



DANAGENE SPIN BLOOD DNA KIT

Ref. 0606.1 50 extracciones

Ref. 0606.2 250 extracciones

1. INTRODUCCION

Este kit está designado para una rápida extracción y purificación de **ADN genómico de alta calidad a partir de sangre total, suero, plasma y fluidos biológicos** utilizando Spin columnas con membrana de sílica que une selectivamente el ADN

Este Kit utiliza un nuevo Tampón de Lisis / Unión formulado específicamente para la extracción de ADN a partir de muestras de sangre para la obtención de un alto rendimiento.

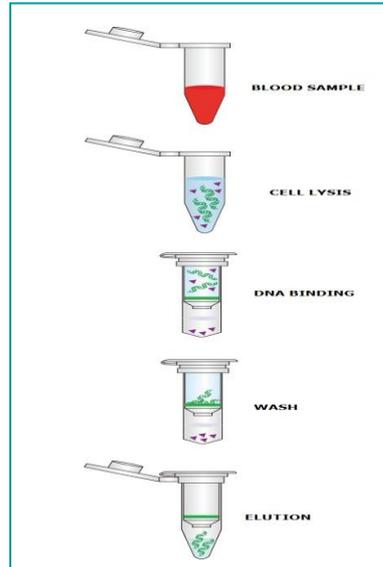
Características:

- Para una rápida obtención de ADN de elevada calidad y listo para su uso a partir de sangre.
- Tamaño de muestra: 300 µl de sangre total, plasma, suero y fluidos biológicos.
- No se utilizan extracciones orgánicas o precipitaciones con alcohol.
- Completa eliminación de inhibidores o contaminantes.
- Típico rendimiento: 6- 9 µg ADN genómico.
- Volumen de elución: 50-200 µl.
- Se obtiene un ADN de elevada calidad que puede ser utilizado directamente en PCR, Southern, clonaje y en cualquier reacción enzimática.

Aplicaciones:

- Extracciones de ADN genómico, viral y bacteriano.
- ADN a partir de sangre total (sangre humana o animal, fresca o congelada).
- ADN a partir de sangre tratada con citrato, EDTA o heparina.
- ADN a partir de suero, plasma, plaquetas, “buffy coat”, fluidos biológicos y “dried blood spots.”

Procedimiento: En el caso muestras de sangre y si se requiere el ADN genómico, la mejor opción es una lisis previa y selectiva de los eritrocitos con el Tampón Lisis RBC para procesar sólo los linfocitos que nos proporcionará mejores resultados en cuanto calidad y rendimiento. Si se está buscando otro tipo de ADN (bacteriano, vírico) la lisis se consigue mediante la incubación de la sangre total en una solución caotrópica en presencia de proteinasa K a 70°C. Se crearán las condiciones apropiadas para que el ADN se una a la membrana de fibra de sílica al añadir etanol al lisado. Los contaminantes son eliminados por 2 diferentes lavados y finalmente el ADN es eluido con un tampón de elución.



2. COMPONENTES KIT

Reactivos	Ref.0606.1	Ref.0606.2	Tª Stock
	50 extracciones	250 extracciones	
Tampón Lisis RBC	50 ml	250 ml	15-25°C
Tampón Lisis de Tejidos	10 ml	50 ml	15-25°C
Tampón de Lisis/Unión	15 ml	75 ml	15-25°C
Proteinasa K*	30 mg	2 x 75 mg	-20°C
Tampón de Desinhibición*	18 ml	90 ml	15-25°C
Tampón de Lavado*	10 ml	50 ml	15-25°C
Tampón de Elución	10 ml	50 ml	15-25°C
Spin Columns	50 unidades	250 unidades	15-25°C
Tubos de Recogida	100 unidades	500 unidades	15-25°C

*Ver en el apartado de preparaciones preliminares como preparar estas soluciones

Equipos y reactivos necesarios y no provistos

- Isopropanol.
- Etanol 100 %
- Microcentrifuga.
- Microtubos de 1,5 ml.

Almacenamiento y estabilidad

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

ATENCIÓN: El Tampón de Lisis/Unión y el Tampón de Desinhibición contiene guanidine hydrochloride que es irritante, utilizar guantes y gafas.

3. PROTOCOLO

3.1 Recolección y almacenamiento de muestras

Muestras de sangre total, deberían ser conservadas a 4°C inmediatamente después de su recolección. Son estables durante semanas a 4°C. También pueden ser enviadas en contenedores refrigerados.

