

Agosto 2015

Hoja de protocolo del instrumento QIAasymphony[®] SP

Tissue_LC_200_V7_DSP y Tissue_HC_200_V7_DSP
(validados por el usuario para el kit QIAasymphony
DSP DNA Mini)

Este documento es Hoja de protocolo del instrumento QIAasymphony SP para los protocolos
Tissue_LC_200_V7_DSP y *Tissue_HC_200_V7_DSP* (validados por el usuario para el kit
QIAasymphony DSP DNA Mini), R1, para la versión 1 del kit.

Información general

Estos protocolos están indicados para la purificación del ADN total procedente de células cultivadas y de cultivos bacterianos mediante el instrumento QIASymphony SP y el kit QIASymphony DSP DNA Mini.

En función del tipo de muestra recomendamos usar un protocolo de bajo contenido (LC, *low content*) o de alto contenido (HC, *high content*). Las células cultivadas y los cultivos bacterianos proporcionarán valores de ADN mayores si se procesan con el protocolo de alto contenido, pero se puede utilizar el protocolo de bajo contenido en combinación con un volumen de elución reducido (50 µl) si se necesita una concentración elevada de ADN.

El kit QIASymphony DSP DNA Mini, en combinación con los protocolos Tissue_LC_200_V7_DSP y Tissue_HC_200_V7_DSP (validados por el usuario para el kit QIASymphony DSP DNA Mini) para la purificación de ADN total a partir de células cultivadas y de cultivos bacterianos, está indicado para aplicaciones de biología molecular. Este producto no está indicado para el diagnóstico, la prevención ni el tratamiento de enfermedades.

Nota: Es responsabilidad del usuario validar el rendimiento con esta combinación para cualquier procedimiento utilizado en su laboratorio.

Protocolo de bajo contenido

Kit	Kit QIASymphony DSP DNA Mini (n.º de catálogo 937236)
Material de muestra	Células cultivadas y cultivos bacterianos Tamaños máximos de muestra recomendados: Para cultivo celular, 5×10^5 células Para cultivo bacteriano, 1×10^9 células
Nombre del protocolo	Tissue_LC_200_V7_DSP
Juego de controles de ensayo predeterminado	ACS_Tissue_LC_200_V7_DSP
Volumen de elución	50 µl, 100 µl, 200 µl o 400 µl
Versión del software requerida	Versión 4.0

Protocolo de alto contenido

Kit	Kit QIAasymphony DSP DNA Mini (n.º de catálogo 937236)
Material de muestra	Células cultivadas y cultivos bacterianos Tamaños máximos de muestra recomendados: Para cultivo celular, 1×10^7 células Para cultivo bacteriano, 4×10^9 células
Nombre del protocolo	Tissue_HC_200_V7_DSP
Juego de controles de ensayo predeterminado	ACS_Tissue_HC_200_V7_DSP
Volumen de elución	100 µl, 200 µl o 400 µl
Versión del software requerida	Versión 4.0

Materiales necesarios pero no suministrados

Para todos los tipos de muestras

- Para reducir al mínimo el contenido de ARN: ARNasa A (solución de partida de 100 mg/ml) (n.º de catálogo 19101)

Para bacterias gramnegativas

- Tampón ATL (n.º de catálogo 19076)

Para bacterias grampositivas

- Tampón P1 (n.º de catálogo 19051)
- Lisozima (solución de partida de 100 mg/ml)

Para células cultivadas

- Tampón P1 (n.º de catálogo 19051)

Cajón "Sample" (Muestras)

Tipo de muestra	Células cultivadas y cultivos bacterianos
Volumen de entrada de las muestras	220 µl (necesarios por muestra, por protocolo)*
Volumen de muestra procesado	200 µl
Tubos de muestra primarios	n/a
Tubos de muestra secundarios	Si desea obtener más información, consulte www.qiagen.com/goto/dsphandbooks .
Insertos	Depende del tipo de tubo de muestra utilizado; si desea obtener más información, consulte www.qiagen.com/goto/dsphandbooks .

