



DANAGENE BLOOD DNA KIT

Ref. 0601 100 ml

Ref. 0602 200 ml

1. INTRODUCCIÓN

DANAGENE BLOOD DNA Kit provee un método para la extracción de ADN genómico de alta calidad a partir de sangre total o médula ósea.

Es un método rápido, seguro y económico. Su protocolo es escalable permitiendo procesar muestras de diferentes tamaños. Utiliza un paso de desproteización con un novedoso tampón salino evitando el uso de disolventes orgánicos tóxicos como fenol o cloroformo.

Este Kit provee reactivos suficientes para el procesado de 100-200 ml -según tamaño del kit- de sangre.

La obtención de ADN oscila entre 15-45 $\mu\text{g/ml}$ de sangre total y está libre de inhibidores de la PCR y otras reacciones enzimáticas.

2. COMPONENTES KIT

	Ref. 0601 100 ml	Ref. 0602 200 ml	
Solución de Lisis RBC	300 ml	600 ml	T ^a ambiente
Solución de Lisis	100 ml	200 ml	T ^a ambiente
Solución de Precipitación de proteínas	35 ml	70 ml	T ^a ambiente
Solución de Hidratación	35 ml	70 ml	T ^a ambiente

Equipos y reactivos necesarios y no provistos

- Isopropanol.
- Etanol 70%.
- Microtubos de 1,5 ml, tubos de centrifuga de 15 o 50 ml.
- Microcentrifuga o centrifuga clínica.
- Vortex.
- Baño de agua.

Almacenamiento y estabilidad

Todos los componentes son estables durante 12 meses desde la fecha de compra siendo almacenados y utilizados como se indica.

3. PROTOCOLO

El protocolo implica los siguientes pasos:

* Lisis selectiva de los eritrocitos, las células que contienen el ADN son separadas de los eritrocitos que son lisados.

* Lisis celular. Las células son lisadas con un detergente aniónico que solubiliza los componentes celulares.

*Precipitación de proteínas. Se eliminan las proteínas citoplasmáticas y nucleares por precipitación salina.

* Precipitación ADN. El ADN genómico se extrae con una precipitación con isopropanol.

* Hidratación del ADN. El pellet de ADN es disuelto en agua estéril o la solución de hidratación mediante incubación a 65°C o “overnight” a T^a ambiente y agitación.

3.1 Preparaciones preliminares

* Si la Solución de Lisis contiene un precipitado debido a las bajas temperaturas, incubar a 37°C y mezclar para disolver el precipitado.

3.2 Protocolo extracción a partir de sangre total

1. Recoger la sangre en tubos que contengan 15 % EDTA para reducir la degradación del ADN y coagulación, otros anticoagulantes como el citrato de sodio o heparina también funcionan bien.

2. Muestras frescas pueden conservarse a 4°C por no más de 5 días.

3. Muestras congeladas son estables a -80°C por dos años.

Extracción a partir de muestras de 300 µl. Microtubos 1,5 – 2,0 ml y microcentrifuga.

Lisis Celular

1. Añadir 300 µl de sangre en un microtubo que contenga 900 µl de **Solución Lisis de RBC**. Mezclar y incubar durante 10 minutos a T^a ambiente. Invertir el tubo varias veces durante la incubación.

2. Centrifugar durante 20-30 segundos a 13.000-16.000 x g. Eliminar el sobrenadante con pipeta sin dañar el pellet visible de células y dejar 10-20 µl de líquido residual.

3. Vortex el microtubo para resuspender el pellet, lo cual ayudará a la lisis celular del paso 4.

4. Añadir 300 µl de **Solución de Lisis** y resuspender mediante pipeta para lisar las células.

Es muy importante observar la solución homogénea sin grupos celulares, se recomienda la incubación a 37°C durante 5 minutos o hasta que se observe la solución homogénea.

Precipitación proteica.

OPCIONAL: Añadir 1,5 µl RNasa (10 mg/ml) y mezclar bien. Incubar durante 15 minutos a 37°C.

