
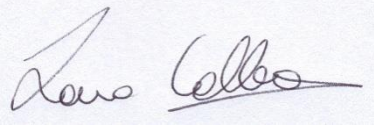
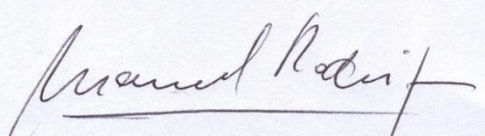



**PROTOCOLO NORMALIZADO DE TRABAJO 5.1
EXTRACCIÓN DE DNA (Mini Kit de Qiagen, MANUAL)**

REGISTRO DE MODIFICACIONES

<i>REVISIÓN</i> Nº	<i>FECHA</i>	<i>DESCRIPCIÓN DE LAS MODIFICACIONES</i>	<i>APARTADOS MODIFICADOS</i>
01	2007	Edición inicial	
02	30-03-2011	actualización	
03	30-11-2012	Cambios en la documentación del ADN	4
04	17-07-2017	Cambios en la cuantificación del ADN	4.1 Paso 1
05	26-03-2019	Protocolo NanoDROP	4.1

MODIFICADO POR: LOURDES BOHORQUEZ 	REVISADO POR: LAURA CALLEROS 	APROBADO POR: MANUEL RODRIGUEZ PUYOL 
---	--	---

 <p>BIOBANCO REDinREN</p>	<p>PNT 5.1 - ADN Manual</p>	<p>Revisión: 05 Fecha: 26-03-2019 Página 2 de 6</p>
---	------------------------------------	---

EXTRACCIÓN DE DNA (Mini Kit de Qiagen, MANUAL):

1. MUESTRAS:


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

2. MATERIALES:

- PBS 1X
- Poteinasa K
- Buffer AL
- Buffer AW1
- Buffer AW2
- Buffer AE
- Etanol 96-100%
- Columnas QIAamp mini kit
- Tubos QIAamp 2 ml
- Tubos eppendor 1.5 ml
- H₂O MilliQ

3. PROCEDIMIENTO:

- 1- Agregar al pellet celular en 200 μl de PBS 1X **SIN REDISOLVER**.
- 2- Agregar 20 μl de Proteinasa K.
- 3- Agregar 200 μl de Buffer AL, mezclar en el vortex durante 15 segundos.
- 4- Incubar a 56°C durante 10 minutos
- 5- Rápídamente dar un pulso en la microcentrífuga para que las gotas queden en el fondo del tubo.

 <p>BIOBANCO REDinREN</p>	<p>PNT 5.1 - ADN Manual</p>	<p>Revisión: 05 Fecha: 26-03-2019 Página 3 de 6</p>
--	-----------------------------	---

6- Agregar 200 µl de etanol (96-100%), y mezclar de nuevo en vortex durante 15 segundos. Después dar un pulso en la centrífuga rápidamente igual que en el paso 5.

7- Con cuidado aplicar la mezcla del paso anterior a una columna QIAamp (introducida en un tubo colector de 2 ml) sin mojar el borde, cerrar la tapa y centrifugar a 6000 xg (8000 r.p.m.) durante 1 minuto.

Cambiar la columna QIAamp en un nuevo tubo de procesado de 2 ml y desechar el tubo que contiene el eluido.

NOTA: Cuando se prepare el DNA usando Buffy coat o Linfocitos, es recomendable centrifugar a la mayor velocidad para evitar la obstrucción de la columna.

8- Abrir cuidadosamente la columna QIAamp y agregar 500 µl de Buffer AW1 sin mojar los bordes. Cerrar la tapa y centrifugar a 6000 xg (8000 r.p.m.) durante 1 minuto. Colocar la columna QIAamp en un nuevo tubo de procesado de 2 ml, y desechar el tubo previo con el eluido.

9- Abrir cuidadosamente la columna QIAamp y agregar 500 µl de Buffer AW2 sin mojar los bordes. Cerrar la tapa y centrifugar a 20.000 xg (14.000 r.p.m.) durante 3 minutos. Continuar directamente con el paso 10, pero si se quieren eliminar posibles restos de Buffer AW2, hacer el paso 9a, y continuar más tarde con el paso 10.

9^a- **Opcional:** Colocar la columna QIAamp en un nuevo tubo de procesado de 2ml, y desechar el tubo previo con el eluido. Centrifugar a 20000 x g (14000 r.p.m.) durante 1 minuto.

10-Colocar la columna QIAamp en un eppendorf de 1'5 ml y desechar el tubo previo con el eluido. Abrir con cuidado la columna QIAamp y agregar 200 µl de Buffer AE o H₂O destilada. Dejar reposar a temperatura ambiente durante 1 minuto y centrifugar a 6000 xg (8000 r.p.m.) durante 1 minuto.

11- 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.

Ratio A_{260} / A_{280} para DNA es **> 1’7 – 2** indicando la pureza del ADN aislado

- **< 1’7:** contaminación por proteínas.
- **> 2:** contaminación por RNA.


VOLUMEN DILUCIÓN(μl) partiendo de 5x10⁶ linfocitos	RENDIMIENTO (μg)	RENDIMIENTO (%)	CONCENTRACIÓN DE DNA (ng/μl)
200	6.80	100	34.0
150	6.51	95	43.4
100	6.25	92	62.5
50	5.84	86	116.8

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.

	PNT 5.1 - ADN Manual	Revisión: 05 Fecha: 26-03-2019 Página 5 de 6
---	-----------------------------	--


- 3- El reporte del NanoDROPO, 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:
 - 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.
 - 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.

 <p>BIOBANCO REDinREN</p>	<p>PNT 5.1 - ADN Manual</p>	<p>Revisión: 05 Fecha: 26-03-2019 Página 6 de 6</p>
---	------------------------------------	---

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.