* Para los protocolos de alto contenido y de bajo contenido, el sistema no reconocerá si el volumen de la muestra es inferior a 220 µl debido a que la transferencia de la muestra se realiza sin detección del nivel de líquido. Por consiguiente, asegúrese de que el volumen de entrada de la muestra sea 220 µl.

n/a = no aplicable.

Cajón "Reagents and Consumables" (Reactivos y consumibles)

Posición A1 y/o A2	Cartucho de reactivos
Posición B1	n/a
Soporte de gradillas de puntas 1-17	Puntas con filtro desechables, 200 µl o 1.500 µl
Soporte de caja unitaria 1-4	Cajas unitarias que contienen cartuchos de preparación de muestras o cubiertas para 8 barras

n/a = no aplicable.

Cajón "Waste" (Desechos)

Soporte de caja unitaria 1-4	Cajas unitarias vacías
Soporte de la bolsa de desechos	Bolsa de desechos
Soporte para frasco de desechos líquidos	Frasco de desechos líquidos vacío

Cajón "Eluate" (Eluidos)

Gradilla de elución (recomendamos utilizar la ranura 1, posición de refrigeración)	Si desea obtener más información, consulte www.qiagen.com/goto/dsphandbooks .
---	---

Material de plástico necesario

Material de plástico	Un lote, 24 muestras*	Dos lotes, 48 muestras*	Tres lotes, 72 muestras*	Cuatro lotes, 96 muestras*
Puntas con filtro desechables, 200 µl†‡	26	50	74	98
Puntas con filtro desechables, 1.500 µl†‡	72	136	200	264
Cartuchos de preparación de muestras§	21	42	63	84
Cubiertas para 8 barras¶	3	6	9	12

* Si se utilizan menos de 24 muestras por lote se reduce el número de puntas con filtro desechables necesarias por serie.

† Hay 32 puntas con filtro por gradilla de puntas con filtro.

‡ El número de puntas con filtro necesarias incluye las puntas con filtro para 1 examen de inventario por cartucho de reactivos.

§ Hay 28 cartuchos de preparación de muestras por caja unitaria.

¶ Hay doce cubiertas para 8 barras por caja unitaria.

Nota: Los números de puntas con filtro proporcionados pueden diferir de los números mostrados en la pantalla táctil dependiendo de la configuración. Recomendamos cargar el número máximo posible de puntas.

Volumen de elución

El volumen de elución se selecciona en la pantalla táctil. En función del tipo de muestra y del contenido de ADN, el volumen final de eluido puede ser en hasta 15 µl inferior al volumen seleccionado. Debido a que el volumen de eluido puede diferir, recomendamos comprobar el volumen real de eluido cuando se utilice un sistema de preparación de ensayos automático que no verifique el volumen de eluido antes de la transferencia. Los volúmenes de eluido más bajos aumentan la concentración final de ADN, pero reducen ligeramente el rendimiento. Recomendamos utilizar un volumen de elución adecuado para la aplicación posterior prevista.

Preparación del material de muestra

Cuando trabaje con productos químicos, use siempre una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas de protección. Si desea obtener más información, consulte las fichas de datos de seguridad (SDS, *safety data sheets*) correspondientes que el proveedor del producto pone a su disposición.

Cuestión importante antes de comenzar

- Las partículas magnéticas de QIAsymphony purifican conjuntamente el ARN y el ADN si ambos están presentes en la muestra. Para reducir al mínimo el contenido de ARN de la muestra, añada ARNasa A a la muestra en el paso indicado en el protocolo de pretratamiento correspondiente.

Cosas que hacer antes de comenzar

- Si utiliza el tampón ATL, compruebe que este no contiene un precipitado blanco. En caso necesario, incube durante 30 minutos a 37 °C, agitando de vez en cuando para disolver el precipitado.
- Ajuste un ThermoMixer® o un agitador-incubador a la temperatura necesaria para el pretratamiento correspondiente*.

Células cultivadas

Pueden utilizarse células cultivadas frescas y congeladas. Recomendamos utilizar el protocolo de alto contenido para un máximo de 1×10^7 células. El protocolo de bajo contenido producirá valores más bajos de ADN y solamente se recomienda, en combinación con un volumen de elución reducido (50 μ l), si se necesita una concentración elevada de ADN. Los precipitados celulares congelados deben ponerse de nuevo en suspensión en tampón P1 tal como se describe en el protocolo de pretratamiento.

