



DANAGENE SALIVA KIT

PROTOCOLO RÁPIDO

Extracción a partir de muestras de 600 µl de saliva directa

Componentes kit

	Ref.0603.4	Ref.0603.41
	50 extracciones	160 extracciones
Tampón de Lisis	30 ml	3 x 34,5 ml
Tampón de Precipitación proteínas	10 ml	3 x 14 ml
Tampón de Hidratación	35 ml	3 x 37,5 ml

Equipos y reactivos necesarios y no provistos

- Isopropanol.
- Etanol 70%.
- Microtubos de 1,5 o 2 ml.
- Centrifuga de alta velocidad.
- Agitador tipo vórtex.
- Micropipeta y puntas.
- Baño de agua.

Toma de muestra

Depositar aproximadamente unos **1,5 ml de saliva** en un envase de recogida. Se recomienda no haber comido nada durante los 30 minutos previos a la toma de muestra. Para ello pasar la lengua con movimientos arriba-abajo por las paredes de las mejillas, mandíbulas y paladar para recoger las células.

Lisis Celular

1. Colocar **600-800 µl de saliva** en un microtubo de 1.5 ml. Centrifugar durante 90 segundos a 13.000-16.000 x g. Eliminar el sobrenadante con pipeta sin dañar el pellet blanco visible de células.

2. Añadir **600 µl de Tampón de Lisis**. Resuspender con la micropipeta mediante movimientos arriba y abajo, para disolver el pellet de células y lisarlo. **MUY IMPORTANTE**, resuspender completamente el pellet sin que se observe ningún grumo blanco, ya que sino la cantidad de ADN obtenida será pequeña.

3. **Incubar durante 10 minutos**. Agitar los tubos suavemente cada 2 minutos. Si es posible incubar a 37°C, ya que esto mejorará el rendimiento.

Precipitación proteica.

1. Añadir **200 µl de Tampón de Precipitación proteínas** al lisado celular.

2. Mezclar vigorosamente con un agitador tipo vórtex, a máxima velocidad durante 20-30 segundos.

3. Centrifugar a 13.000-16.000 x g durante 5 minutos. Se formará un precipitado. 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 de 1,5 ml que contenga **600 µl** de **Isopropanol**.

2. Mezclar por inversión unas 25-50 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 **600 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. Volver a centrifugar brevemente y con una micropipeta y punta fina recoger las últimas gotas el etanol residual.

6. Invertir el microtubo en un papel absorbente y dejar secar durante unos 5-10 minutos.

Hidratación del ADN.

1. Añadir **100-750 µl** de **Tampón de Hidratación**, dependiendo del tamaño del pellet de ADN, y resuspender con micropipeta. Es posible que los pellets de gran tamaño necesiten una incubación a 55°C durante 1 hora para poder resuspenderlos completamente antes de llevar a cabo la PCR. Para pellets muy pequeños se puede utilizar **25-50 µl** de **Tampón de Hidratación**.

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

Para cualquier duda o consulta adicional, por favor, contacte con nosotros info@bioted.es