La pérdida del precipitado provocará la pérdida del ADN. • Girar el tubo de forma que el precipitado se encuentre en la parte superior de la pared le permitirá introducir la punta de la pipeta hacia la parte inferior de la pared y retirar todo el sobrenadante. • El sobrenadante puede contener impurezas y debe retirarse en su totalidad.

Pasos para la purificación	Notas
<p>12. Lavado con etanol: Añadir cuidadosamente 250 μl de etanol al 70 %. Dejar reposar a temperatura ambiente durante 1 minuto. Retirar por completo el etanol sin alterar el precipitado.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Es importante retirar todo el etanol de la muestra. El remanente de etanol puede afectar a los resultados del análisis. • Después de retirar el etanol al 70 %, el tubo puede centrifugarse por impulsos para permitir la eliminación del etanol residual. • Evitar alterar el precipitado de ADN; puede ser pequeño o invisible. • Si el precipitado se desprende, centrifugar la muestra durante 5 minutos a 15 000 $\times g$. • Secar el precipitado de manera excesiva puede hacer que sea más difícil disolver el ADN.
<p>13. Añadir 100 μl de solución TE (véase página 5) para disolver el precipitado del ADN. Agitar mediante vórtex durante al menos 5 segundos.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Si se desea una mayor concentración de ADN, debe utilizarse 50 μl de TE.
<p>14. Para garantizar una rehidratación completa del ADN, incubar a temperatura ambiente durante toda la noche y, a continuación, agitar mediante vórtex o a 50 °C durante 1 hora agitando ocasionalmente mediante vórtex.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Las grandes cantidades de ADN de alto peso molecular pueden tardar en rehidratarse (disolverse) por completo. • La rehidratación incompleta del ADN provoca imprecisión a la hora de calcular la concentración de ADN, así como un posible fallo en aplicaciones posteriores como PCR.
<p>15. Opciones para el almacenamiento de ADN completamente rehidratado:</p> <ol style="list-style-type: none"> a) En TE a -20 °C para un almacenamiento a largo plazo. Dividir en alícuotas si se desea. b) En TE a 4 °C durante un máximo de 2 meses. 	

Protocolo de laboratorio de prepIT para la purificación manual de ADN a partir de una muestra entera

Nota: Este protocolo requiere el uso de una centrifugadora (con rotor de ángulo fijo o de gradillas oscilante) que pueda generar al menos $3500 \times g$ para obtener resultados óptimos.

El siguiente protocolo paso a paso describe cómo purificar el ADN de la muestra entera (de 1 ml a 4 ml de volumen total de muestra). Los volúmenes que se indican deben ajustarse al volumen real recogido.

Reactivos incluidos

prepIT•L2P (núm. catálogo PT-L2P-5 o PT-L2P-45)

Equipamiento y reactivos

- Centrifugadora que aloja tubos de 15 ml y genera al menos $3500 \times g$ (véase tabla 2)
- Tubos cónicos de polipropileno de 15 ml (p. ej., núm. catálogo 352196 de BD Falcon®)
- Microcentrífuga que pueda generar $15\,000 \times g$ (opcional)
- Microtubos de 1,5 ml (p. ej., núm. catálogo MCT-150-C de Axygen®)
- Incubadora de aire o de agua a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Etanol (95 % a 100 %) a temperatura ambiente
- Etanol (70 %) a temperatura ambiente
- Tampón de almacenamiento de ADN: TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) o una solución similar

Opcional: verificación previa a la purificación (solo se aplica a muestras de Oragene; esta verificación no es necesaria para las muestras de ORAcollect)

Pese la muestra para calcular la cantidad de saliva que ha proporcionado el donante (véase tabla 1). La cantidad de saliva recogida es directamente proporcional a la cantidad de ADN recuperado. Por ejemplo, si un donante proporciona menos de 2 ml de saliva, se espera obtener de esta muestra un rendimiento total más bajo.

Peso del kit (sin muestra)

Una vez que la muestra llega al laboratorio, sugerimos pesarla para calcular si el donante ha proporcionado la cantidad correcta de saliva. Suele existir cierta variabilidad entre los donantes. Se indica el peso medio de un kit vacío (tabla 1). Para calcular la cantidad de muestra recogida (suponiendo 1 g/ml), debe realizarse el siguiente cálculo:

$$\frac{\text{Peso del kit que contiene la muestra} - \text{Peso del kit sin la muestra}}{\text{Cantidad de muestra recogida}}$$