Protocolo de pretratamiento para células cultivadas

1. Centrifugue un máximo de 1×10^7 células a 300 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente (15-25 °C). Retire y deseche el sobrenadante, con cuidado de no alterar el precipitado celular.
Nota: El precipitado celular puede conservarse a -20 °C o a -70 °C para un uso futuro, o puede usarse inmediatamente.
2. Ponga de nuevo en suspensión el precipitado en 220 μ l de tampón P1 y transfiera la muestra a un tubo de microcentrifugadora de 2 ml (no suministrado).
3. Añada 20 μ l de proteinasa K y mezcle dando suaves golpecitos al tubo.

Nota: Use proteinasa K de la gradilla de enzimas del kit QIAsymphony DSP DNA Mini.

* Asegúrese de que los instrumentos se hayan verificado, sometido a mantenimiento y calibrado con regularidad conforme a las instrucciones del fabricante.

- Coloque el tubo en un ThermoMixer o en un agitador-incubador e incúbelo a 56 °C agitándolo a 900 rpm durante entre 30 minutos y 2 horas.

Nota: El tiempo de lisis depende del tipo y del número de células. Si la lisis todavía es incompleta después de 2 horas, tal como indica la presencia de material insoluble o de lisados altamente viscosos, puede prolongarse el tiempo de lisis o quitarse el material insoluble mediante centrifugación tal como se describe en el paso 6. Es posible realizar la lisis durante la noche; esto no afectará a la preparación.

- Para reducir al mínimo el contenido de ARN de la muestra, añada 4 µl de ARNasa A (100 mg/ml) e incube la mezcla durante 2 minutos a temperatura ambiente (15-25 °C) antes de continuar con el paso 6.

- Transfiera con cuidado 220 µl del lisado a tubos de muestra compatibles con el soporte de muestras del instrumento QIASymphony SP.

Nota: Si el lisado contiene material no digerido, centrifugue a velocidad máxima durante 2 minutos a temperatura ambiente antes de transferir el sobrenadante a los tubos de muestra. Si desea ver una lista completa de los tubos de muestra compatibles, consulte www.qiagen.com/goto/dsphandbooks. Recomendamos utilizar tubos de 2 ml (p. ej., Sarstedt®, n.º de catálogo 72.693 o 72.608).

Bacterias

Pueden utilizarse cultivos bacterianos frescos y congelados. Recomendamos utilizar el protocolo de alto contenido con un máximo de 4×10^9 células. El protocolo de bajo contenido producirá valores más bajos de ADN y solamente se recomienda, en combinación con un volumen de elución reducido (50 µl), si se necesita una concentración elevada de ADN. El crecimiento bacteriano suele medirse como densidad óptica (DO) del cultivo bacteriano utilizando un espectrofotómetro. Sin embargo, las lecturas de DO dependen en gran medida del tipo de espectrofotómetro utilizado y de la especie bacteriana medida. Por consiguiente, recomendamos calibrar el espectrofotómetro estableciendo una correlación entre los valores de DO medidos y los números de células bacterianas. Los precipitados congelados deben ponerse de nuevo en suspensión en tampón P1 (bacterias grampositivas) o en tampón ATL (bacterias gramnegativas), tal como se describe en los protocolos de pretratamiento.

Protocolo de pretratamiento para bacterias gramnegativas

- Recoja un máximo de 4×10^9 células mediante centrifugación durante 10 minutos a $5.000 \times g$ a temperatura ambiente (15-25 °C). Retire y deseche el sobrenadante, con cuidado de no alterar el precipitado bacteriano.

Nota: El precipitado celular puede conservarse a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ o a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ para un uso futuro, o puede usarse inmediatamente.

2. Ponga de nuevo en suspensión el precipitado bacteriano en 220 μl de tampón ATL y transfiera la muestra a un tubo de microcentrifugadora de 2 ml (no suministrado).
3. Añada 20 μl de proteinasa K y mezcle dando suaves golpecitos al tubo.

Nota: Use proteinasa K de la gradilla de enzimas del kit QIAasymphony DSP DNA Mini.

