

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

Para la purificación de ADN genómico de todos los estuches de colección Oragene[®] y ORAcollect[®].

Visite nuestro sitio web en www.dnagenotek.com para ver otros idiomas y protocolos adicionales.

Nota: Este protocolo requiere el uso de una centrifugadora capaz de generar al menos $3,500 \times g$ para obtener resultados óptimos.

El procedimiento se describe para purificar ADN de toda la muestra colectada (de 1 mL a 4 mL aprox. del volumen total). Los volúmenes indicados se deben ajustar proporcionalmente al volumen colectado.

Reactivos incluidos

- prepIT[®]•L2P (catálogo #: PT-L2P)

Equipo y reactivos

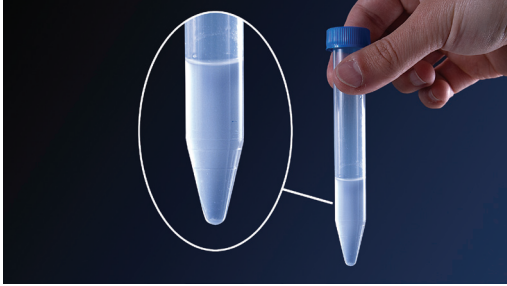
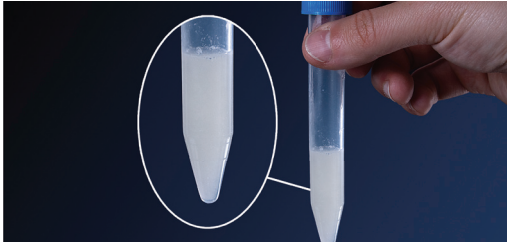
- Centrifugadora que aloja tubos de 15 mL y es capaz de generar al menos $3,500 \times g$ (ver Tabla 2)
- Tubos cónicos de polipropileno de 15 mL (p. ej. BD Falcon #352196)
- Microcentrifugadora capaz de funcionar a $15,000 \times g$ (opcional)
- Microtubos de 1.5 mL (p. ej. Axygen #MCT-150-C)
- Incubadora de aire o de 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 solución similar

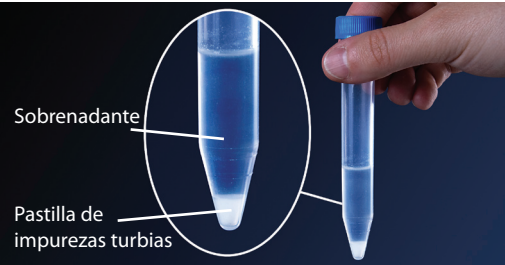
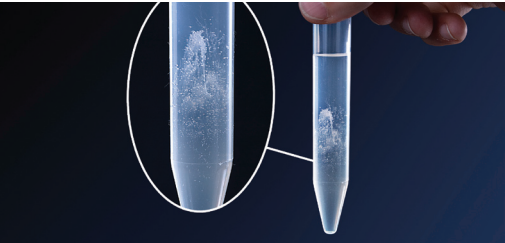
Verificación previa a la purificación

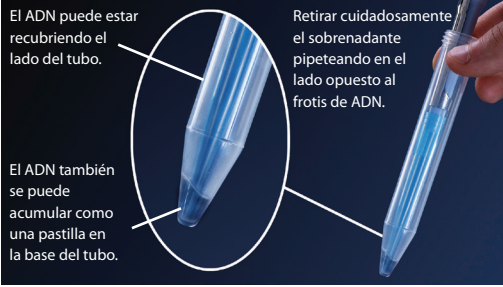

Pesar la muestra para estimar la cantidad de saliva entregada por el donante (ver Tabla 1; no se requiere para OC-100 y OCR-100). La cantidad de saliva colectada es directamente proporcional a la cantidad de ADN recuperada. Por ejemplo, si un donante entrega menos de 2 mL de saliva, se puede esperar recuperar de esta muestra un rendimiento total más bajo. En consecuencia, si un donante entrega más de 2 mL de saliva, el resultado sería un rendimiento total más alto.

