

Protocolo de laboratorio para purificación manual de ADN a partir de una muestra de 0,5 mL

Para la purificación de ADN genómico de todos los kits de colección Oragene® y ORAcollect®.

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

El siguiente protocolo detallado describe el modo de purificar ADN a partir de una alícuota de 500 µL de una muestra.

Reactivos incluidos

- prepIT®-L2P (catálogo #: PT-L2P)

Equipamiento y reactivos

- Microcentrífuga capaz de funcionar a $15.000 \times g$
- Microtubos de 1,5 mL (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
- Solución de almacenamiento de ADN: TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) o solución similar

Procedimiento

Pasos de purificación	Notas
1. Mezclar la muestra en el kit de DNA Genotek invirtiendo y agitando suavemente durante unos segundos.	<ul style="list-style-type: none">• Esto se hace para asegurar que las muestras viscosas se mezclen correctamente.
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. Nota: Puede ser 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, asegúrese de que la porción del tubo que contiene la muestra quede sumergida en el agua.	<ul style="list-style-type: none">• Este paso de tratamiento térmico es esencial para asegurar que el ADN se disuelva correctamente y que las nucleasas se inactiven de forma permanente.• Este paso de incubación se puede efectuar en cualquier momento una vez que la muestra se ha colectado y antes de su purificación.• La incubación de toda la muestra en el contenedor original antes de la toma de alícuotas es necesaria para asegurar la homogeneidad de la muestra.• La muestra se puede incubar a 50 °C durante una noche si resulta más conveniente.• 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.
3. Transferir 500 µL de la muestra mezclada a un tubo para microcentrífuga de 1,5 mL.	<ul style="list-style-type: none">• El resto de la muestra se puede guardar a temperatura ambiente o congelar (-15 °C a -20 °C).
4. Para 500 µL de muestra, añadir 20 µL (1/25 del volumen) de PT-L2P al tubo para microcentrífuga, y mezclar durante unos segundos usando un agitador (vortex).	<ul style="list-style-type: none">• La muestra se volverá turbia al precipitarse las impurezas e inhibidores.

Pasos de purificación	Notas
5. Incubar en hielo durante 10 minutos.	<ul style="list-style-type: none"> Se puede sustituir por temperatura ambiente, pero será menos eficaz para eliminar impurezas.
6. Centrifugar a temperatura ambiente durante 5 minutos a 15.000 × g.	<ul style="list-style-type: none"> Un periodo de centrifugado más prolongado (hasta 15 minutos) puede ser útil para reducir la turbidez (A₃₂₀ alta) de la solución final de ADN.
7. Transferir con cuidado el sobrenadante claro con la punta de la pipeta a un tubo para microcentrífuga limpio. Desechar la pastilla que contiene impurezas.	<ul style="list-style-type: none"> La pastilla contiene impurezas turbias. Si se agita accidentalmente, el tubo se deberá centrifugar de nuevo.
8. Añadir a 500 µL de sobrenadante 600 µL de etanol al 95-100% a temperatura ambiente. Mezclar suavemente invirtiendo 10 veces.	<ul style="list-style-type: none"> Durante el mezclado con etanol el ADN se precipitará. Esto puede aparecer como un conjunto de fibras de ADN o como un precipitado fino, dependiendo de la cantidad de ADN en la muestra. Incluso si no se observan las fibras, el ADN se recuperará siguiendo cuidadosamente los pasos que figuran a continuación.
9. Dejar la muestra a temperatura ambiente durante 10 minutos para permitir la precipitación completa del ADN.	<ul style="list-style-type: none"> No se recomienda la incubación a -20 °C porque las impurezas podrían coprecipitar con el ADN.
10. Colocar el tubo en la microcentrífuga en una orientación predeterminada. Centrifugar a temperatura ambiente durante 2 minutos a 15.000 × g.	<ul style="list-style-type: none"> Por ejemplo, colocar cada tubo en la microcentrífuga con la parte de la bisagra de la tapa señalando en la dirección opuesta al centro del rotor. Después de la centrifugación se puede localizar la posición de la pastilla (incluso si es demasiado pequeña para ser fácilmente visible), estará en la punta del tubo debajo de la bisagra.
11. Retirar cuidadosamente el sobrenadante con la punta de una pipeta y desecharlo. Evitar agitar la pastilla de ADN.	<ul style="list-style-type: none"> Esta pastilla contiene ADN. La pérdida de la pastilla supondrá la pérdida del ADN. Rotar el tubo de modo que la pastilla se encuentre en la pared superior nos permitirá mover con seguridad la punta de la pipeta a lo largo de la pared inferior y retirar el sobrenadante en su integridad. El sobrenadante puede contener impurezas y se debe retirar de la forma más completamente posible. El secado excesivo de la pastilla puede hacer más difícil la disolución del ADN.
12. Lavado con etanol: Añadir cuidadosamente 250 µL de etanol al 70%. Dejar a temperatura ambiente durante 1 minuto. Retirar completamente el etanol sin agitar la pastilla.	<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 de ADN. La pastilla de ADN puede ser pequeña. Si la pastilla se separa, centrifugar la muestra durante 5 minutos a 15.000 × g. Después de retirar el etanol al 70%, el tubo puede centrifugarse por impulsos para permitir eliminar el etanol residual.

