



Kit de extracción de cfDNA

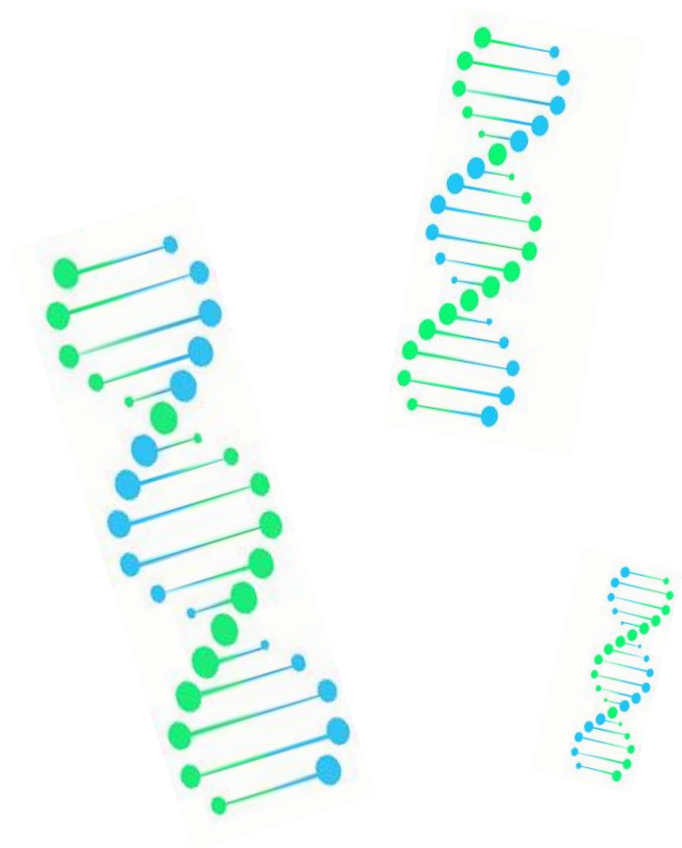
Kit de extracción de ADN circulante

Hoja de datos del producto.

Para uso exclusivo en investigación.

Almacene a temperatura ambiente.

REF KXCFD01





Contenido

1. Uso previsto	3
2. Descripción	3
3. Fundamento	3
4. Contenido	3
4.1 Reactivos y materiales suministrados:	3
4.2 Reactivos y materiales requeridos, pero no suministrados:	4
5. Notas importantes	4
6. Beneficios	4
7. Protocolo	¡Error! Marcador no definido.
8. Fecha de emisión	¡Error! Marcador no definido.
9. Referencias	8

KMD 0723/01

Este kit es fabricado por:

Amunet S.A. de C.V.



1. Uso previsto

EL Kit de purificación de ADN circulante es un kit diseñado para la extracción de ácido desoxirribonucleico libre de células circulante (del inglés cfADN) mediante el uso de perlas magnéticas a partir de muestras de suero o plasma.

2. Descripción

Este kit permite la extracción de cfADN de muestras de suero o plasma a través del empleo de un buffer de lisis celular que facilitará la unión de las perlas magnéticas recubiertas de sílice con el ácido nucleico deseado, luego se aglomeran dichas perlas con ayuda de un imán para posteriormente realizar lavados con un buffer de lavado y etanol, después las perlas magnéticas son diluidas en un buffer de elución o agua grado biología molecular para separar el ácido nucleico de estas, finalmente solo se recolecta el buffer de elución o agua grado biología molecular. De esta manera es posible eliminar componentes no deseados como sales, dNTPs, enzimas, primers/cebadores, residuos celulares y otras impurezas.

El cfADN obtenido con este kit permite utilizarlo en una amplia variedad de aplicaciones, por ejemplo, como plantilla en PCR convencional o punto final, PCR rápida (LAMP y RPA), qPCR, secuenciación de próxima generación (NGS) entre otras. Las perlas magnéticas empleadas en este kit son libres de RNasa.