Peso del estuche (sin muestra)	Tabla 1	
<p>Una vez que la muestra llega al laboratorio, la muestra debe ser pesada para estimar si el donante ha entregado la cantidad adecuada de saliva. Se puede esperar cierta variabilidad entre donantes, tal como se determina del peso del estuche activado con muestra. El peso promedio de un estuche vacío está indicado (Tabla 1). Para calcular la cantidad de muestra colectada (suponiendo 1 g/mL), realizar la siguiente sustracción :</p> <p>Peso del estuche con la muestra - peso del estuche sin la muestra = cantidad de muestra colectada</p>	N.º de producto	Peso del estuche sin muestra
	OG-250/OGR-250	14.15 g
	OG-500/ OGD-500/OGR-500	6.81 g
	OG-510/ OGD-510	5.83 g
	OG-520	5.41 g
	OG-575/ OGD-575/OGR-575	5.66 g
	ON-500	6.47 g

Procedimiento

Pasos de purificación	Notas
<p>1. Mezclar la muestra en el estuche de DNA Genotek invirtiendo y agitando suavemente durante unos segundos.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Esto se hace para asegurar que las muestras viscosas se mezclan correctamente.
<p>2. Incubar la muestra a 50 °C en una incubadora de agua durante un mínimo de 1 hora, o en una incubadora de aire durante un mínimo de 2 horas.</p> <p>Nota: Es preferible el uso de una incubadora de aire, pues los tubos de muestras pueden flotar en un baño de agua. Si se utiliza un baño de agua, asegurarse de que la porción del tubo que contiene la muestra quede sumergida en el agua.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Este paso de tratamiento térmico es esencial para maximizar la obtención de ADN y garantiza que las nucleasas se inactiven de forma permanente. • Esto debe hacerse en el tubo de recolección original. • La muestra se puede incubar a 50 °C durante una noche si resulta más conveniente. • Este paso de incubación se puede efectuar en cualquier momento una vez que la muestra se ha colectado y antes de la purificación del ADN. • Se requiere un tiempo más largo en una incubadora de aire, pues la temperatura se equilibra de forma más lenta que en una incubadora de agua.
<p>3. Transferir toda la muestra a un tubo de centrifugado de 15 mL (Figura 1). Anotar el volumen de la muestra.</p>  <p>Figura 1: Antes de proceder al paso 4, asegurarse de que toda la muestra se ha incubado y se ha transferido a un tubo de centrifugado de 15 mL limpio, como se muestra en el imagen.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Se puede efectuar la transferencia vertiendo o pipeteando con pipeta de vidrio o de plástico.
<p>4. Añadir la 25ª parte del volumen de PT-L2P y mezclar con agitador vortex unos pocos segundos (Figura 2).</p>  <p>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 el de una solución turbia.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • P. ej. 160 µL para 4 mL de muestra en cada tubo. • La muestra se volverá turbia al precipitarse las impurezas e inhibidores.
<p>5. Incubar en hielo durante 10 minutos.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Se puede sustituir por temperatura ambiente, pero será menos eficaz para eliminar impurezas.

Pasos de purificación	Notas
<p>6. Centrifugar a temperatura ambiente durante 10 minutos a la mayor velocidad posible. Mínimo $3,500 \times g$. Cualquier centrifugadora que tiene rotor de vasos basculantes o rotor angular capaz de generar esta fuerza g, es apropiada.</p>  <p><i>Figura 3:</i> Después de la centrifugación habrá una acumulación de material turbio en la base del tubo. El sobrenadante deberá ser visiblemente claro.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Una fuerza centrífuga mayor minimiza la cantidad de material turbio que se arrastrará con el ADN purificado (Figura 3). • Antes de proceder se debe comprobar con el fabricante de los tubos que los tubos de centrifugadora de 15 mL resisten la fuerza centrífuga. • Se puede aplicar un periodo de centrifugación más largo (hasta 20 minutos) si se considera importante reducir la turbidez de la solución de ADN final.
<p>7. Transferir con cuidado la mayoría del sobrenadante claro con una pipeta a un tubo de centrifugado limpio de 15 mL. Desechar la pastilla.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Dejar un volumen pequeño del sobrenadante para evitar la agitación de la pastilla. La pastilla contiene impurezas turbias.
<p>8. Añadir al sobrenadante claro 1,2x del volumen en etanol al 95-100% a temperatura ambiente. Mezclar suavemente invirtiendo 10 veces.</p>  <p><i>Figura 4:</i> Después de la adición de etanol el ADN se precipitará, lo que podría resultar en un conjunto visible de fibras.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Durante el mezclado con etanol el ADN se precipitará. El ADN precipitado puede aparecer como un conjunto de fibras de ADN (Figura 4). Incluso si no se observan las fibras, el ADN se recuperará en los pasos que figuran a continuación.
<p>9. Dejar la muestra a temperatura ambiente durante 10 minutos para permitir la precipitación completa del ADN.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • No se recomienda la incubación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ porque las impurezas podrían coprecipitar con el ADN.
<p>10. Centrifugar a temperatura ambiente durante 10 minutos a la mayor velocidad posible. Mínimo $3,500 \times g$.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Se requiere una velocidad de centrifugado mínima de $3,500 \times g$ (ver Tabla 2). Cualquier centrifugadora que tiene rotor de vasos basculantes o rotor angular capaz de generar esta fuerza g, es apropiada.

