

Kit de purificación de ADN circulante

características

Productos químicos no tóxicos.

- Alta recuperación de ADN circulante (cell free DNA, cfDNA).
- Protocolo corto y escalable
- El ADN purificado es adecuado para NGS, PCR, secuenciación con bisulfito, etc.

Descripción

El kit de extracción de ADN circulante cfPure® de BioChain permite un rápido y eficiente aislamiento de ADN circulante de muestras de plasma/suero. El protocolo de extracción basado en perlas El ADN extraído con este kit es adecuado para PCR, qPCR, secuenciación de próxima generación (NGS), PCR rápida (LAMP) y otras aplicaciones.

El kit ha sido diseñado para aislar ADN circulante de plasma o suero mediante el empleo de microesferas magnéticas recubiertas de silica, permitiendo la escalabilidad del proceso.

Contenido

Se proporcionan todos los reactivos necesarios para el aislamiento de cfDNA de muestras de plasma humano. Contiene suficientes reactivos para aislar cfDNA de hasta 100 ml de muestra en volúmenes de 5 mL por muestra.

Componentes del kit de extracción de cfDNA.

| componente | Cantidad | Almacenamiento |
|-------------------------------------|-------------|----------------------|
| Buffer de lisis/unión | 115 mL | Temperatura ambiente |
| Buffer de lavado | 2 X 55 mL | Temperatura ambiente |
| Buffer de elución | 6 mL | Temperatura ambiente |
| Solución de microesferas magnéticas | 2 X 1.33 mL | Temperatura ambiente |

Control de calidad

Cada componente ha sido analizado para verificar su pureza y funcionalidad.

Notas importantes

En general, este kit cfPure obtiene mayores rendimientos y captura completa de cfDNA cuando se utiliza plasma de doble centrifugado sin glóbulos blancos contaminantes. Sin

embargo, si el plasma no se centrifugó dos veces inmediatamente después de la recolección puede haber contaminación de gDNA en el plasma.

Recolección de sangre: el kit de extracción de ADN circulante se ha optimizado para su uso con muestras recolectadas en tubos EDTA y tubos de ácido dextrosa ácida (ACD).

Material inicial: tanto el plasma fresco como el congelado se pueden utilizar con el protocolo de aislamiento de ADN sin células. El plasma fresco, sin embargo, tiende a tener mayores rendimientos.

Cuantificación: el plasma producirá de 1 a 100 ng de ADN libre de células por ml de plasma. Por lo tanto, la cuantificación por la medición de absorbancia (p. ej., Nanodrop) puede no ser lo suficientemente sensible para determinar con precisión el rendimiento. En su lugar, sugerimos utilizar un ensayo de alta sensibilidad.

Recomendaciones para PCR: Debido a la naturaleza altamente fragmentada de los ácidos nucleicos obtenidos de plasma, se debe tener cuidado en el diseño de cebadores. El ADN circulante tiende a tener un tamaño pequeño (~170 pb). Por lo tanto, los cebadores de PCR deben diseñarse para producir amplicones de 150 pb o menos. Dado que baja concentración de cfDNA en plasma tomado de individuos sanos, 40 ciclos de amplificación pueden ser necesarios en algunos casos.

Tubo(s) Streck Cell-Free DNA BCT: plasma de sangre recolectada con tubos Streck Cell-Free DNA BCT debe someterse a un tratamiento con proteinasa K antes del aislamiento de ADN sin células para garantizar rendimientos óptimos. Renunciar al tratamiento con proteinasa K puede disminuir los rendimientos en un 50 %.

Equipos y reactivos suministrados por el usuario

- Pipetas
- Vortex-Genie 2 o mezclador vórtex similar*
- Soporte magnético para aplicaciones moleculares (por ejemplo, DynaMag™-15 o DynaMag™-2)
- Tubo(s) Eppendorf antiadherente de 1,5 ml
- EtOH 100 % fresco

Antes del uso inicial

Los tampones de lisis/unión y lavado se envían como un concentrado. Si se presenta un precipitado en cualquiera solución, incube la solución a 37°C durante 30 minutos. Se debe agregar EtOH al 100 % a ambas soluciones. Antes del primer uso y una vez que se agrega

EtOH, estos amortiguadores son estables durante un año. Asegúrese de cerrar la botella herméticamente para el almacenamiento a largo plazo.