3. Fundamento

El Kit de purificación de ADN circulante aprovecha la carga, una propiedad química de los ácidos nucleicos, ya que estos poseen una carga negativa debido a los grupos fosfato presentes en su estructura, lo que permite capturar dicho material utilizando moléculas cargadas positivamente [1]. Las perlas magnéticas consisten en un centro de hierro recubierto por sílice que confiere una carga positiva en su superficie, éstas se encuentran suspendidas en un buffer con una alta concentración de sales con cierto pH para mantener las cargas tanto de la superficie de las perlas magnéticas como la de los ácidos nucleicos, con ayuda del buffer de lisis celular (contiene agentes desnaturizantes de proteínas y lípidos) tendrá la función de lisar las células presentes en la muestra, de esta forma facilitará a las perlas magnéticas capturar los ácidos nucleicos, una vez realizado dicho proceso con ayuda de un imán o magneto se atraerán los núcleos de hierro permitiendo la separación de las perlas del resto de componentes de la muestra (proteínas, lípidos entre otros) para luego eliminar dichos componentes por pipeteo. Mientras las perlas son retenidas en la pared del microtubo por el imán/magneto se realizará un proceso de lavado con el buffer de lavado, el cual, tiene la función de eliminar todos los componentes no deseados posteriormente se elimina todo el buffer de lavado para finalmente eluir las perlas magnéticas en una solución acuosa con pH básico con el fin de neutralizar el pH de las perlas liberando los ácidos nucleicos capturados [2].

4. Contenido

Este kit proporciona todos los reactivos básicos para el aislamiento de cfADN de muestras de suero o plasma. Se estima el rendimiento de estos reactivos para aislar el cfADN de hasta 20 muestras en volúmenes de 4 mL por muestra.

4.1 Reactivos y materiales suministrados:

- Buffer de lisis: 87.5 mL (agregar 37.5 mL de isopropanol por única vez)
- Perlas magnéticas: 1.8 mL
- Buffer de lavado: 12 mL (agregar 12 mL de isopropanol por única vez)
- Buffer de elución: 1.5 mL (2 unidades)
- Proteinasa K: 8.5 mL



4.2 Reactivos requeridos, pero no suministrados:

- Etanol al 80%

4.3 Equipos e insumos requeridos, pero no suministrados:

- Tubos para centrifuga (1.5 mL, 2.0 mL, 5 mL, 10 mL, 15 mL)
- Micropipetas
- Vortex
- Termobloque o baño maría

5. Consideraciones importantes

- Este kit 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.
- El kit se ha optimizado para su uso con muestras recolectadas en tubos EDTA y tubos de ácido dextrosa ácida (ACD).
- 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.
- 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.
- El plasma congelado, para ser procesado deberá primero ser descongelado en su totalidad y posteriormente centrifugado preferentemente a 16,000 g por 10 minutos a 4 °C y separar el sobrenadante para continuar el proceso.
- 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.
- Uso de tubo(s) Streck Cell-Free DNA BCT: el plasma de sangre recolectada con tubos Streck CellFree DNA BCT debe someterse a un tratamiento con proteinasa K antes del aislamiento de ADN sin células para garantizar rendimientos óptimos. De no utilizar el tratamiento con proteinasa K puede disminuir los rendimientos en un 50 %.

6. Beneficios

- **Rapidez:** Mayor ahorro de tiempo con una alta reproducibilidad.
- **Simple:** Fácil operación con protocolo corto y escalable.
- **Eficiencia:** Alta eficiencia de extracción al permitir la mayor cantidad de recuperación de cfADN.
- **Seguridad:** Ningún producto químico de este kit es tóxico.
- **Versatilidad:** El cfADN purificado es funcional para una gran variedad de aplicaciones como: PCR convencional, PCR rápida (LAMP y RPA), NGS, secuenciación con bisulfito, etc.

