

Para investigación únicamente
No debe utilizarse en procedimientos de diagnóstico
Para evaluación del rendimiento únicamente

prepit[®]•MAX

for TB

 PT-MAX

Protocolo de laboratorio para la purificación manual de ADN de esputo

El siguiente protocolo es un método de purificación de lisis química para el ADN genómico a partir de muestras de sedimento obtenidas con OMNIgene•SPUTUM (OM-SPD) o NaOH/NALC.

Nota: El presente protocolo describe la purificación de ADN a partir de 200 µL de sedimento. El volumen puede ajustarse en caso de muestras de sedimento mayores.

 15°C  25°C

Lave con agua si la solución líquida entra en contacto con los ojos o la piel. NO ingerir. Consulte la hoja de datos de seguridad del material (MSDS) en www.dnagenotek.com.

Patente (www.dnagenotek.com/legalnotices)

Fabricado en Canadá
 DNA Genotek Inc.
Ottawa, ON, Canadá K2K 1L1
Una filial de OraSure Technologies, Inc.

DNAgenotek

www.dnagenotek.com

PRECAUCIÓN: Los especímenes clínicos que puedan contener *Mycobacterium tuberculosis* (TB) deben considerarse como infecciosos y manipularse con las precauciones y estándares de bioseguridad apropiados (seguir las normas locales o federales correspondientes).

Nota: Las bacterias TB seguirán siendo viables en el reactivo OM-SPD.

Uso previsto

prepIT•MAX (PT-MAX) está destinado a la purificación de ADN de esputo obtenido por medio de los tratamientos OMNIgene•SPUTUM (OM-SPD) o NaOH/NALC con el fin de liberar la cantidad máxima de ADN de *Mycobacterium tuberculosis*.

Este producto está destinado para investigación únicamente. No debe utilizarse en procedimientos de diagnóstico.

Almacenamiento

PT-MAX debería almacenarse a temperatura ambiente (15 °C – 25 °C) y es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la botella.

Información de seguridad

Para más información de seguridad acerca del PT-MAX, consulte la hoja de datos de seguridad (MSDS) correspondiente, disponible en www.dnagenotek.com.

Reactivos incluidos

- Solución MAX
- Reactivo de lisis MAX
- Solución TK
- Solución de elución

Equipo y reactivos suministrados por el cliente

- Centrifugadora capaz de generar de $15.000 \times g$
- Tubos para microcentrifuga de 1,5 mL (por ejemplo, Axygen #MCT-150-C)
- Incubadora de agua o bloque caliente a 70°C
- Etanol (95% a 100%) a temperatura ambiente
- Pipetas y puntas de pipeta

Procedimiento

El siguiente protocolo es un método de purificación de lisis química para el ADN genómico a partir de muestras de sedimento obtenidas con OMNIgene•SPUTUM(OM-SPD) o NaOH/NALC.

Pasos para la purificación	Notas
Retirar una alícuota de 200 μL del sedimento de esputo resuspendido en solución fosfato salina (PBS) estéril o agua.	El protocolo de purificación puede soportar hasta 200 μL de sedimento en un tubo de microcentrifuga de 1,5 mL y 300 μL de sedimento en un tubo microcentrifuga de 2 mL.
1. Añadir el mismo volumen de solución MAX.	
2. Añadir 40 μL (1/10 del volumen) de reactivo de lisis MAX al tubo de microcentrifuga y mezclar con un agitador vórtex durante algunos segundos.	El 1/10 del volumen se calcula de acuerdo al volumen total de la muestra (por ejemplo, solución MAX + volumen de sedimento).
3. Calentar a 70°C durante 20 minutos.	Podría utilizarse un menor tiempo de incubación (mínimo 5 minutos) pero el rendimiento del ADN se verá disminuido.

