

APPLICATION NOTE

DANASALIVA Sample Collection Kit / DANAGENE SPIN SALIVA DNA Kit

Extracción de ADN genómico a partir de muestras de saliva conservada en el DANASALIVA SampleCollection Kit utilizando el DANAGENE SPIN SALIVA DNA Kit.

Introducción

Todos los análisis y pruebas genéticas comienzan por la recolección de la muestra por lo que es muy importante asegurar su estabilidad.

EnDANAGEN-BIOTED hemos desarrollado un sistema fiable todo en uno, recolección, estabilización y transporte de muestras de saliva ya que **el ADN de la saliva es equivalente al ADN sanguíneo para aplicaciones posteriores.**

- Fácil recolección, estabilización y transporte que permite al alumno tomar la muestra en su casa si es necesario.
- Mejora la atención y la participación del alumno para la recolección indolora y no invasiva de la muestra de saliva
- La muestra se mantiene estable durante meses a temperatura ambiente.
- Comprobado en aplicaciones posteriores como PCR y qPCR.

Nuestro DANASALIVA SampleCollection Kit permite recolectar **2 ml de saliva, transportar y estabilizar la muestra 1 año a temperatura ambiente e indefinidamente a -20 o -80°C.** La cantidad de ADN que se puede obtener es variable entre un mismo sujeto dependiendo del momento de la muestra y entre diferentes personas (5-80 ug).

Las muestras de saliva son recogidas escupiendo en el interior del embudo, el cual se ha ensamblado con el Tubo de Recolección. Después, de recoger 2 ml de saliva el contenido de la Solución Conservación Saliva es añadido y mezclado con la saliva recogida.



Fig.1 DANASALIVA SampleCollection Kit

Materiales y Métodos

Recolección muestra de saliva

Una muestra de 2 ml de saliva fue recolectada por 4 alumnos utilizando el DANASALIVA SampleCollection Kit (Fig.1) y conservada a temperatura ambiente durante varios días.

Extracción ADN

ADN genómico humano fue extraído a partir de la saliva conservada utilizando el DANAGENE SPIN SALIVA DNA.

Brevemente, se procesan 400 μ l de saliva conservada lisando las células con el Tampón de lisis y proteinasa K mediante incubación a 55°C durante 20 minutos. Después de una centrifugación, se ajustan las condiciones de unión a la membrana de la columna añadiendo etanol y el lisado se añade a la MicroSPin columna. El ADN unido a la columna se somete a 2 pasos de lavados para eliminar los inhibidores. Después de un paso de secado, el ADN se puede eluir con 50 μ l Tampón de elución /Tris/HCl 5 mM pH 8.5.

Calidad y Cuantificación del ADN extraído

Para la cuantificación del ADN, la concentración de ADN fue determinada espectrofotométricamente en el Qubit 4.0 fluorometer (Thermo Fisher Scientific, USA) utilizando el QUBIT dsDNA BR Assay Kit.

Para la calidad del ADN, la pureza del ADN fue determinada mediante las relaciones 260/280 y 260/230 medidas en el NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, USA).

Electroforesis en gel de agarosa

Para visualizar el tamaño e integridad del ADN genómico humano, 20 μ l de ADN fue cargado en un gel de agarosa al 1% en TAE y corrido durante 30 minutos a 125 V.

Estudio Polimorfismos ALU por PCR

EL ADN purificado fue utilizado para el estudio de polimorfismo ALU por PCR siguiendo el protocolo del kit educativo de BIOTED para ello.

Resultados

Detección del ADN genómico humano

La cuantificación del ADN fue determinada tanto mediante electroforesis en gel de agarosa (fig.2) y espectrofotométricamente utilizando el Qubit (Fig.3). Podemos observar que los rangos de concentración oscila entre 12 y 96 ng/ μ l y se aísla ADN genómico intacto sin ningún tipo de degradación.