7. Preparación de reactivos antes de usar

Los buffers de lisis/unión y lavado se envían como un concentrado. Si se presenta un precipitado en cualquier solución, incúbela a 37°C durante 30 minutos. Se debe agregar Isopropanol absoluto a ambas soluciones antes del primer uso y una vez que se agrega isopropanol, estos amortiguadores son estables durante un año.



Para kit de 20 muestras de 4 mL

- Añada 37.5 mL de Isopropanol absoluto a la botella de buffer de lisis mezcle invirtiendo suavemente.
- Añada 12 mL de Isopropanol absoluto a la botella de buffer de lavado y mezcle invirtiendo suavemente.
- Prepare una solución fresca de etanol al 80 % antes de cada extracción.

8. Condiciones de almacenamiento

La proteinasa K y la suspensión de perlas magnéticas debe almacenarse de 2 – 15 °C con una caducidad de 1 año una vez abierto. Los demás reactivos pueden almacenarse a temperatura ambiente con una caducidad de un año a partir de su apertura. Asegúrese de cerrar las botellas herméticamente para el almacenamiento a largo plazo.

9. Procedimiento

Paso 1. Lisis de la muestra y unión: Utilice la **tabla 1** para añadir los volúmenes correspondientes de proteinasa K, perlas magnéticas y buffer de lisis dependiendo del volumen de la muestra a procesar:

Tabla 1. Cantidades de cada reactivo para el lisado de la muestra y unión según el volumen de la muestra.

Volumen de la muestra	Capacidad del tubo de centrifuga	Volumen de Proteinasa K	Volumen de perlas magnéticas	Volumen de buffer de lisis
0.4 mL	2 mL	40 µL	10 µL	0.6 mL
0.5 mL		50 µL		0.75 mL
1 mL	5 mL	100 µL	20 µL	1.5 mL
2 mL	10 mL	200 µL	40 µL	3.0 mL
3 mL		300 µL	60 µL	4.5 mL
4 mL	15 mL	400 µL	80 µL	6.0 mL
5 mL		500 µL	100 µL	7.5 mL

Nota: Antes de utilizar cada reactivo mézclelo por vortex durante 10 segundos, deje reposar por 20 minutos a temperatura ambiente y durante ese lapso mezcle por vortex de 4-5 veces.

- 1A. Agregar el volumen de muestra deseada a procesar al tubo correspondiente por volumen.
- 2B. Agregar el volumen correspondiente de proteinasa K y mezcle por pipeteo o inversión.
- 3C. Agregar el volumen correspondiente de buffer de lisis y mezcle por pipeteo o inversión.
- 4D. Agregar el volumen correspondiente de perlas magnéticas.
- 5E. Mezcle por vortex durante 10 segundos o hasta que la preparación se vea completamente homogénea, posteriormente incube a temperatura ambiente por 20 minutos después mezcle por vortex 4 a 5 veces durante este periodo.

Nota: No permita que se sedimenten las perlas magnéticas.

Paso 2. Separación de perlas magnéticas: Coloque el tubo preparado en una gradilla magnética o sobre un imán de alta potencia y permita que se separen las perlas de la solución (este proceso dura 20 segundos aproximadamente). En caso de que las perlas magnéticas queden en el tubo o la tapa, mezcle por inversión el tubo para incorporar las perlas que quedaron en dichas zonas, repita hasta que se hayan adsorbido completamente las perlas.

Paso 3. Sin quitar el tubo del imán, retire el sobrenadante utilizando una micropipeta y evite tocar las perlas magnéticas durante el proceso.

Paso 4. Lavado: Agregue 1 mL de buffer de lavado al tubo y mezcle por vortex brevemente, luego mezcle 1 minuto por inversión después coloque el tubo en una gradilla magnética y permita que se separe completamente las perlas magnéticas, finalmente retire el sobrenadante de la misma forma que el paso anterior (paso 3).

