

**PROTOCOLO NORMALIZADO DE TRABAJO 5.2
EXTRACCIÓN DE DNA AUTOMATIZADO (QIACUBE)**

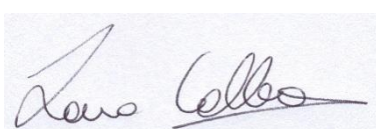
REGISTRO DE MODIFICACIONES

<i>REVISIÓN Nº</i>	<i>FECHA</i>	<i>DESCRIPCIÓN DE LAS MODIFICACIONES</i>	<i>APARTADOS MODIFICADOS</i>
01	04-04-2011	Edición inicial	
02	30-11-2012	Cambio en la documentación del ADN	4
03	17-07-2017	Cambios en la cuantificación del ADN	4.1 Paso 1
04	26-03-2019	Cambios de las puntas	3

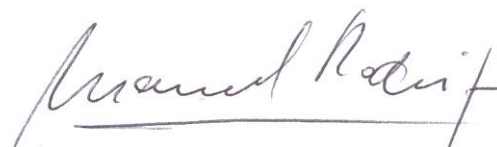
MODIFICADO POR:
LOURDES BOHORQUEZ



REVISADO POR:
LAURA CALLEROS



APROBADO POR:
MANUEL RODRIGUEZ PUYOL



EXTRACCIÓN DE DNA AUTOMATIZADO (QIACUBE)

1. MUESTRAS:

Se parte de un pellet celular de 2×10^6 o 4×10^6 según corresponda, almacenadas a -80°C .

2. MATERIALES:

Kit de aislamiento de Qiagen:

- Qia AMP DNA miniKIT (250 muestras) Ref: 50951306
- Qia AMP DNA miniKIT (50 muestras) Ref: 50951304

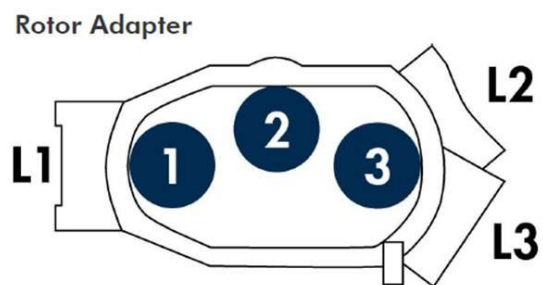
Materiales para el Qiacube:

- x 240 Rotor adapters Ref: 509990394
- x 1024 (puntas p1000) 509990352
- x 1024 (puntas p200) 509990332

- Etiquetas ROJAS (APLI) circular 10mm x315 Ref: 2053
- PBS1X estéril
- Agua estéril
- Micro pipeta 0,2-2ul y puntas (para cuantificar)

