



## DANAGENE SPIN SALIVA DNA KIT

Ref.0603.SPIN50 50 PREPS

Ref.0603.SPIN250 250 PREPS

### 1. INTRODUCCIÓN

El **DANAGENE SPIN SALIVA DNA kit** ha sido desarrollado para realizar una rápida y eficiente purificación de **ADN genómico**, utilizando las MicroSpin columnas a partir de:

**a) Muestras de saliva conservadas con el DANASALIVA Sample Collection Kit.**



**b) Muestras de saliva fresca.**

### 2. COMPONENTES KIT

	50 PREPS	250 PREPS	Almacenamiento
Tampón de Lisis PS	35 ml	160 ml	Temperatura ambiente
Tampón de Desinhibición*	18 ml	82.50 ml	Temperatura ambiente
Tampón de Lavado *	10 ml	50 ml	Temperatura ambiente
Tampón de Elución	6 ml	30 ml	Temperatura ambiente
Proteinasa K*	30 mg	5 x 30 mg	-20°C
MicroSpin columnas	50 unidades	250 unidades	Temperatura ambiente
Tubos de Recogida	100 unidades	500 unidades	Temperatura ambiente

(\* ) Estas soluciones deben ser preparadas como se indica en la secciones de Preparaciones Preliminares del protocolo.

## **2.1 Equipos y reactivos necesarios y no provistos**

- Microcentrifuga.
- Microtubos de 1.5 ml y 2.0 ml.
- Etanol 100%.
- Baño de agua, baño seco o bloque con calefacción (70°C).

## **2.2 Almacenamiento y estabilidad**

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

## **3. PROTOCOLO**

### **3.1 Preparaciones Preliminares**

- **Disolver la proteinasa K en 1.3 ml** en agua libre de nucleasas y conservar a  $-20^{\circ}\text{C}$ . **Se recomienda realizar varias alícuotas** para evitar demasiados ciclos de descongelado-congelado. A esta temperatura es estable durante 1 año.
- **Añadir el Etanol 100 % al Tampón de Desinhibición** indicado en la etiqueta, unos **10 ml (50 PREPS) o 50 ml (250 PREPS)**. Mantener el envase bien cerrado para evitar la evaporación del etanol.
- **Añadir el Etanol 100 % al Tampón de Lavado** indicado en la etiqueta, unos **40 ml (50 PREPS) o 200 ml (250 PREPS)**. Mantener el envase bien cerrado para evitar la evaporación del etanol.

### **3.2 Extracción a partir de muestras de saliva conservadas en el DANASALIVA Sample Collection Kit ( Ref. 0603.43)**

1. Agitar con el Vortex el tubo del DANASALIVA Sample Collection Kit que contiene la saliva conservada para homogenizar bien la muestra. Pipetear **400  $\mu\text{l}$  y colocarlos en un microtubo de 1.5 ml.**
2. **Añadir 600  $\mu\text{l}$  Tampón de Lisis PS + 25 $\mu\text{l}$  Proteinasa K.** Agitar con el Vortex. Incubar a  $55^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos y agitar periódicamente con el vortex.
3. Centrifugar durante **2 minutos a 14.000 rpm.**
4. **Traspasar el sobrenadante** a un nuevo microtubo, evitando tocar el pellet que se puede formar.
5. **Añadir 300  $\mu\text{l}$  de Etanol 100%.** Mezclar bien.
6. Pasar la mitad del lisado aprox. **650 $\mu\text{l}$**  a una **MicroSpin columna** colocada en su tubo de recolección. **Centrifugar a 8.000 rpm durante 30 segundos.** Descartar el líquido.
7. Pasar los otros **650  $\mu\text{l}$**  de lisado a una **MicroSpin columna** colocada en su tubo de recolección. **Centrifugar a 8.000 rpm durante 30 segundos.** Descartar el líquido.
8. Colocar la MicroSpin columna en un nuevo tubo de recogida y añadir a la columna **500  $\mu\text{l}$  de Tampón de Desinhibición.** **Centrifugar a 12.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el líquido.

9. **Añadir 700 µl de Tampón de Lavado** en la MicroSpin columna. **Centrifugar a 14.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el líquido.
10. **Centrifugar a máxima velocidad durante 3 minutos para eliminar el etanol residual.**
11. Eliminar el tubo de recogida e insertar la MicroSpin columna en un microtubo de 1.5 ml. **Añadir 50 µl de Tampón de elución** (precalentado a 70°C) en el reservorio de la MicroSpin columna. Incubar 2 minutos.
12. **Centrifugar a 14.000 rpm durante 60 segundos.** El microtubo contiene ahora el ADN .

### **3.3 Extracción a partir de muestras de 600 µl de saliva fresca**

**NOTA:** Las muestras de saliva se han de recoger antes de las comidas, lavarse la boca con agua y esperar unos 30 minutos para recoger la muestra. Las muestras de saliva fresca deben ser procesadas, o mantener a 4° C si serán procesadas en menos de 2 horas.

1. Centrifugar **600 µl de saliva** durante 90 segundos a **a 14.000 rpm**. Eliminar el sobrenadante con pipeta sin dañar el pellet visible blanco de células.

Si el pellet celular es muy pequeño se pueden añadir otros 600 µl de saliva y volver a realizar el punto 1.

El rendimiento de obtención de ADN genómico es proporcional al tamaño del pellet celular. A mayor pellet obtendremos más cantidad de ADN.

2. **Añadir 600 µl Tampón de Lisis LS + 25µl Proteinasa K.** Resuspender bien el pellet celular mediante micropipeta. Incubar a 55°C durante 20 minutos y agitar periódicamente con el vortex.

3. Centrifugar durante **2 minutos a 14.000 rpm**.

4. **Traspasar el sobrenadante** a un nuevo microtubo evitando tocar el pellet que se puede formar.

5. **Añadir 100 ul de Etanol 100%.** Mezclar bien.

6. Pasar el lisado a una **MicroSpin columna** colocada en su tubo de recolección. **Centrifugar a 8.000 rpm durante 30 segundos.**

7. Colocar la MicroSpin 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 700 µl de Tampón de Lavado** en la MicroSpin columna. **Centrifugar a 14.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el líquido.

9. **Centrifugar a máxima velocidad durante 3 minutos para eliminar el etanol residual.**

10. Eliminar el tubo de recogida e insertar la MicroSpin columna en un microtubo de 1.5 ml. **Añadir 50-100 µl de Tampón de elución** (precalentado a 70°C) en la MicroSpin columna. Incubar 2 minutos.

11. **Centrifugar a 14.000 rpm durante 60 segundos.** El microtubo contiene ahora el ADN .

## **4. GUÍA DE PROBLEMAS Y SOLUCIONES**

Para cualquier duda o consulta adicional sobre el protocolo pónganse en contacto con el servicio técnico de DANAGEN-BIOTED S.L [info@danagen.es](mailto:info@danagen.es)