



DANAGENE SPIN FOOD-STOOL “Bacterias” KIT

Ref. 0608.1 50 extracciones

Ref. 0608.2 250 extracciones

1. INTRODUCCION

1.1 Descripción del producto

Este kit está optimizado para una eficiente y rápida extracción de ADN bacteriano (*Listeria*, *Salmonella*, *E.coli*, etc) listo para PCR a partir de medios de pre-enriquecimiento (agua peptonada) o enriquecimiento tal y como se establece en las diferentes normas ISO, de diferentes muestras de alimentos y heces, utilizando para ello MicroSpin columnas con membranas de fibra de vidrio que unen selectivamente el ADN.

El procedimiento incluye una centrifugación de 1 ml de medio de pre-enriquecimiento (agua peptonada) o enriquecimiento para concentrar las células, las células son lisadas durante un periodo de incubación con Lisozima (suministrada con el kit). Después una digestión con Proteínasa K (suministrada con el kit) y limpieza de la mezcla de lisis por centrifugación y unión del ADN a las membranas de fibra de vidrio empaquetadas en MicroSpin columnas. El ADN que se une es purificado mediante varios lavados para eliminar los potenciales inhibidores de la PCR y finalmente es eluido.

1.2 Componentes del Kit

Reactivos suficientes para	50 extracciones	250 extracciones	Tª Stock
Tampón de Reacción Lisozima	15 ml	75 ml	15-25°C
Tampón de Lisis/Unión	15 ml	75 ml	15-25°C
Lisozima *	12 mg	60 mg	-20°C
Proteínasa K*	22 mg	105 mg	-20°C
Tampón de Desinhibición*	16.5 ml	82.5 ml	15-25°C
Tampón de Lavado*	10 ml	50 ml	15-25°C
Tampón de Elución	10 ml	50 ml	15-25°C
MicroSpin Columnas	50 unid.	250 unid.	15-25°C
Tubos de Recogida	100 unid.	500 unid.	15-25°C

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

1.3 Equipos y reactivos necesarios y no provistos

- Isopropanol.
- Etanol 100 %
- Microcentrifuga.
- Microtubos de 1.5 ml.

1.4 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.

2. PROTOCOLO

2.1 Preparaciones preliminares

- Disolver la proteinasa K en **1.10 ml** de agua libre de nucleasas (kit 50 extracciones) y en **5.25 ml** (kit 250 extracciones) 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.
- Disolver la Lisozima en **1.10 ml** de agua libre de nucleasas (kit 50 extracciones) y en **5.25 ml** (kit 250 extracciones) 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 tiene precipitados debido a las bajas temperaturas. Si es necesario, disolver calentando a 37°C .
- Añadir el Etanol 100 % al Tampón de Desinhibición indicado en la etiqueta, 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 % al Tampón de Lavado indicado en la etiqueta, 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 .

2.2 Protocolo de extracción de ADN bacteriano a partir de 1-1.5 ml de medio de pre-enriquecimiento o enriquecimiento

1. Transferir 1-1.5 ml de medio de pre-enriquecimiento o enriquecimiento a un microtubo de 1.5 ml y **centrifugar 5 minutos a 12.000-14.000 rpm. Eliminar el sobrenadante.**
2. Añadir **280 μl del Tampón de Reacción Lisozima + 20 μl Lisozima.** Mezclar bien con micropipeta para resuspender el pellet bacteriano. Incubar a 37°C durante 30 minutos.
3. Añadir **300 μl del Tampón de Lisis/ Unión + 20 μl Proteinasa K.** Mezclar bien. Incubar a 70°C durante 10 minutos.
4. Añadir **150 μl de Isopropanol.** Mezclar bien y centrifugar 60 segundos a 14.000 rpm.
5. Añadir el sobrenadante en el reservorio de la Spin microcolumna con su tubo de recogida. **Centrifugar a 8.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el tubo de recogida.
6. Colocar la MicroSpin columna en un nuevo tubo de recogida y añadir al reservorio **500 μl de Tampón de Desinhibición. Centrifugar a 8.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el líquido.
7. **Añadir 500 μl de Tampón de Lavado** en el reservorio de la Spin microcolumna. **Centrifugar a 12.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el líquido.
8. 2° Lavado. **Añadir 500 μl de Tampón de Lavado** en el reservorio de la Spin microcolumna. **Centrifugar a 14.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el líquido.
9. **Centrifugar a máxima velocidad durante 2 minutos para eliminar el etanol residual.**
10. Eliminar el tubo de recogida y insertar la spin microcolumna en un microtubo de 1.5 ml. **Añadir 100 μl de Tampón de elución** (precalentado a 70°C) en el reservorio de la spin microcolumna. Incubar 1 minuto.
11. **Centrifugar a máxima velocidad durante 60 segundos.** El microtubo contiene ahora el ADN bacteriano.

3. GUIA DE PROBLEMAS Y SOLUCIONES

Recomendamos ponerse en contacto con el servicio técnico de DanaGen-BioTed para cualquier consulta adicional respecto a los protocolos de trabajo o problemas que puedan surgir durante el trabajo.