1. Enfriar la muestra a T^a ambiente.

2. Añadir 100 µl de **Solución de Precipitación proteica** al lisado celular. Vortex vigorosamente a máxima velocidad durante 20-30 segundos.

3. Centrifugar a 13.000-16.000 x g durante 3-5 minutos. Se formará un precipitado marrón oscuro. Si se observan partículas flotando volver a centrifugar después de incubar 5 minutos en hielo.

Precipitación del ADN.

1. Traspasar el sobrenadante que contiene el ADN a un microtubo nuevo que contiene 300µl de **Isopropanol**.

2. Mezclar por inversión unas 50 veces.

3. Centrifugar a 13.000-16.000 x g durante 2 minutos. El ADN será visible como un pellet blanco.

4. Eliminar el sobrenadante y secar el tubo de forma breve en papel absorbente. Añadir 300 µl de **Etanol 70%** para lavar el ADN.

5. Centrifugar a 13.000-16.000 x g durante 1 minuto. Cuidadosamente eliminar el sobrenadante sin tocar el pellet de ADN. Se puede volver a centrifugar brevemente para recoger con una micropipeta las últimas gotas de etanol residual evitando tocar el pellet de ADN.

6. Invertir el microtubo en un papel absorbente y dejar secar durante unos 15 minutos.

Hidratación del ADN.

1. Añadir 100 µl de la **Solución de Hidratación** y resuspender con pipeta.

2. Conservar a 2-8°C. Para almacenajes largos conservar a -20°C o - 80 °C.

Extracción a partir de muestras de 3 ml. Tubos 15 o 50 ml y centrifugas clínicas.

Lisis Celular

1. Añadir 3 ml de sangre en un tubo que contenga 9 ml de **Solución Lisis de RBC**. Mezclar y incubar durante 10 minutos a T^a ambiente. Invertir el tubo varias veces durante la incubación.

2. Centrifugar durante 10 minutos a 2.000 x g . Eliminar el sobrenadante con pipeta sin dañar el pellet visible de células y dejar 100-200 µl de líquido residual.

3. Vortex el tubo para resuspender el pellet, lo cual ayudará a la lisis celular del paso 4.

4. Añadir 3 ml de **Solución de Lisis** y resuspender mediante pipeta para lisar las células.

Es muy importante observar la solución homogénea sin grupos celulares para aumentar el rendimiento en la obtención de ADN, se recomienda la incubación a 37°C durante 5 minutos o hasta que se observe la solución homogénea

Precipitación proteica.

OPCIONAL: Añadir 15 µl RNasa (10 mg/ ml) y mezclar bien. Incubar durante 15 minutos a 37°C.

1. Enfriar la muestra a T^a ambiente.

2. Añadir 1,0 ml de **Solución de Precipitación proteica** al lisado celular. Vortex vigorosamente a máxima velocidad durante 20-30 segundos.

3. Centrifugar a 2.000 x g durante 5 minutos. Se formará un precipitado marrón oscuro. Si se observan partículas flotando volver a centrifugar después de incubar 5 minutos en hielo.

Precipitación del ADN.

1. Traspasar el sobrenadante que contiene el ADN a un tubo nuevo que contiene 3 ml de **Isopropanol**.

2. Mezclar por inversión unas 50 veces.

3. Centrifugar a 2.000 x g durante 3 minutos. El ADN será visible como un pellet blanco.

4. Eliminar el sobrenadante y secar el tubo de forma breve en papel absorbente. Añadir 3 ml de **Etanol 70%** para lavar el ADN.

5. Centrifugar a 2.000 x g durante 2 minutos. Cuidadosamente eliminar el sobrenadante sin tocar el pellet de ADN. Se puede volver a centrifugar brevemente para recoger con una micropipeta las últimas gotas de etanol residual evitando tocar el pellet de ADN.

6. Invertir el microtubo en un papel absorbente y dejar secar durante unos 15 minutos.

Hidratación del ADN.

1. Añadir 250-500 µl de **Solución de Hidratación** y resuspender con pipeta.
2. Incubar a 65°C durante 1 hora con periódicas agitaciones para ayudar a la dispersión del ADN, o incubar “overnight” a temperatura ambiente con ligera agitación.
3. Transferir a un microtubo de 1,5 ml y conservar a 2-8°C. Para almacenajes largos conservar a -20°C o - 80 °C.