Muestras de plasma y suero, deberían ser enfriadas y centrifugadas inmediatamente en la hora siguiente a su obtención. Para la preparación de suero sanguíneo centrifugar a 3.000 rpm durante 10 minutos y para muestras de plasma centrifugar a 3500 rpm durante 15 minutos.

Las muestras de plasma deberían ser separadas de las células y pasadas a un nuevo microtubo de 1,5 ml, la capa intermedia que incluye las células blancas, plaquetas, no debe ser transferida con el plasma.

Las muestras de suero son generalmente obtenidas con tubos de vidrio normal sin anticoagulantes que permite la formación de coágulos de sangre después de que el suero es recolectado, y, posteriormente, pasado a un nuevo microtubo para su transporte.

Si no es posible realizar la extracción en los tres días siguientes a su obtención, el plasma y el suero deberían ser congelados preferiblemente a -80°C o al menos a -20°C.

Buffy coat es una fracción enriquecida en leucocitos a partir de sangre total. Preparar esta fracción a partir de sangre total es simple y tiene un rendimiento aproximadamente de 5-10 veces más de ADN que un volumen equivalente de sangre total. Su preparación se realiza por centrifugación de la sangre a 2500 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de la centrifugación, se observan 3 fracciones. La fracción superior es el plasma; la intermedia es el buffy coat que contiene los leucocitos concentrados; y la fracción inferior contiene los eritrocitos.

3.2 Preparaciones preliminares

- Disolver la proteinasa K en **1,3 ml** (50 extracciones) o en **2 x 3,35 ml** (250 extracciones) en agua libre de nucleasas y conservar a -20°C. Se recomienda realizar varias alícuotas para evitar demasiados ciclos de descongelado-congelado. A esta temperatura es estable durante 1 año.
- Verificar que el Tampón de Lisis/ Unión no tienen precipitados debido a las bajas temperaturas. Si es necesario, disolver los precipitados calentando la solución a 37°C.
- Añadir el Etanol 100 % indicado en la etiqueta al Tampón de Desinhibición, unos **10 ml** (kit 50 extracciones) y unos **50 ml** (kit 250 extracciones) .Mantener el envase bien cerrado para evitar la evaporación del etanol.
- Añadir el Etanol 100 % indicado en la etiqueta al Tampón de Lavado, unos **40 ml** (kit 50 extracciones) y unos **200 ml** (kit 250 extracciones) .Mantener el envase bien cerrado para evitar la evaporación del etanol.
- Pre-calentar el Tampón de Elución a 70°C.

3.3 Protocolo para la extracción de ADN genómico a partir de los linfocitos de la sangre

Este protocolo es para la purificación del ADN genómico a partir de los linfocitos realizando para ello una lisis selectiva de los eritrocitos con el Tampón de Lisis RBC. Este, también es un método ideal, si se requiere sólo el ADN genómico o mitocondrial, ya que produce unos resultados mejores en cuanto a calidad y rendimiento.

1. Pipetear **300 µl de sangre** en un microtubo de 1,5 ml. Añadir **900 µl de Tampón Lisis RBC**. Mezclar con agitador tipo vórtex e incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos.

2. Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto. Eliminar el sobrenadante por decantación mejor que con micropipeta, ya que se puede aspirar el pequeño pellet celular no visible, y dejar 10-20 μl de líquido residual. Agitar con agitador tipo vórtex el microtubo para resuspender el pellet.
3. **Añadir 180 μl de Tampón de lisis de Tejidos y 25 μl Proteinasa K.** Mezclar con agitador tipo vórtex durante 2-5 segundos.
4. **Incubar a 56°C** durante 10 minutos.
5. **Añadir 200 μl de Tampón de Lisis / Unión.** Mezclar con agitador tipo vórtex. **Incubar a 70°C durante 10 minutos.**
6. **Añadir 200 μl de Etanol (96-100%) al lisado.** Mezclar agitador tipo vórtex.
7. **Pasar la muestra a una MicroSpin columna** con su tubo de recolección.
8. **Centrifugar a 8.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el tubo de recolección. Si la muestra no ha pasado completamente, repetir el paso de centrifugación.
9. Colocar la MicroSpin columna en un nuevo tubo de recolección y añadir **500 μl de Tampón de Desinhibición** en el reservorio de la Spin columna. **Centrifugar a 12.000-14.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el líquido.
10. **Añadir 500 μl de Tampón de Lavado** en el reservorio de la Spin columna. **Centrifugar a 12.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el líquido.
11. 2º Lavado. **Añadir 500 μl de Tampón de Lavado** en el reservorio de la Spin columna. **Centrifugar a 14.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el líquido.
12. **Centrifugar a máxima velocidad durante 2 minutos para eliminar el etanol residual.**
13. Eliminar el tubo de recogida y insertar la spin columna en un microtubo de 1,5 ml. **Añadir 50-200 μl de Tampón de elución** (precalentado a 70°C) en el reservorio de la Spin columna. **Incubar 1 minuto.**
14. **Centrifugar a máxima velocidad durante 60 segundos.** El microtubo contiene ahora el ADN genómico.