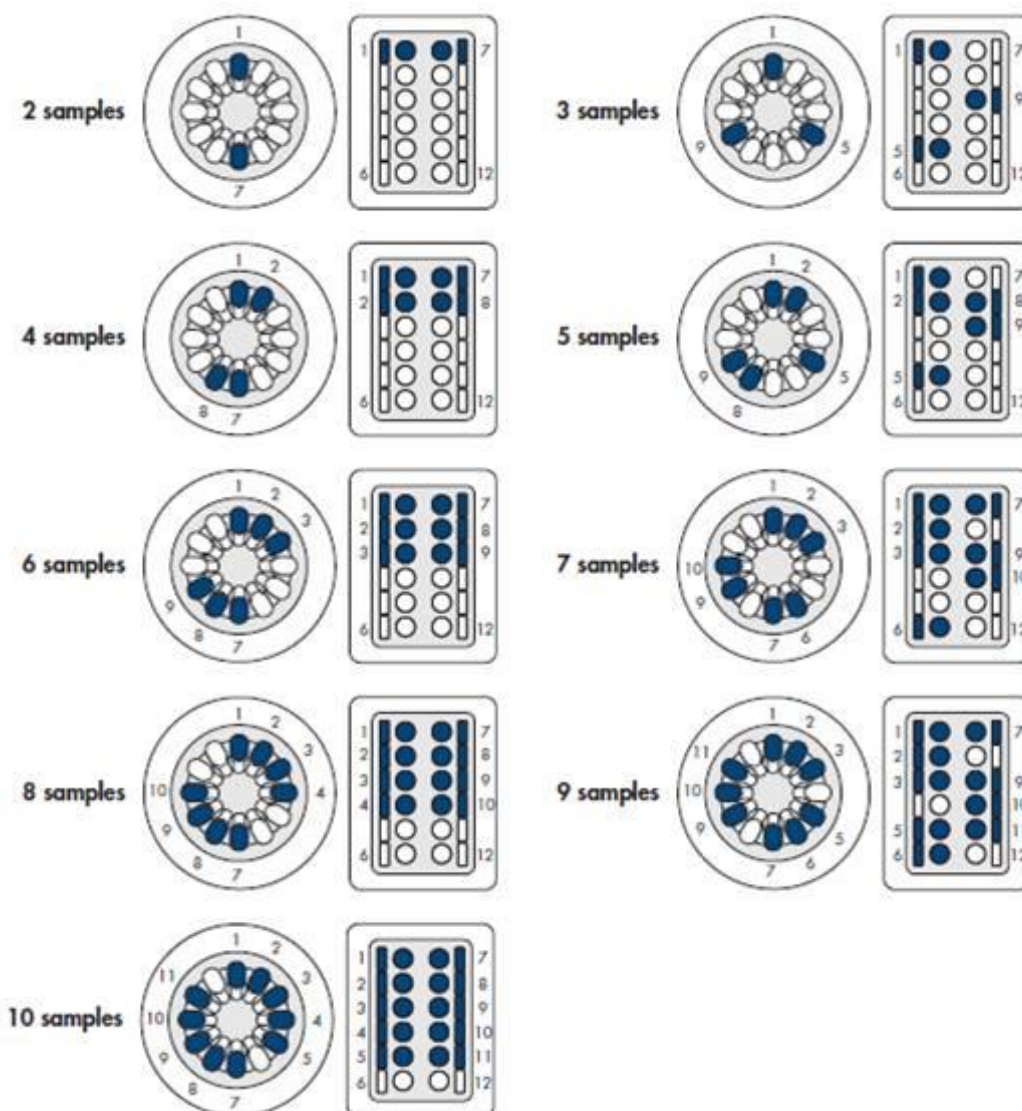
3. PROCEDIMIENTO:

- 1) Agregar 200ul de PBS1X estéril al pellet celular sin resuspender. **ES MUY IMPORTANTE RESPETAR ESTE PASO PARA QUE NO SE QUEDE PARTE DEL PELLETT EN LA PUNTA DE LA PIPETA.**
- 2) Introducir el tubo (2ml) en el Qiacube, en la posición que se le asigne, según la cantidad de tubos que tengamos y la disposición del equipo (ver *Loading chart 1*).
- 3) Preparar el *rotor adapters* con la columna y el *épendorf* en su posición correcta y ROTULADO con el N° de muestra (figura 1). Y colocarlos en la centrífuga del equipo según la posición de la muestra de paso anterior (ver *loading chart 1*).



Position	Labware	Lid position
1	QIAamp Mini spin column	L1
2	–	–
3	1.5 ml collection tube*	L3

Figura 1: ROTOR ADAPTER



Loading chart 1: Posiciones de la muestra en el termobloque y del Rotor adapter en la centrifuga.

- 4) Poner las puntas de 1000 (delante) y 200ul (detrás).
- 5) Pipetear la proteinasa K, dependiendo de la cantidad de muestras según indica la tabla 1. Ubicar en la posición A del equipo.

Tabla 1: Volúmenes (ul) de Proteínas K en la posición A que se requieren según el número de muestras


Number of samples	Volume of reagent required for the indicated number of samples (µl)		
	A	B	C
2	68		
3	90		
4	111		
5	133		
6	155		
7	176		
8	198		
9	219		
10	241		
12	284		

- 6) Ubicar los reactivos del Kit en la posición que indica la figura 2. Tener cuidado que el Buffer AL no haga burbujas porque dará error el equipo. Tener cuidado que el Kit también provee de Buffer ATL NO USARLO PARA CÉLULAS porque no tiene un buen rendimiento. En el caso de que se termine el Buffer AL antes de los otros reactivos pedirlo por separado.