Paso 5. Agregue 1 mL de etanol al 80% al tubo, mezcle por vortex durante 30 segundos y transfiera todo el contenido a un tubo nuevo y estéril de 1.5 mL, pase dicho tubo a la gradilla magnética y deje que las perlas magnéticas se separen, posteriormente elimine el sobrenadante como en el paso 3.

Paso 6. Agregue nuevamente 1 mL de etanol al 80% al tubo de 1.5 mL, mezcle por vortex durante 30 segundos después colóquelo en una gradilla magnética, permita que las perlas magnéticas se separen y proceda a eliminar el sobrenadante como en el paso 3.

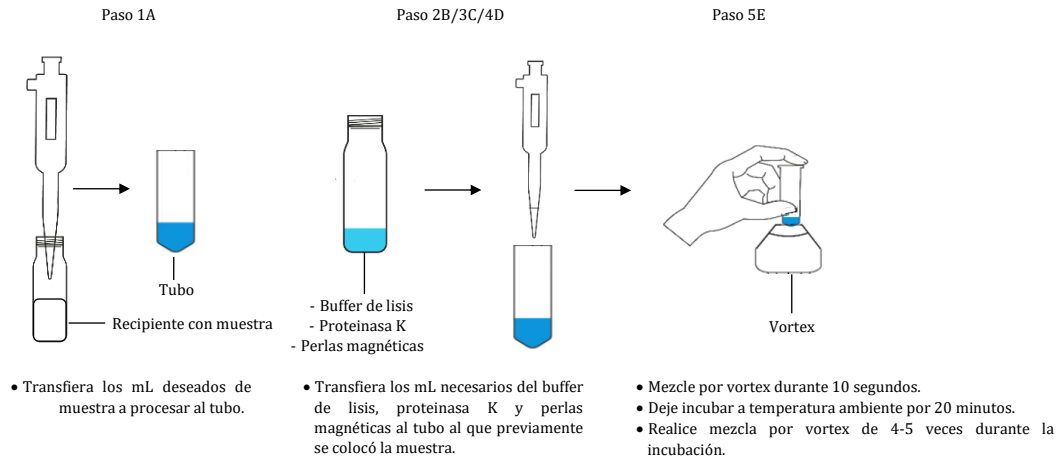
Paso 7. Eliminación de residuos de etanol: Deje el tubo en la gradilla magnética con la tapa abierta en un área bien ventilada por 5 minutos para eliminar por completo los residuos de alcohol.

Paso 8. Elución: Agregue de 25 a 100 μ L de buffer de elución y mezcle completamente por vortex, luego mantenga en agitación durante 5 minutos a temperatura ambiente con algún equipo agitador o de forma manual.

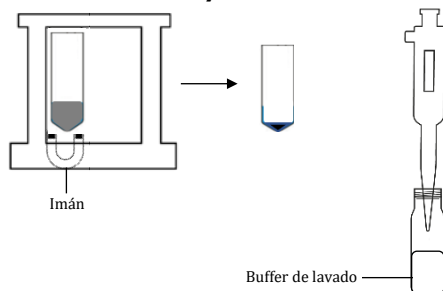
Nota: Para una mejor extracción se recomienda precalentar el buffer de elución o agua libre de nucleasas a 55 $^{\circ}$ C.

Paso 9. Obtención de ácidos nucleicos: Coloque el tubo en la gradilla magnética y deje que las perlas magnéticas se separen del buffer de elución, esto durante un 1 minuto. Finalmente recolecte el buffer de elución y transfíralo a un tubo nuevo de un tamaño a su preferencia, después almacénelo a -20 $^{\circ}$ C para su posterior uso.