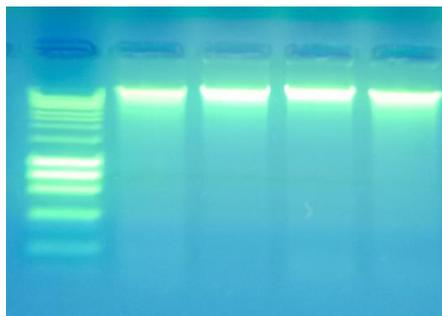


Fig2. Electroforesis en gel de agarosa del ADN aislado a partir de la saliva conservada

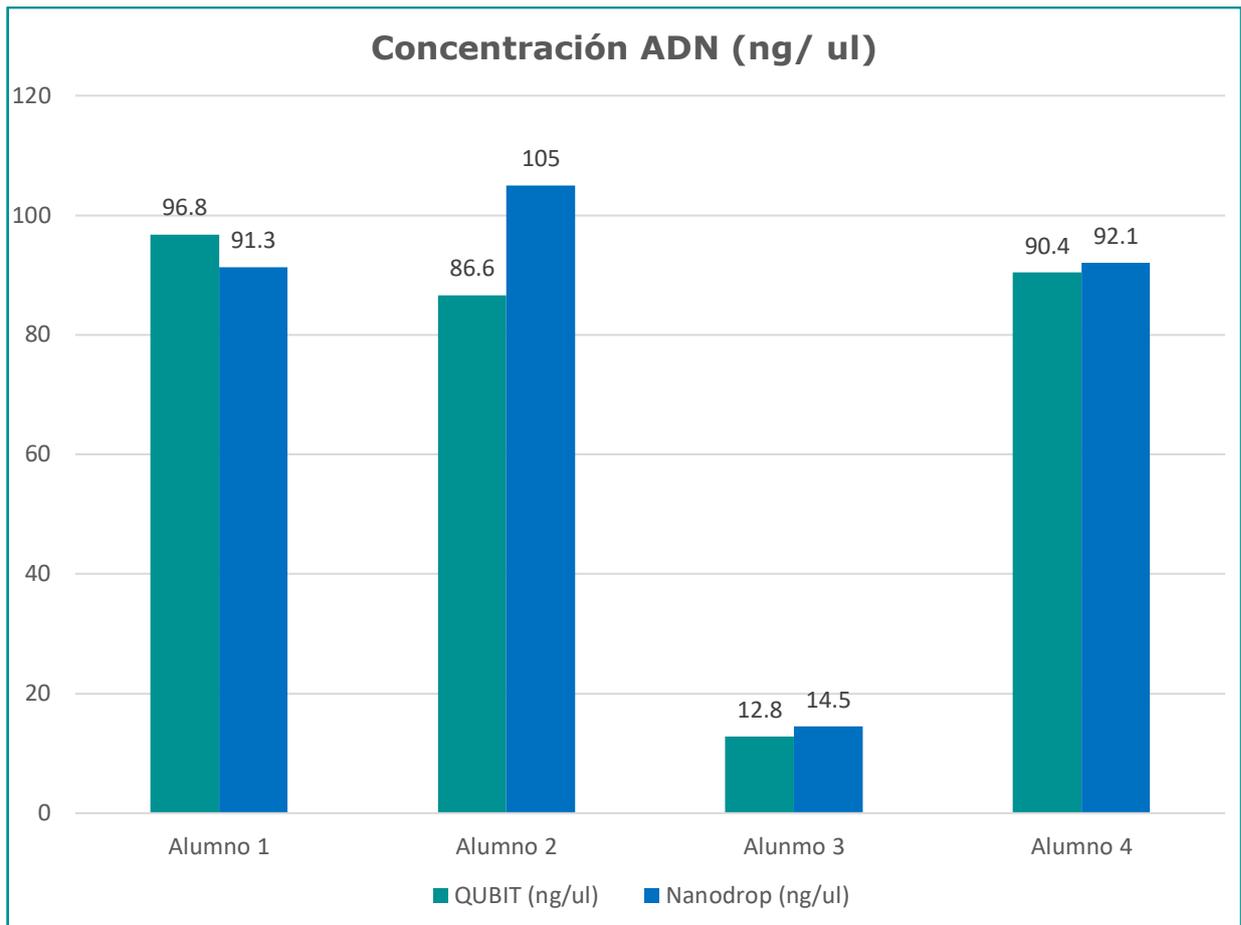


Fig3. Concentración de ADN obtenidomediante determinación porQubit y Nanodrop

La calidad del ADN fue determinada espectrofotométricamente (Fig.4). Todos los ADNs aislados de los 4 alumnos muestran una relación $A_{260}/_{280} > 1.75$ y $A_{260}/_{230} > 2.0$ demostrando la elevada pureza del ADN aislado.