Pasos de purificación	Notas
13. Añadir 100 µL de solución TE (véase página 1) para disolver la pastilla de ADN. Mezclar mediante un agitador (vortex) por al menos 5 segundos.	<ul style="list-style-type: none"> • Si se desea una mayor concentración de ADN se deberán utilizar 50 µL de TE. • Nota: las cantidades grandes de ADN de alto peso molecular pueden necesitar tiempo para hidratarse (disolverse) completamente. • La hidratación incompleta del ADN provoca imprecisión a la hora de estimar la concentración de ADN y el fallo de aplicaciones posteriores como la RCP (PCR).
14. Para asegurarse de que el ADN está completamente hidratado (pastilla y frotis), incubar a temperatura ambiente toda la noche, seguida de mezcla (vortex) o a 50°C una hora con mezcla ocasional (vortex).	<ul style="list-style-type: none"> • La hidratación incompleta del ADN provoca imprecisión a la hora de estimar la concentración de ADN y el fallo de aplicaciones posteriores como la RCP (PCR).
15. Opciones para el almacenamiento del ADN completamente rehidratado: 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"> • El congelamiento del ADN purificado en TE provocará 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 (dsDNA) en una muestra de ADN. Recomendamos el uso de reactivos fluorescentes como PicoGreen® o SYBR® Green I para cuantificar el dsDNA, 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 kits disponibles en el mercado como el kit de ensayo de dsDNA 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 este 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 dsDNA 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 el ADN gentilmente subiendo y bajando con una 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 $135 \text{ }\mu\text{g/mL}$
3. El cociente A_{260}/A_{280} corregido será:
 $(A_{260} - A_{320}) \div (A_{280} - A_{320})$
 $= (0.295 - 0.025) \div (0.175 - 0.025)$
 $= 0.270 \div 0.150$
 $= 1.80$

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 ORAcollect®-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, ORAcollect, 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 de 0,5 mL

Pasos de purificación
1. Mezclar la muestra en el kit de DNA Genotek invirtiéndola y agitándola suavemente durante unos segundos.
2. Incubar la muestra a 50 °C en una incubadora de agua como mínimo una 1 hora, o en una incubadora de aire como mínimo 2 horas.
3. Transferir 500 µL de la muestra mezclada a un tubo de microcentrífuga.
4. Añadir 20 µL de PT-L2P y mezclar durante unos segundos usando un agitador (vortex).
5. Incubar en hielo durante 10 minutos.
6. Centrifugar a temperatura ambiente durante 5 minutos a 15.000 × g.
7. Transferir con cuidado el sobrenadante claro con la punta de la pipeta a un tubo de microcentrífuga limpio. Desechar la pastilla.
8. Añadir 600 µL de etanol al 95-100% a temperatura ambiente al sobrenadante claro. Mezclar suavemente invirtiéndola 10 veces.
9. Dejar la muestra a temperatura ambiente durante 10 minutos para permitir la precipitación completa del ADN.
10. Colocar el tubo en la microcentrifugadora en una orientación conocida. Centrifugar a temperatura ambiente durante 2 minutos a 15.000 × g.
11. Retirar cuidadosamente el sobrenadante con la punta de una pipeta y desecharlo. Evitar agitar la pastilla de ADN.
12. Añadir cuidadosamente 250 µL de etanol al 70% y dejar a temperatura ambiente durante 1 minuto. Retirar completamente el etanol sin agitar la pastilla.
13. Añadir 100 µL de solución TE y mezclar mediante un agitador (vortex) por al menos 5 segundos.
14. Incubar a temperatura ambiente toda la noche, o a 50 °C una hora mezclando ocasionalmente (vortex).
15. Almacenamiento: En alícuotas a -20 °C para un almacenamiento a largo plazo (recomendado), o a 4 °C para un plazo de hasta 2 meses.