Position	Reagent
1	–
2	Buffer AL
3	96–100% ethanol
4	Buffer AW1
5	Buffer AW2
6	Buffer AE or Water

Figura 2: Ubicación de los reactivos

- 7) Buscar el programa de ADN.
 8) Nombre del kit: QIAamp DNA Mini Kit.
 9) Elegir Protocolo: Standard (cuidado que hay dos protocolos cargados)
 10) **Siempre: Blood and Body fluid.**
 11) **COMENZAR EL PROTOCOLO, CON LA TAPA CERRADA DEL QIACUBE.**

 BIOBANCO REDinREN	PNT 5.2 - DNA AUTOMATIZADO	Revisión: 04 Fecha: 26/03/2019 Página 6 de 7
---	-----------------------------------	--

4. DOCUMENTACIÓN DEL PROCESO ADN:


- Editar las etiquetas en el tiempo del protocolo del ADN, conforme la lista de muestras, la información que irá en la etiqueta será **“NÚMERO DE ETIQUETA. ALÍCUOTA”** respetando la alícuota que se ha sacado.
- Cuando termine el protocolo ya sea automatizado o manual, pegar las etiquetas verificando que coincida la posición del ependorf con el tubo original en el robot Qiacube. **Sino coincide arreglar el error y documentar en la lista de muestras.**

4.1. PASO 1 –CUANTIFICACIÓN:

1. Coger las muestras de ADN en hielo, agua destilada (blanco).
2. Cuantificar Las muestras en el Espectrofotómetro con el **“PNT 10 – NanoDROP”** que lleva por nombre **“Cuantificación Ácidos Nucleicos con el Nanophotometer P-Class”**. Guardar el reporte del NanoDROP de manera digital en el Dropbox\BIOBANCO-1\Cuantificaciones.
3. El reporte del NanoDROP, será revisado por el responsable, el cuál decidirá si se tienen que repetir las cuantificaciones o el aislamiento de las muestras.
4. **Si hay que repetir la cuantificación**, el técnico encargado lo hará y al final mostrará el reporte nuevamente al responsable. Si está bien, el técnico guardará la muestra a -80°C.
5. **Si hay que repetir el aislamiento (apartado 4.2)** y/o precipitar EL ADN, se realizará al final de la sesión junto con las últimas muestras o separado (para juntar todas aquellas que haya que repetir y/o precipitar),
6. Pasar los datos de la concentración y el Ratio al Biogest.

4.2 CUANDO REPETIR EL AISLAMIENTO DE ADN DE UNA MUESTRA:

- Si la concentración del ADN aislado de una muestra que originalmente tendría 2 millones de células, se estima que la concentración esté entre 17 y 20ng/ul y los Ratios entre 1,7 y 2. En el caso que la cuantificación sea menor:
 - o Si el Ratio es menor a 1,7 o mayor a 2. Repetir la cuantificación:
 - Si el ratio está dentro de los límites esperados y la cuantificación es igual o mayor a 20ng/ul. Se registra esta cuantificación.
 - Si el ratio está dentro de los límites esperados y la cuantificación es menor a 17ng/ul. Aislar otro vial.

 BIOBANCO REDinREN	PNT 5.2 - DNA AUTOMATIZADO	Revisión: 04 Fecha: 26/03/2019 Página 7 de 7
---	-----------------------------------	--

- Si el Ratio está dentro de los límites esperados, repetir la cuantificación y si vuelve a salir baja. Aislar otro vial.
- Si aislamos otro vial y la concentración sigue siendo baja y similar al primer vial aislado. REALIZAR EL “PNT 5.3 ADN Precipitación” para diluir en un volumen menor y concentrarlo.

4.3. PASO 2- DILUCION FINAL DEL ADN:

1. Hacer una copia del inventario del Biogest “Tabla dinámica”, (no utilizar el original) y realizar un listado con las muestras solicitadas por el Investigador.
2. Agregar la concentración y volumen final e introducir la fórmula en el Excel para que calcule una columna de volumen de muestra y volumen de agua necesarios para realizar las diluciones finales adecuadas.
3. Imprimir la lista de diluciones y entregar al técnico.
4. Si el Investigador solicita las muestras en eppendorf se les pegará una nueva etiqueta de muestra y se guardará en el congelador -80°C en cajas perfectamente identificadas.
5. Ordenar los viales con el volumen sobrante en su posición.

4.4. PASO 3: DILUCIÓN FINAL Y ENVÍO:

1. Para verificar si las diluciones están dentro del rango de la concentración final que deben tener, es recomendable cuantificar el 10% de las muestras procesadas y que están listas para enviar.

Referencias:

- Qiacube protocol sheet, información general de QIAmp mini kit, blood, Standart. 2009.