3.4 Protocolo para la extracción de ADN a partir de sangre total, buffy coat y fluidos biológicos

Este protocolo es para la purificación del ADN total (genómico, mitocondrial, bacteriano y viral) a partir de sangre total, buffy coat y fluidos biológicos.

1. **Pipetear 25 μl proteinasa K** en un microtubo de 1,5 ml.
2. **Añadir 300 μl de muestra** al microtubo. Utilizar hasta 300 μl de sangre total, plasma, suero, buffy coat o fluido biológico. Para muestras menores de 300 μl , añadir PBS para ajustar el volumen a 300 μl . Si purificamos ADN vírico, recomendamos empezar con 200 μl de suero o plasma.
3. **Añadir 300 μl del Tampón de Lisis/ Unión.** Agitar la mezcla vigorosamente con un agitador tipo vórtex (durante 10–20 s). **Incubar a 70°C durante 15 minutos.** *El lisado se volverá marrón durante la incubación. Si se procesa sangre vieja o coagulada, incrementar el periodo de incubación con proteinasa K hasta 30 minutos y agitar la mezcla vigorosamente con un agitador tipo vórtex varias veces durante el proceso de incubación.*

4. **Añadir 300 µl etanol (96–100 %)** a cada muestra y mezclar con un agitador tipo vórtex.
5. Pipetear y añadir la mitad del lisado en el reservorio de la Spin columna con su tubo de recogida. **Centrifugar a 10.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el tubo de recogida.
6. Repetir el punto 5 con la otra mitad del lisado.
7. Colocar la Spin columna en un nuevo tubo de recogida y añadir al reservorio **500 µl de Tampón de Desinhibición. Centrifugar a 12.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el líquido.
8. **Añadir 500 µl de Tampón de Lavado** en el reservorio de la Spin columna. **Centrifugar a 12.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el líquido.
9. 2º Lavado. **Añadir 500 µl de Tampón de Lavado** en el reservorio de la Spin columna. **Centrifugar a 14.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el líquido.
10. **Centrifugar a máxima velocidad durante 2 minutos para eliminar el etanol residual.**
11. Eliminar el tubo de recogida y insertar la spin columna en un microtubo de 1,5 ml. **Añadir 50-200 µl de Tampón de elución** (precalentado a 70°C) en el reservorio de la Spin columna. **Incubar 1 minuto.**
12. **Centrifugar a máxima velocidad durante 60 segundos.** El microtubo contiene ahora el ADN genómico.

3.5 Protocolo de extracción de ADN genómico a partir de “dried blood spots”

Paso obtención muestra

Colocar 3 círculos obtenidos de perforar un “dried blood spot” en un microtubo de 1,5 ml.

Paso de pre-tratamiento

Añadir 200 µl de PBS y mezclar vigorosamente con un agitador tipo vórtex. Incubar a 85°C durante 10 minutos. Brevemente centrifugar para eliminar las gotas del tapón.

1. **Añadir 25 µl proteinase K** en la muestra.
2. **Añadir 200 µl del Tampón de Lisis/ Unión.** Agitar la mezcla vigorosamente con un agitador tipo vórtex (durante 10–20 s).
3. **Incubar a 70°C durante 1 hora.**
4. **Añadir 200 µl de etanol (96–100 %)** a cada muestra y agitar la mezcla con un agitador tipo vórtex. Continuar en el punto 5 del apartado 3.4 del protocolo.

4. GUIA DE PROBLEMAS Y SOLUCIONES

Para cualquier duda o consulta adicional sobre el protocolo pónganse en contacto con el servicio técnico de DANAGE-BIOTED S.L. info@danagen.es