Tabla 1

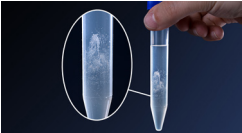
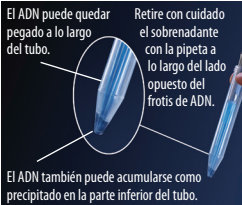
Núm. de producto	Peso del kit sin la muestra
OG-500/OGD-500/OGR-500	6,81 g
OG-510/OGD-510	5,83 g
OG-575/OGD-575/OGR-575	5,66 g
ON-500	6,47 g
ON-600	6,86 g
OG-600/OGD-600/OGR-600	7,26 g
OG-610/OGD-610	6,28 g
OG-675/OGD-675/OGR-675	6,00 g


Procedimiento

Pasos para la purificación	Notas
1. Mezclar la muestra de Oragene/ORACollect mediante inversión o agitando suavemente durante unos segundos.	<ul style="list-style-type: none">• De esta manera se garantiza que las muestras viscosas se mezclan correctamente.
2. Incubar la muestra a 50 °C en una incubadora de agua durante al menos 1 hora o en una incubadora de aire durante al menos 2 horas.	<ul style="list-style-type: none">• Este paso de tratamiento térmico es fundamental para maximizar la obtención de ADN y garantizar que las nucleasas se inactivan permanentemente.• La muestra se puede incubar a 50 °C durante la noche si resulta más práctico.• Este paso de incubación se puede realizar en cualquier momento después de que la muestra se haya recogido y antes de que el ADN se haya purificado.• Se requiere más tiempo en el caso de la incubadora de aire, ya que la temperatura se equilibra con mayor lentitud que en una incubadora de agua. <p>Nota: El uso de una incubadora de aire podría ser preferible, ya que los tubos de Oragene/ORACollect pueden flotar en un baño de agua. Si debe utilizarse un baño de agua, asegúrese de que la parte del tubo que contiene la muestra quede sumergida en el agua.</p>
3. Transferir toda la muestra a un tubo de centrifugado de 15 ml (Figura 1). Anotar el volumen de la muestra. 	<ul style="list-style-type: none">• Puede transferirse vertiendo el contenido o con la ayuda de una pipeta de vidrio o plástico.

Figura 1: Antes de continuar al paso 4, asegúrese de que toda la muestra se ha incubado y transferido a un tubo de centrifugado limpio de 15 ml, tal y como aparece en la imagen.

Pasos para la purificación	Notas
<p>4. Añadir la 1/25ª parte del volumen de prepIT•L2P y mezclar con agitador tipo vórtex durante unos segundos (Figura 2).</p>  <p><i>Figura 2: Después de añadir el PT-L2P y de incubar en hielo durante 10 minutos, el aspecto de la muestra no será claro, sino que tendrá un color turbio.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • P. ej., añadir 160 µl de prepIT•L2P en una muestra de 4 ml. • La muestra se volverá turbia a medida que se precipiten las impurezas y los inhibidores.
<p>5. Incubar en hielo durante 10 minutos.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Se puede sustituir por incubación a temperatura ambiente, pero resultará menos eficaz a la hora de eliminar las impurezas.
<p>6. Centrifugar a temperatura ambiente durante 10 minutos a la mayor velocidad posible. Mínimo 3500 × g.</p>  <p><i>Figura 3: Tras la centrifugación se producirá una acumulación de material turbio en la base del tubo. El sobrenadante deberá ser visiblemente claro.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • Una fuerza centrífuga mayor minimiza la cantidad de material turbio que se arrastrará al ADN purificado (Figura 3). Antes de continuar, debe verificarse con el fabricante de los tubos que los tubos de centrifugado de 15 ml resisten la fuerza centrífuga. • Aplicar un periodo de centrifugación más largo (hasta 20 minutos) puede ser beneficioso para reducir la turbidez (A_{320} alto) de la solución de ADN final.
<p>7. Transferir cuidadosamente el sobrenadante claro con una pipeta a un tubo de centrifugado limpio de 15 ml. Desechar el precipitado.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Dejar una pequeña cantidad de sobrenadante para no alterar el precipitado. • El precipitado contiene impurezas turbias. Si se altera de manera accidental, el tubo debe volver a centrifugarse.