Pasos de purificación	Notas
<p>11. Retirar cuidadosamente el sobrenadante con la punta de una pipeta de vidrio o de plástico y desecharlo. Evitar agitar la pastilla de ADN.</p>  <p><i>Figure 5: Raspar suavemente el interior del tubo con la punta de una pipeta puede mostrar la presencia de un frotis de ADN.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • El sobrenadante puede contener impurezas y se debe retirar de la forma más completa posible. • El ADN precipitado se encontrará como pastilla en el fondo del tubo, y posiblemente como frotis a lo largo de un lado del tubo (Figura 5). • El frotis de ADN se puede localizar en el lado del tubo que mira en la dirección opuesta al centro de la centrifugadora. • El frotis se puede localizar utilizando la “prueba de raspado”. Se puede comprobar la presencia de un frotis de ADN raspando el interior del tubo con una punta P1000. El frotis puede ser visible, como se muestra en la Figura 5.
<p>12. Lavado con etanol: Añadir cuidadosamente al tubo 1 mL de etanol al 70% sin agitar el frotis o la pastilla. Dejar a temperatura ambiente durante 1 minuto. Girar suavemente y retirar completamente el etanol, sin agitar la pastilla o el frotis.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Es importante quitar todo el etanol de la muestra. El remanente del etanol puede afectar el funcionamiento del ensayo. • Procurar no agitar la pastilla o el recubrimiento de ADN. • Se puede aplicar una centrifugación breve (menos de 1 minuto) para facilitar la eliminación completa del sobrenadante. • Si la pastilla se separa después del paso de lavado con etanol, centrifugar la muestra durante 5 minutos a la mayor velocidad posible. Mínimo 3,500 × g.
<p>13. Rehidratar el ADN añadiendo 0.2 - 1 mL de solución TE y mezclando la muestra mediante un agitador vortex por 30 segundos.</p> <p>Para OC-100 y OCR-100, rehidratar el ADN añadiendo 0.2 mL de solución TE y mezclando la muestra mediante un agitador vortex por 30 segundos.</p>  <p><i>Figure 6: Mezclar la muestra mediante agitador vortex 30 segundos permite la recuperación del ADN que recubre el lado 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 se puede reducir el volumen de TE. Se debe utilizar un mínimo de 200 µL de TE. • El secado excesivo de la pastilla (> 10 minutos) y el uso de menos de 500 µL de solución TE puede hacer más difícil la rehidratación (disolución) del ADN y puede reducir su obtención o dificultar su cuantificación. • El ADN precipitado se encontrará como pastilla en el fondo del tubo, y posiblemente como frotis a lo largo de un lado del tubo. • Para asegurarse de una recuperación máxima de ADN, la muestra se debe mezclar mediante un agitador vortex después de añadir el disolvente del ADN (solución TE). La agitación en el vortex garantiza la recuperación del ADN que recubre el lado del tubo (Figura 6). • No dude en mezclar la muestra con un agitador vortex, ya que el ADN conserva un peso molecular alto.

Pasos de purificación	Notas
14. Para asegurarse de que el ADN (pastilla y frotis) esta completamente rehidratado incubar a temperatura ambiente durante la noche, seguida de mezcla con un agitador (vortex) o a 50 °C durante 1 hora con agitación ocasional.	<ul style="list-style-type: none"> • La rehidratación incompleta del ADN provoca imprecisión en el cálculo de la concentración de ADN y el posible fallo de aplicaciones posteriores como la RCP.
15. Transferir el ADN rehidratado a un tubo de microcentrifugado de 1.5 mL para su almacenamiento.	
<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 agitar la pastilla. 	<p>Tener presente que la pastilla contiene material turbio insoluble.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Para maximizar la recuperación del ADN, comprobar que el ADN se haya rehidratado completamente (paso 14) antes de efectuar este paso de centrifugación. • Este paso de centrifugación asegura la eliminación de cualquier material turbio restante de la muestra de ADN. • Es preciso tener cuidado de no agitar la pastilla durante la transferencia del sobrenadante claro a un tubo limpio.
<p>16. Opciones para el almacenamiento del ADN completamente rehidratado:</p> <ol style="list-style-type: none"> a) Recomendada en TE, en alícuotas a -20 °C para un almacenamiento a largo plazo, o b) En TE, a 4 °C para un plazo de hasta 2 meses. 	<ul style="list-style-type: none"> • La congelación del ADN purificado en TE puede provocar la precipitación del ADN. Al descongelar una muestra de ADN purificado debe prestarse especial atención a la rehidratación, como se expone en el paso 14.