Tabla de volúmenes de reactivos escalados a partir de 5µl hasta 10 ml

Vol. Sangre	5-25µl	50 µl	200 µl	500 µl	1 ml	5 ml	10 ml
Tamaño tubo	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	2,0 ml	15 ml	50 ml	50 ml
Sol. Lisis de RBC	75 µl	150 µl	600 µl	1,5 ml	3 ml	15 ml	30 ml
Sol. de lisis	5-25 µl	50 µl	200 µl	500 µl	1 ml	5 ml	10 ml
Sol. Precipitación	5-10 µl	17 µl	67 µl	170 µl	330µl	1,67 ml	3,3 ml
Isopropanol	25 µl	50 µl	200 µl	500 µl	1 ml	5 ml	10 ml
Etanol 70%	25 µl	50 µl	200 µl	500 µl	1 ml	5 ml	10 ml
Obtención µg	0,15-0,75	0,8-2,0	3,0-8,0	7,0-23	15-40	75-200	150-400

4. GUIA DE PROBLEMAS Y POSIBLES SOLUCIONES

1. Lisis incompleta de eritrocitos. Volver a incubar con la solución Lisis de RBC.

2. Presencia de coágulos sanguíneos en la muestra de sangre total. La muestra no fue conservada adecuadamente o mezclada inadecuadamente en EDTA en el tubo de recogida. Extraer el ADN sólo de la porción de muestra no coagulada, evitando transferir coágulos del tubo de recogida.

3. Lisis celular incompleta.

3.1 Debido a que el número de células era demasiado grande para la cantidad de Solución de Lisis utilizada. Para solucionarlo añadir más cantidad de la Solución de Lisis.

3.2 Debido a la formación de grumos o grupos de células, esto ocurre cuando las células no son resuspendidas correctamente antes de añadir la Solución de Lisis. Incubar en la solución de Lisis hasta que la solución sea homogénea.

4. No se produce precipitación proteica.

4.1 La muestra no fue suficientemente enfriada previamente a la adición de la Solución de Precipitación.

4.2 No se mezcló lo suficientemente con la Solución de Precipitación. Vortex el tiempo indicado.

4.3 La velocidad de centrifugación no fue correcta. Para microcentrifugas utiliza la máxima velocidad. Para otras centrifugas la velocidad es de 2.000 x g que no es equivalente a 2.000 rpm. Si su centrifuga no alcanza 2.000 x g aumentar el tiempo de centrifugación.

5. Baja rehidratación del ADN.

5.1 Las muestras no fueron mezcladas durante el paso de rehidratación. Mezclar las muestras periódicamente.

5.2 Los pellets se secaron en exceso. Aumentar el tiempo de rehidratación. No incubar "overnight" a 65°C.

6. Contaminación proteica en el ADN rehidratado.

Debido a que se utilizó una muestra demasiado grande. Re-extraer el ADN.

7. Calidad del ADN.

$A_{260/280}$ demasiado alta o demasiado baja. Si la muestra está contaminada con proteínas tendremos un valor $< 1,6$. Por el contrario, si es mayor $> 2,0$, la muestra contendrá ARN, realizar un tratamiento con RNAsa. A pesar de que tengamos valores malos, el mejor indicador de la calidad del ADN es determinar si el ADN extraído puede ser digerido con enzimas de restricción o amplificarlo utilizando la PCR.

8. El ADN obtenido es menor de 50Kb.

El ADN está degradado debido a una incorrecta recogida de la muestra o un almacenamiento incorrecto del material a utilizar.

9. Baja obtención de ADN.

9.1 La lisis celular no fue completa. Este paso es muy importante, se ha de prolongar la lisis hasta que la muestra sea homogénea.

9.2 Presencia de grumos o grupos de células no disueltos después de añadir la Solución de lisis. Es muy importante, disolver estos grupos de células, se puede evitar mediante la resuspensión del pellet celular previamente a la adición de la Solución de Lisis.