Pasos para la purificación	Notas
<p>8. Añadir al sobrenadante claro 1,2 del volumen de etanol al 95-100 % a temperatura ambiente. Mezclar suavemente 10 veces mediante inversión.</p>  <p><i>Figura 4: Después de añadir el etanol, el ADN se precipitará, lo que podría dar lugar a un conjunto invisible de fibras.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • Durante la mezcla con etanol, el ADN se precipitará. • El ADN precipitado puede aparecer como un conjunto de fibras de ADN (Figura 4) o como un precipitado fino, dependiendo de la cantidad de ADN que haya en la muestra.
<p>9. Dejar la muestra a temperatura ambiente durante 10 minutos para permitir que el ADN se precipite por completo.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • No se recomienda la incubación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ porque las impurezas podrían precipitarse junto con el ADN.
<p>10. Centrifugar a temperatura ambiente durante 10 minutos a la mayor velocidad posible. Mínimo $3500 \times g$.</p>	
<p>11. Retirar con cuidado el sobrenadante con una pipeta de vidrio o plástico y desechar. Evitar alterar el precipitado de ADN.</p>  <p><i>Figura 5: Raspar suavemente el interior del tubo con la punta de la pipeta podría revelar la presencia de un frotis de ADN.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • El sobrenadante puede contener impurezas y debe retirarse en su totalidad. • El ADN precipitado aparecerá como precipitado en la parte inferior del tubo y posiblemente como frotis a lo largo de la pared del tubo (Figura 5). • El frotis de ADN puede encontrarse en el lado del tubo opuesto al centro de la centrifugadora. • El frotis puede localizarse mediante la prueba de "raspado". Puede comprobar la presencia de un frotis de ADN raspando la parte interior del tubo con la punta de una pipeta. El frotis podrá ser visible, tal y como se indica en la Figura 5.

Pasos para la purificación	Notas
<p>12. Lavado con etanol: Añadir cuidadosamente 1 ml de etanol al 70 % al tubo sin alterar el frotis o el precipitado. Dejar reposar a temperatura ambiente durante 1 minuto. Girar suavemente y retirar el etanol completamente sin alterar el precipitado ni el frotis.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Es importante retirar todo el etanol de la muestra. El remanente de etanol puede afectar a los resultados del análisis. • Evitar alterar el precipitado o el frotis de ADN. • Puede realizarse una centrifugación breve (inferior a 1 minuto) para facilitar la eliminación completa del sobrenadante. • Si el precipitado se desprende después del lavado con etanol, centrifugar la muestra durante 5 minutos a la mayor velocidad posible. Mínimo $3500 \times g$.
<p>13. Para las muestras de Oragene, rehidratar el ADN añadiendo 0,2-1 ml de solución TE y mezclar la muestra durante 30 segundos.</p> <p>Para las muestras de ORAcollect, rehidratar el ADN añadiendo 0,2 ml de solución TE y agitar mediante vórtex la muestra durante 30 segundos.</p>  <p><i>Figura 6: Mezclar la muestra con agitador tipo vórtex durante 30 segundos permite la recuperación del frotis de ADN en la pared del tubo. El ADN conservará un alto peso molecular.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • Si se desea una mayor concentración de ADN, el volumen de TE puede reducirse. Debe utilizarse un mínimo de 200 μl de solución TE. • El secado excesivo del precipitado (> 10 minutos) y el uso de menos de 500 μl de solución TE puede dificultar la rehidratación (disolución) del ADN y puede disminuir el rendimiento o dificultar la cuantificación. • El ADN precipitado aparecerá como precipitado en la parte inferior del tubo y posiblemente como frotis a lo largo de la pared del tubo. • Para garantizar la recuperación de la máxima cantidad de ADN, la muestra debe mezclarse mediante un agitador tipo vórtex después de añadir el disolvente de ADN (solución TE). La agitación mediante vórtex garantizará la recuperación del frotis de ADN en la pared del tubo (Figura 6). • El procedimiento con vórtex no perjudica al ADN.

Pasos para la purificación	Notas
<p>14. Para garantizar una rehidratación completa del ADN, incubar a temperatura ambiente durante toda la noche y, a continuación, agitar mediante vórtex o a 50 °C durante 1 hora agitando ocasionalmente mediante vórtex.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • La rehidratación incompleta del ADN provoca imprecisión a la hora de calcular la concentración de ADN, así como un posible fallo en aplicaciones posteriores como PCR.
<p>15. Transferir el ADN rehidratado a un tubo de microcentrifugado de 1,5 ml para su almacenamiento.</p>	
<p>Paso opcional:</p> <ol style="list-style-type: none"> a) Centrifugar el ADN rehidratado a temperatura ambiente durante 15 minutos a 15 000 × g. b) Transferir el sobrenadante a un tubo de microcentrifugado limpio de 1,5 ml sin alterar el precipitado. 	<p>Tener en cuenta que el precipitado contiene material turbio insoluble.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Para maximizar la recuperación del ADN, garantizar que el ADN está completamente rehidratado (paso 14) antes de realizar este paso de centrifugación. • Este paso de centrifugación garantiza la eliminación de cualquier resto de material turbio restante de la muestra de ADN. • Es preciso no alterar el precipitado cuando se transfiere el sobrenadante claro a un tubo limpio.
<p>16. Opciones para el almacenamiento del ADN completamente rehidratado:</p> <ol style="list-style-type: none"> a) En TE a -20 °C para un almacenamiento a largo plazo. Dividir en alícuotas si se desea. b) En TE a 4 °C durante un máximo de 2 meses. 	<ul style="list-style-type: none"> • La congelación del ADN purificado en TE podría provocar que el ADN se precipite. Al descongelar el ADN purificado, debe prestarse especial atención a la rehidratación, tal y como se indica en el paso 14.