Cuantificación del ADN

Por el método de fluorescencia

Los ensayos que utilizan reactivos fluorescentes son más específicos que la absorbancia a 260 nm para cuantificar el total de ADN de doble cadena (ADNb) en una muestra de ADN. Recomendamos el uso de reactivos fluorescentes como PicoGreen® o SYBR® Green I para cuantificar el ADNb, pues hay menos interferencia de ARN contaminante. Un protocolo económico que utiliza SYBR Green I se describe en PD-PR-075, *DNA quantification using SYBR Green I dye and a micro-plate reader*¹. Como alternativa se pueden utilizar estuches disponibles en el mercado como el estuche de ensayo de ADNb Quant-iT™ PicoGreen de Invitrogen (n.º de cat. Q-33130). Para cualquier protocolo recomendamos disolver el ADN purificado a 1:50 con solución de TE, y utilizar 5 µL en el ensayo 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*². 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. Vuelva a diluir y a medir las muestras que salgan del intervalo lineal. Para más información consulte la documentación de su instrumento.

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. Espere a que las burbujas se aclaren.
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 ng/μL = 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:
 $(A_{260} - A_{320}) \times 10$ [factor de dilución] \times 50 [factor de conversión]
 $= (0.295 - 0.025) \times 10 \times 50$
 $= 0.270 \times 10 \times 50$
 $= 135 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ó $135 \text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$
3. El cociente A_{260}/A_{280} corregido será:
 $(A_{260} - A_{320}) \div (A_{280} - A_{320})$
 $= (0.295 - 0.025) \div (0.175 - 0.025)$
 $= 0.270 \div 0.150$
 $= 1.80$

Tabla 2: Cálculo de la fuerza g a partir del radio y de la velocidad del rotor

Con el fin de generar una fuerza g mínima de 3,500 × g, se debe seleccionar una velocidad de giro (RPM) adecuada para el tamaño del rotor. Las combinaciones de velocidad de giro y radio del rotor que generarán la fuerza g mínima requerida están mostradas abajo.

P. ej., Si la centrifugadora tiene un radio de rotor de 10 cm se deberá seleccionar una velocidad de giro mínima de 6,000 RPM. Recuerde que 3,500 × g es el requisito mínimo. Las muestras deberían girar a la mayor velocidad tolerada por la centrifugadora y producir una fuerza que los tubos puedan resistir.

Radio del rotor (cm)												
RPM	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
4,000	1.253	1.432	1.611	1.790	1.049	1.969	2.148	2.328	2.507	2.865	3.044	3.223
4,500	1.586	1.813	2.039	2.266	2.493	2.719	2.946	3.172	3.399	3.626	3.852	4.079
5,000	1.958	2.238	2.518	2.798	3.077	3.357	3.637	3.917	4.196	4.476	4.756	5.036
5,500	2.369	2.708	3.046	3.385	3.723	4.062	4.400	4.739	5.077	5.416	5.754	6.036
6,000	2.820	3.223	3.626	4.028	4.431	4.834	5.237	5.640	6.043	6.445	6.848	7.251
6,500	3.309	3.782	4.255	4.728	5.201	5.673	6.146	6.619	7.092	7.564	8.037	8.510
7,000	3.838	4.386	4.935	5.483	6.031	6.580	7.128	7.676	8.225	8.773	9.321	9.870
7,500	4.406	5.036	5.665	6.294	6.924	7.553	8.183	8.812	9.442	10.071	10.700	11.330
8,000	5.013	5.729	6.445	7.162	7.878	8.594	9.310	10.026	10.742	11.459	12.175	12.891
8,500	5.659	6.468	7.276	8.085	8.893	9.702	10.510	11.319	12.127	12.936	13.744	14.553
9,000	6.345	7.251	8.158	9.064	9.970	10.877	11.783	12.689	13.596	14.502	15.409	16.315
fuerza g												

Referencias

- 1 DNA quantification using the Fluorescence/DNase (F/D) assay. Sustituido por DNA quantification using SYBR Green I dye and a micro-plate reader. DNA Genotek. PD-PR-075.
- 2 RNA removal by double-RNase digestion. DNA Genotek. PD-PR-040.