Para kit de 100 ml

- Añada 23 ml de etanol fresco al 100 % a cada botella de tampón de lisis/unión y mezcle invirtiendo suavemente.
- Añada 51 ml de etanol fresco al 100 % a cada botella de tampón de lavado y mezcle invirtiendo suavemente.
- Prepare una solución fresca de etanol al 80 % antes de cada extracción

Antes de iniciar el protocolo, determine la cantidad de plasma que se utilizará para la extracción y calcule la cantidad de tampón y perlas necesarias. Cualquier cantidad de 100 µl a 10 ml de plasma puede ser usado. Escale los volúmenes de tampón y de microesferas de acuerdo con la siguiente tabla:

| Plasma | Buffer de lisis/unión | Solución de microesferas | Tamaño del tubo |
|----------------------|-----------------------|--------------------------|-----------------|
| X (X = mL de plasma) | 1.25X | 0.025X | N/A |
| 5 mL | 6.25 mL | 125 µL | 15 o 50 mL |
| 7 mL | 8.75 mL | 175 µL | 50 mL |

Tabla 1

Importante: para aplicaciones de PCR cuantitativas, utilice 0,008x en su lugar (p. ej., 40 µl de solución de microesferas para 5 ml de plasma y 56 µl de solución de perlas para 7 ml de plasma). El rendimiento final puede ser ~10-20% más bajo, pero los valores de CT obtenidos durante qPCR reflejarán las cantidades reales en la reacción. El uso de una solución de microesferas de 0,025x maximizará el rendimiento, pero puede resultar en un retraso del valor de ~1-2 CT.

Se recomienda utilizar un tubo de 50 ml para 5 ml o más de plasma en lugar de un tubo de 15 ml. mientras que un El tubo de 15 ml funcionarán, lo que puede conducir a rendimientos ligeramente más bajos.

Tratamiento con proteinasa K

Si las muestras se recogieron con tubos Streck Cell-Free DNA BCT, el tratamiento con proteinasa K es necesarios para garantizar rendimientos óptimos. Si la sangre no se recolectó con Streck Cell-Free DNA BCT proceda con el paso de lisis/unión.

| Plasma | Proteinasa K | 20% solución de SDS |
|----------------------|--------------|---------------------|
| X (X = mL de plasma) | 0.015X | 0.050X |
| 5 mL | 75 µL | 250 µL |
| 7 mL | 105 µL | 350 µL |

Tabla 2

1. Agregue la cantidad apropiada de plasma a un tubo(s) de tamaño apropiado, si es necesario, ajuste los volúmenes de acuerdo con la tabla 2.
2. Añadir 15 µl de Proteinasa K (20 mg/ml) por cada 1 ml de plasma utilizado
3. Añadir 50 µl de solución SDS al 20 % por cada 1 ml de plasma utilizado
4. Mezclar invirtiendo suavemente 5 veces
5. Incubar a 60°C durante 20 minutos
6. Después de la incubación, coloque los tubos en hielo durante 5 minutos para enfriarlos a temperatura ambiente.
7. Una vez que los tubos estén a temperatura ambiente, continúe con el paso 2 de la sección de lisis/unión.

Lisis/ Unión

1. Agregue la cantidad adecuada de plasma a los tubos del tamaño adecuado (50 mL)
2. Añada 1,25 ml de cfPure Lysis/Binding Buffer por cada 1 ml de plasma utilizado
3. Agregue 25 µl o 8 µl (consulte la nota debajo de la tabla 1) de microesferas magnéticas por cada 1 ml de plasma.

Importante: mezcle bien las perlas antes de agregarlas. No debe haber sedimentación visible en el fondo de la solución después de mezclar. Las perlas se asentarán rápidamente, así que asegúrese de mezclar la solución de perlas magnéticas después de agregarla a cada muestra. El no hacerlo puede resultar en rendimientos inconsistentes.

4. Aplique vortex o agite los tubos enérgicamente durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Para obtener altos rendimientos, asegúrese de que la solución tampón/plasma se mezcle vigorosamente en los tubos. Un mezclador de vórtice con un soporte para tubo(s) que permita la mezcla a distancia lo hará más fácil.