Cuantificación del ADN

Mediante el método de fluorescencia

Los análisis que utilizan reactivos fluorescentes son más específicos que la absorbancia a 260 nm para cuantificar la cantidad de ADN de doble cadena (ADNb) en una muestra de ADN. Recomendamos el uso de kits disponibles en el mercado como el kit de análisis de ADNb Quant-iT™ PicoGreen™ (Thermo Fisher Scientific) o el sistema de ADNb QuantiFluor® (Promega). Puede ser necesario diluir el ADN hasta 1:50 con TE antes de utilizarlo en un análisis de cuantificación.

Por el método de absorbancia

Si se opta por la cuantificación de ADN por absorbancia, le recomendamos tratar en primer lugar la muestra purificada con RNasa para digerir el ARN contaminante y, posteriormente, eliminar los fragmentos de ARN mediante precipitación con etanol del ADN. Un protocolo detallado se describe en PD-PR-040, *RNA removal by double-RNase digestion*.¹ Tenga en cuenta que el ADN de una muestra oral suele contener bastante más ARN que el encontrado en muestras de sangre. Asegúrese de que el ADN precipitado con alcohol está completamente disuelto antes de leer la absorbancia.

Factor de conversión: Una absorbancia de 1,0 a 260 nm se corresponde con una concentración de 50 ng/μl (50 μg/ml) de ADNb puro.

Compruebe que los valores de absorbancia están dentro del intervalo lineal del espectrofotómetro. Diluya y vuelva a medir las muestras que salgan del intervalo lineal. Para obtener más información, consulte la documentación de su instrumento.

Bibliografía

¹ RNA removal by double-RNase digestion. PD-PR-040. DNA Genotek.

Método

1. Diluir una alícuota de 10 μl de ADN tratado con RNasa purificada con 90 μl de TE (dilución 1/10). Mezclar subiendo y bajando suavemente la pipeta. Esperar a que las burbujas desaparezcan.
2. Utilizar TE en la celda de referencia (en blanco).
3. Medir la absorbancia a 320 nm, 280 nm y 260 nm.
4. Calcular los valores de A_{280} y A_{260} corregidos sustrayendo la absorbancia a 320 nm (A_{320}) de los valores de A_{280} y A_{260} .
5. Concentración de ADN en $\text{ng}/\mu\text{l}$ = A_{260} corregido \times 10 (factor de dilución) \times 50 (factor de conversión).
6. Cociente A_{260}/A_{280} : Dividir el A_{260} corregido por el A_{280} corregido.

Ejemplo

1. Suponemos que el A_{320} medido = 0,025, A_{280} = 0,175 y A_{260} = 0,295
2. La concentración de ADN de la muestra sin diluir será:
$$(A_{260} - A_{320}) \times 10 \text{ [factor de dilución]} \times 50 \text{ [factor de conversión]}$$
$$= (0,295 - 0,025) \times 10 \times 50$$
$$= 0,270 \times 10 \times 50$$
$$= 135 \text{ ng}/\mu\text{l} \text{ o } 135 \mu\text{g/ml}$$
3. El cociente A_{260}/A_{280} corregido será:
$$(A_{260} - A_{320}) \div (A_{280} - A_{320})$$
$$= (0,295 - 0,025) \div (0,175 - 0,025)$$
$$= 0,270 \div 0,150$$
$$= 1,80$$

Oragene•DNA y ORAcollect•DNA no están disponibles para su venta en los Estados Unidos. Oragene•DISCOVER está previsto solo para uso de investigación, no para uso en procedimientos de diagnóstico.











Algunos productos de DNA Genotek pueden no estar disponibles en todas las regiones geográficas.

Oragene, prepIT, ORAcollect y DNA Genotek son marcas de DNA Genotek Inc.

El resto de marcas y nombres que figuran en este documento son propiedad de sus respectivos dueños.

Todos los protocolos, documentos oficiales y notas de aplicación de DNA Genotek están disponibles en la sección de apoyo de nuestra página web en www.dnagenotek.com.

Legenda de etiquetas:

	Producto médico de diagnóstico in vitro
	Número de catálogo
	Marcado CE
	Fabricante
	Consultar el prospecto
	Representante autorizado europeo
	Representante autorizado suizo
	Número de lote
	Identificación única del producto
	Estabilidad en uso
15 °C / 30 °C 59 °F / 86 °F	Instrucciones de almacenamiento

Patente (www.dnagenotek.com/legalnotices)

PD-HB-00024 (ES - Spanish) Issue 2/2022-09

© 2022 DNA Genotek Inc., una filial de OraSure Technologies, Inc., todos los derechos reservados.

DNAGENOTEK™

www.dnagenotek.com