4. Coloque el tubo en un ThermoMixer o en un agitador-incubador e incúbelo a $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ agitándolo a 900 rpm durante entre 30 minutos y 2 horas.

Nota: El tiempo de lisis depende del tipo y del número de células. Si la lisis todavía es incompleta después de 2 horas, tal como indica la presencia de material insoluble o de lisados altamente viscosos, puede prolongarse el tiempo de lisis o quitarse el material insoluble mediante centrifugación tal como se describe en el paso 6.

5. Para reducir al mínimo el contenido de ARN de la muestra, añada 4 μl de ARNasa A (100 mg/ml) e incube la mezcla durante 2 minutos a temperatura ambiente antes de continuar con el paso 6.
6. Transfiera con cuidado 220 μl del lisado a tubos de muestra compatibles con el soporte de muestras del instrumento QIAasymphony SP.

Nota: Si el lisado contiene material no digerido, centrifugue a velocidad máxima durante 2 minutos a temperatura ambiente antes de transferir el sobrenadante a los tubos de muestra. Si desea ver una lista completa de los tubos de muestra compatibles, consulte www.qiagen.com/goto/dsphandbooks. Recomendamos utilizar tubos de 2 ml (p. ej., Sarstedt, n.º de catálogo 72.693 o 72.608).

Protocolo de pretratamiento para bacterias grampositivas

1. Recoja un máximo de 4×10^9 células mediante centrifugación durante 10 minutos a $5.000 \times g$ a temperatura ambiente ($15\text{-}25\text{ }^{\circ}\text{C}$). Retire y deseche el sobrenadante, con cuidado de no alterar el precipitado bacteriano.

Nota: El precipitado celular puede conservarse a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ o a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ para un uso futuro, o puede usarse inmediatamente.

2. Ponga de nuevo en suspensión el precipitado bacteriano en 200 μl de tampón P1 y transfiera la muestra a un tubo de microcentrifugadora de 2 ml (no suministrado).
3. Añada 20 μl de lisozima (100 mg/ml) y mezcle dando suaves golpecitos al tubo.
4. Coloque el tubo en un ThermoMixer o en un agitador-incubador e incúbelo a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ agitándolo a 900 rpm durante entre 30 minutos y 2 horas.

Nota: El tiempo de lisis depende del tipo y del número de células.

5. Añada 20 μl de proteinasa K y mezcle dando suaves golpecitos al tubo.

Nota: Use proteinasa K de la gradilla de enzimas del kit QIAasymphony DSP DNA Mini.

6. Incube a 56 °C agitando a 900 rpm durante 30 minutos.
7. Para reducir al mínimo el contenido de ARN de la muestra, añada 4 µl de ARNasa A (100 mg/ml) e incube la mezcla durante 2 minutos a temperatura ambiente antes de continuar con el paso 8.
8. Transfiera con cuidado 220 µl del lisado a tubos de muestra compatibles con el soporte de muestras del instrumento QIAasymphony SP.

Nota: Si el lisado contiene material no digerido, centrifugue a velocidad máxima durante 2 minutos a temperatura ambiente antes de transferir el sobrenadante a los tubos de muestra. Si desea ver una lista completa de los tubos de muestra compatibles, consulte www.qiagen.com/goto/dsphandbooks. Recomendamos utilizar tubos de 2 ml (p. ej., Sarstedt, n.º de catálogo 72.693 o 72.608).

Si desea obtener información actualizada sobre la licencia y las exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte el manual o la guía del usuario del kit de QIAGEN correspondiente. Los manuales y las guías del usuario de los kits de QIAGEN están disponibles en www.qiagen.com o pueden solicitarse al servicio técnico de QIAGEN o al distribuidor local.

Marcas comerciales: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony® (QIAGEN Group); Sarstedt® (Sarstedt AG and Co.); ThermoMixer® (Eppendorf AG). No debe considerarse que los nombres registrados, marcas comerciales, etc., que se utilizan en este documento no están protegidos por la ley aunque no se hayan identificado específicamente como tales. 08/2015 HB-0977-S09-001
© 2015 QIAGEN, todos los derechos reservados.