5. Coloque los tubos en un soporte magnético durante 2 a 5 minutos, o hasta que la solución se aclare.
6. Mientras mantiene los tubos en el soporte magnético, retire el sobrenadante. Tenga cuidado de no eliminar partículas magnéticas.
7. Mantenga los tubos en el soporte magnético durante 1 minuto y elimine el sobrenadante residual.

primer lavado

8. Agregue 2000 μl de tampón de lavado a los tubos de lisis/unión
9. Vuelva a suspender las perlas agitando en vórtex durante 20 segundos o pipeteando hacia arriba y hacia abajo 10 veces.
10. Coloque el tubo de 50 mL en el soporte magnético por 2 a 5 minutos, o hasta que la solución se vuelva clara.
11. Usando una pipeta de 1000 μl , lave el tubo usando el sobrenadante dentro de este.
12. Mantenga el tubo de 50 mL por 2 minutos más en el soporte magnético.
13. Mientras el tubo continúa en el soporte magnético, retire el sobrenadante, tenga cuidado de no remover las partículas magnéticas.
14. Transfiera los tubos a un soporte no magnético y agregue 1000 μl de buffer de lavado.
15. Resuspenda las microesferas magnéticas por vortex durante 20 segundos o pipeteando hacia arriba y abajo 10 veces.
16. Transfiera la suspensión de partículas magnéticas a microtubos de 1,5 ml en el soporte magnético.
17. Permita que las cuentas se adhieran al soporte magnético durante 10 a 30 segundos.
18. Pipetee el sobrenadante de los tubos de 1,5 ml y utilice el sobrenadante para lavar el tubo(s) de lisis/unión.
19. Transfiera el resto de las partículas magnéticas de los tubos de lisis/unión a los tubos de 1,5 ml.
20. Vuelva a suspender las perlas agitando en vórtex durante 20 segundos o pipeteando hacia arriba y hacia abajo 10 veces.
21. Centrifugue los tubos brevemente.
Se necesita la centrifugación cuando se usa agitación vorticial para resuspender perlas. Solo se recomienda un breve centrifugado para eliminar la solución de la tapa del tubo.
22. Coloque los tubos en el soporte magnético durante 10 a 30 segundos.
23. Retire la mayor cantidad posible de tampón con una pipeta de 1000 μl
24. Golpee el soporte magnético en el banco 5 veces y elimine el tampón de lavado restante con una pipeta de 200 μl .

segundo lavado

25. Transfiera los tubos a una gradilla no magnética y agregue 1000 μl de EtOH al 80 %.

26. Vuelva a suspender las perlas agitando en vórtex durante 20 segundos o pipeteando hacia arriba y hacia abajo 10 veces.
27. Centrifugue los tubos brevemente.
28. Colóque los tubos en el soporte magnético durante 10 a 30 segundos o hasta que la solución se aclare.
29. Retire la mayor cantidad posible de tampón con una pipeta de 1000 μ l.
30. Golpee el soporte magnético en el banco 5 veces y elimine el EtOH restante con una pipeta de 200 μ l.
31. Transfiera los tubos a un soporte no magnético y agregue 1000 μ l de EtOH al 80 %.
32. Vuelva a suspender las perlas agitando en vórtex durante 20 segundos o pipeteando hacia arriba y hacia abajo 10 veces.
33. Centrifugue los tubos brevemente.
34. Colóquelo en un soporte magnético durante 10-20 segundos.
35. Retire la mayor cantidad posible de EtOH con una pipeta de 1000 μ l y deje la tapa abierta.
36. Golpee el soporte magnético con tubo(s) en el banco 5 veces.
37. Retire el EtOH restante con una pipeta de 200 μ l.
38. Deje los tubos abiertos en el soporte magnético durante dos minutos y luego golpee los tubos en el banco 5 veces y elimine cualquier resto de EtOH con una pipeta de 20 μ l.
39. Permita que las partículas magnéticas se sequen durante 4 minutos más.
Tenga cuidado de no secar demasiado o las perlas pueden adherirse a los tubos.

Paso de elución

40. Transfiera los microtubos a una gradilla no magnética y agregue el volumen deseado de buffer de elución y resuspenda las microesferas magnéticas.

Importante: Para obtener rendimientos óptimos, se debe utilizar un mínimo de 100 μ l de tampón de elución cfPure.

41. Vórtice o agite los tubos enérgicamente durante 5 minutos.
42. Centrifugue los tubos brevemente.
43. Coloque los tubos en el soporte magnético durante 10 a 30 segundos.
44. Transfiera el eluido a un tubo nuevo de 1,5 ml.