PASO 1

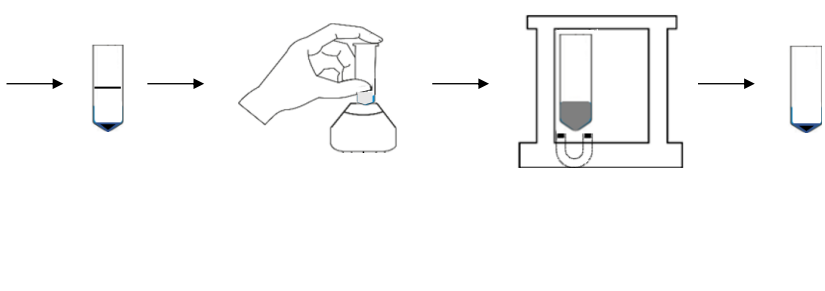


PASO 2 y 3



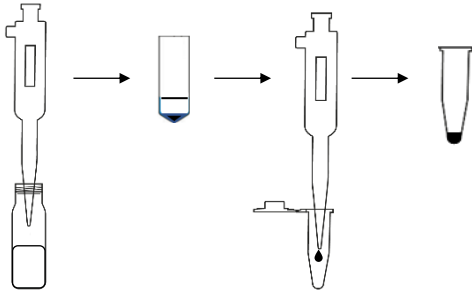
- Coloque el tubo en una gradilla magnética o imán, espere a que la mezcla se aclare y extraiga el sobrenadante sin llevarse las perlas magnéticas.

PASO 4



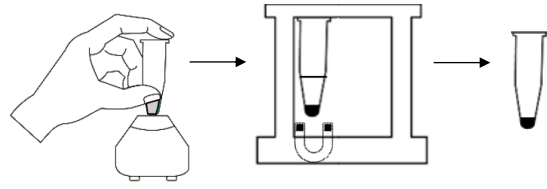
- Agregue 1 mL de buffer de lavado y mezcle por vortex brevemente.
- Mezcle la preparación por inversión durante 1 minuto.
- Coloque el tubo en una gradilla magnética o con un imán, espere a que las perlas magnéticas se separen y extraiga el sobrenadante sin llevarse las perlas magnéticas.

PASO 5



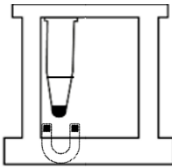
- Agregue 1 mL de etanol y mezcle por vórtex durante 30 segundos.
- Pase la mezcla a un tubo nuevo y estéril de 1.5 mL.
- Coloque el tubo en una gradilla magnética, espere a que se separe y retire el sobrenadante.

PASO 6



- Agregue 1 mL de etanol y mezcle por vórtex durante 30 segundos.
- Coloque el tubo en una gradilla magnética, espere a que se separe y retire el sobrenadante.

PASO 7



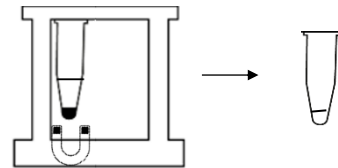
- Deje el tubo abierto por 5 minutos para eliminar los residuos de etanol.

PASO 8



- Agregue de 25 a 100 μ L del buffer de elución y deje en agitación por 5 minutos (manual o automatizada)

PASO 9













- Coloque el tubo en la gradilla magnética.
- Deje que las perlas magnéticas se separen del buffer de elución, después de un 1 minuto recolecte el buffer de elución y transfíralo a un tubo nuevo y almacénelo a -20°C .

10. Referencias

- [1]. Sambrook J., E. F. Fritsch y T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, EE.UU.
- [2]. Dundass N., N. K. Leos, M. Mitui, P. Revell y B. B. Rogers. 2008. Comparison of automated nucleic acid extraction methods with manual extraction. Journal of Molecular Diagnostics 10: 311-316.

11. Simbología utilizada

Símbolo	Descripción
	Número de catálogo
	Lote
	Fabricante
	Fecha de caducidad
	No use si el empaque se encuentra dañado
	Consulta instrucciones de uso
	Temperatura límite 2°C~29°C.
	No reutilizar
	Mantenga en un lugar seco y fresco
	Uso para investigación

Para más información ingresa a: www.amunet.com.mx