La asistencia técnica está disponible de lunes a viernes (9 h a 17 h EST)

- Número gratuito (Norteamérica): 1-866-813-6354, opción 6
- Todos los otros países: 613-723-5757, opción 6
- Email: support@dnagenotek.com

Oragene®-DNA y ORAclect®-DNA no están disponibles para la venta en los Estados Unidos.
 Oragene®-DISCOVER es para uso exclusivo en investigación, no para procedimientos de diagnóstico.
 Es posible que no todos los productos de DNA Genotek estén disponibles en todas las regiones geográficas.
 *Oragene, ORAclect, OMNIgene y prepIT son marcas registradas de DNA Genotek Inc. Todas las demás marcas y nombres incluidos en este documento son propiedad de sus titulares respectivos.
 Todos los protocolos, reportes técnicos y notas de aplicación de DNA Genotek están disponibles en la sección "Support" de nuestro sitio web, en www.dnagenotek.com.

Guía rápida de referencia:

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

	1 mL	1.5 mL	2.0 mL	2.5 mL	3 mL	3.5 mL	4 mL
preplT•L2P	40 µL	60 µL	80 µL	100 µL	120 µL	140 µL	160 µL
95 % a 100% EtoH	1.2 mL	1.8 mL	2.4 mL	3 mL	3.6 mL	4.2 mL	4.8 mL
70 % EtoH	←————— 1 mL —————→						
TE	←————— 0.2 mL a 1 mL —————→						

Pasos de purificación	
1.	Mezclar la muestra en el estuche de DNA Genotek invirtiendo y agitando suavemente durante unos segundos.
2.	Incubar la muestra a 50 °C en una incubadora de agua durante un mínimo de 1 hora, o en una incubadora de aire durante un mínimo de 2 horas.
3.	Transferir toda la muestra a un tubo de centrifugado de 15 mL. Anotar el volumen de la muestra.
4.	Añadir la 25ª parte del volumen de PT-L2P y mezclar con agitador vortex unos pocos segundos.
5.	Incubar en hielo durante 10 minutos.
6.	Centrifugar a temperatura ambiente durante 10 minutos a la mayor velocidad posible. Mínimo 3,500 × g.
7.	Transferir con cuidado la mayoría del sobrenadante claro con una pipeta a un tubo de centrifugado limpio de 15 mL. Desechar la pastilla.
8.	Añadir al sobrenadante claro 1.2x del volumen en etanol al 95-100% a temperatura ambiente. Mezclar suavemente invirtiendo 10 veces.
9.	Dejar la muestra a temperatura ambiente durante 10 minutos para permitir la precipitación completa del ADN.
10.	Centrifugar a temperatura ambiente durante 10 minutos a la mayor velocidad posible. Mínimo 3,500 × g.
11.	Retirar cuidadosamente el sobrenadante con la punta de una pipeta de vidrio o de plástico y desecharlo. Evitar agitar la pastilla de ADN.
12.	Añadir cuidadosamente al tubo 1 mL de etanol al 70% sin agitar el frotis o la pastilla. Dejar a temperatura ambiente durante 1 minuto. Girar suavemente y retirar completamente el etanol, sin agitar la pastilla o el frotis.
13.	Rehidratar el ADN añadiendo 0.2 - 1 mL de solución TE y mezclando la muestra mediante un agitador vortex por 30 segundos. Para OC-100 y OCR-100, rehidratar el ADN añadiendo 0.2 mL de solución TE y mezclando la muestra mediante un agitador vortex por 30 segundos.
14.	Incubar durante la noche a temperatura ambiente, o a 50 °C por 1 hora.
15.	Mezclar la muestra en agitador vortex y transferir el ADN rehidratado a un tubo de 1.5 mL para su almacenamiento.
16.	Paso opcional: centrifugar el ADN rehidratado a temperatura ambiente durante 15 minutos a 15,000 × g y despues transferir el sobrenadante a un tubo limpio de 1.5 mL, sin agitar la pastilla.
17.	Almacenamiento: En alícuotas a -20 °C para un almacenamiento a largo plazo (recomendado), o a 4 °C para un plazo de hasta 2 meses.