(página siguiente)

(continuación)

Pasos para la purificación	Notas
4. Añadir 40 μ L (1/10 volumen) de solución MAX al tubo de microcentrifuga y mezclar con un agitador vórtex durante algunos segundos.	La muestra se enturbiará porque las impurezas e inhibidores se precipitarán. El 1/10 del volumen se calcula de acuerdo al volumen total de la muestra (por ejemplo, solución MAX + volumen de sedimento).
5. Incubar en hielo durante 10 minutos o a 4 °C durante 15 minutos.	
6. Centrifugar a temperatura ambiente a 15.000 \times g durante 5 minutos.	
7. Transferir cuidadosamente el sobrenadante claro con una punta de pipeta a un tubo de microcentrifuga limpio. Descartar el sedimento con impurezas.	El sedimento contiene impurezas turbias. Si se perturba accidentalmente, el tubo deberá volver a centrifugarse.
8. Añadir 800 μ L de etanol a temperatura ambiente (95% a 100%). Mezclar suavemente invirtiéndolo 20 veces.	Durante el mezclado con etanol, la muestra puede enturbiarse debido al precipitado del ADN. Incluso si la muestra NO se enturbia, el ADN se recuperará siguiendo los siguientes pasos con cuidado.
9. Incubar las muestras a temperatura ambiente durante 15 minutos para permitir que el ADN precipite por completo.	NO se recomienda la incubación a -20 °C, porque las impurezas podrían precipitarse junto con el ADN.
10. Colocar el tubo en la microcentrifuga en una orientación conocida. Centrifugar la temperatura ambiente a 15.000 \times g durante 2 minutos.	Por ejemplo, colocar cada tubo en la microcentrifuga con la zona articulada del tapón apuntando en la dirección contraria al centro del rotor. Tras el centrifugado, el sedimento estará localizado en la punta del tubo, por debajo de la articulación. En algunos casos, el sedimento puede ser demasiado pequeño para verse con facilidad.

(página siguiente)

(continuación)

Pasos para la purificación	Notas
<p>11. Retirar con cuidado el sobrenadante con una punta de pipeta y descartarlo. Asegúrese de no perturbar el sedimento de ADN.</p>	<p>Este sedimento contiene ADN; la pérdida del sedimento resultaría en la pérdida del ADN.</p> <p>Rotando el tubo, de forma que el sedimento quede en la pared superior, podrá deslizarse de manera segura una punta de pipeta a lo largo de la pared inferior y retirarse todo el sobrenadante.</p> <p>El sobrenadante podría contener impurezas y deberá retirarse por completo.</p> <p>Un secado excesivo del sedimento podría hacer que ADN se disuelva con mayor dificultad.</p>
<p>12. Añadir 100 µL de solución de elución para disolver el sedimento de ADN. Agitar brevemente con vórtex para resuspender completamente el ADN.</p>	<p>Si se desea una mayor concentración de ADN, deberían utilizarse 50 µL de solución de elución.</p> <p>Nota: grandes cantidades de ADN de alto peso molecular pueden tardar en hidratarse (disolverse) por completo.</p>
<p>13. Para garantizar la completa rehidratación del ADN, incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Si el ADN NO se disuelve fácilmente, agitar periódicamente con vórtex.</p>	<p>Una rehidratación incompleta del ADN es causa de imprecisión a la hora de estimar la concentración de ADN y el fallo potencial de aplicaciones posteriores, tales como PCR.</p>
<p>14. Opciones para el almacenamiento del ADN completamente rehidratado:</p> <ul style="list-style-type: none">a) El ADN purificado puede almacenarse a temperatura ambiente a 4 °C hasta 3 meses.b) El ADN purificado puede congelarse en alícuotas a -20 °C para un almacenamiento más prolongado.	

La asistencia técnica está disponible de lunes a viernes (9:00 h a 17:00 h EST):

- Número gratuito (Norteamérica): 1.866.813.6354, opción 6
- Todos los otros países: 613.723.5757, opción 6
- Email: support@dnagenotek.com

Algunos productos de DNA Genotek pueden no estar disponibles en todas las regiones geográficas. OMNIgene y prepIT son marcas registradas de DNA Genotek Inc. 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.

Legenda de la etiqueta:



Número de catálogo



Precaución: consulte las instrucciones de uso

15°C  25°C

Instrucciones de almacenamiento



Fabricante