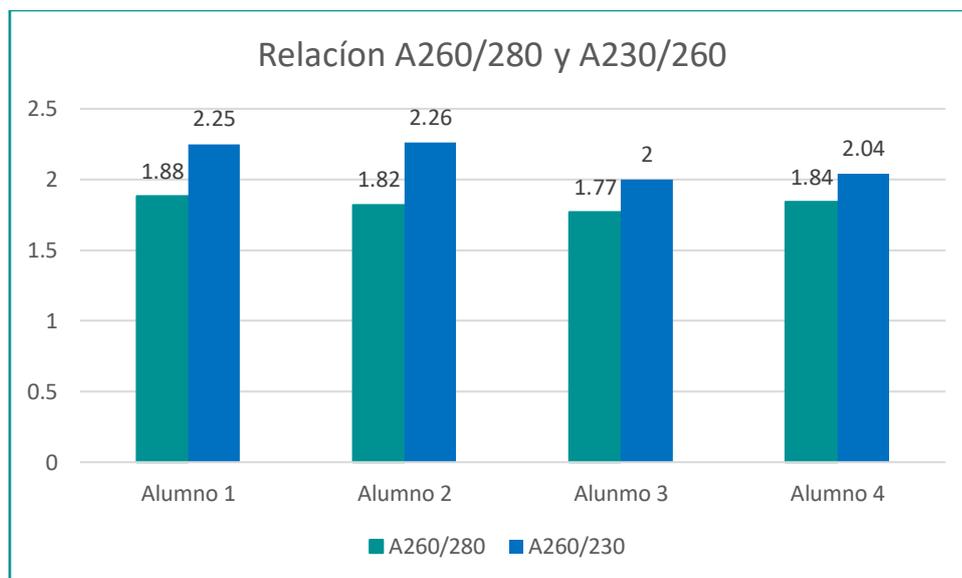


Fig4. Relación A260/280 y A230/260 mediante análisis conNanodrop

Estudio Polimorfismos ALU por PCR

El polimorfismo Alu que estudiamos en esta práctica, es la inserción que se encuentra en el intrón 8 del gen activador del plasminógeno tisular TPA Alu. Esta sección tiene unos 260-270 nucleótidos de longitud y la inserción tiene aproximadamente unos 300 pares de bases de longitud, de forma que la inserción producirá un aumento de la longitud en 570 pares de bases.

Se puede testar si una persona posee una inserción Alu al locus TPA por amplificación del locus utilizando la PCR. Si una persona es homocigota para la inserción, la electroforesis en gel de agarosa del producto de la PCR producirá una única banda de **570 pares de bases**. Si una persona es heterocigota posee la inserción en uno de los cromosomas homólogos pero no en el otro, 2 bandas aparecerán en el gel, una de 570 pares de bases y otra de 260 pares de bases. Si una persona pierde la inserción en ambos cromosomas homólogos, la PCR resultará en una sola banda de 260 pares de bases.

Podemos observar en la Fig.5 que 3 de los alumnos son heterocigotos para la inserción Alu presentando 2 bandas (260 y 570 pares de bases), mientras que el 4 alumno es homocigoto para la inserción Alu.

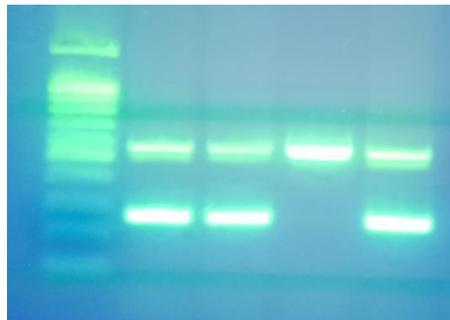


Fig5. Análisis de PCR de diferentes alumnos para el estudio de la inserción ALU en el intrón 8 del gen activador del plasminógeno tisular.

Conclusión

En esta práctica hemos presentado un nuevo sistema para la recolección & estabilización de muestras de saliva, el uso de un nuevo kit en columna para la extracción del ADN genómico de la saliva conservada y su uso en una práctica de PCR.

Hemos podido demostrar que la saliva conservada varios días a temperatura ambiente con el DANASALIVA SampleCollection kit se puede utilizar para aislar ADN de elevada pureza con el DANAGENE SPIN SALIVA DNA kit para la realización posterior de una PCR.

Referencia	Descripción Producto	Preparaciones
0603.43EDU	DANASALIVA SampleCollection Kit	1 Unidad
0603.SPIN50	DANAGENE SPIN SALIVA Kit	50 Preps
PCR3	Estudios de polimorfismos ALU por PCR	PCR3