



DANAGENE SPIN FOOD-STOOL KIT

Ref. 0609.1 50 extracciones

Ref. 0609.2 250 extracciones

1. INTRODUCCION

1.1 Descripción del producto

Este kit ha sido optimizado para una eficiente y rápida purificación de ADN a partir de heces frescas o congeladas y de varias muestras de alimentos (materias primas y alimentos procesados).

Después de homogenizar las muestras, el ADN puede ser extraído con el Tampón de extracción, la mezcla de lisis es centrifugada para eliminar contaminantes y desechos residuales. El sobrenadante es mezclado con el Tampón de unión + proteinasa K, incubado a 70°C durante 10 minutos y luego isopropanol para crear las condiciones apropiadas para una óptima unión del ADN a la membrana de sílica de la columna. Después 2 lavados con tampones diferentes para una eficiente eliminación de los potenciales inhibidores de la PCR. Finalmente, el ADN es eluido y está listo para ser utilizado en las subsiguientes reacciones.

1.2 Componentes del Kit

Reactivos suficientes para	50 extracciones	250 extracciones	Tª Stock
Tampón de Extracción CTAB	65 ml	325 ml	15-25°C
Tampón de Unión	15 ml	65 ml	15-25°C
Proteinasa K*	30 mg	2 x 75 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 Columns	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 y 2.0 ml.
- Homogenizador eléctrico de mano y/o nitrógeno líquido para procesar las muestras previamente.
- Vortex.
- Baño para incubar a 80°C

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 **1.3 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 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 puede aumentar el rendimiento de ADN obtenido. Para alguna aplicación posterior puede ser necesario que el ADN esté concentrado, la elución en volúmenes más pequeños de 200 μl incrementará la concentración final de ADN en el eluido pero reducirá el rendimiento global de ADN obtenido. Para muestras que contenga $< 3 \mu\text{g}$ ADN, se recomienda una elución en 100 μl . Para muestras que contenga $< 1 \mu\text{g}$ ADN, se recomienda una elución en 35-50 μl .**

2.2 Protocolo de extracción de ADN a partir de 200 mg de heces frescas o secas

NOTA: Se recomienda comenzar con cantidades grandes de heces cuando el ADN no se encuentra distribuido homogéneamente o se encuentra en pequeñas cantidades en la muestra. Se pueden procesar muestras de menor tamaño al indicado sobre todo cuando se requiere eliminar al máximo los posibles inhibidores de la PCR.

En general, para resultados óptimos de PCR utilizar la mínima cantidad posible de ADN eluido , el volumen de eluido nunca deberá exceder del 10 % del volumen final de la mezcla de PCR. Se recomienda añadir BSA a una concentración final de 0.1 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ de la mezcla de PCR y utilizar polimerasa HOT Star.

1. Pesar **180-200 mg de heces** en un microtubo de 2.0 ml y añadir **1.20 ml de Tampón de Extracción CTAB**. Vortex vigorosamente durante 1 minuto . Si no se observa una solución homogénea será necesario el uso de un homogenizador eléctrico de mano.

Si la muestra es líquida pipetear 200 μl en un microtubo.

2. **Incubar a 70°C durante 30-60 minutos.** Repetir el vortex varias veces durante la incubación.

Para la detección de ADN humano es suficiente incubar a 70°C , para la detección de bacterias o parásitos incubar a 80°C y Para la detección de células difíciles de lisar, como algunas bacterias o parásitos, la temperatura de incubación se puede incrementar a 95°C si fuera necesario.

3. **Centrifugar a 14.000 rpm durante 10 minutos.** Aparecerá un pellet y en la superficie una capa de grasa, introducir la punta de pipeta atravesando esta capa superficial, intentando recoger sólo **500 μl de sobrenadante** que es el líquido transparente con color (evitar coger pellet y capa superficial) y colocar en un microtubo de 2.0 ml.

4. Añadir **25 µl Proteínasa K** a los 500 µl de sobrenadante. Mezclar bien. **Incubar a 70°C durante 10 minutos.**
5. Añadir **250 µl del Tampón de Unión** a los 500 µl de sobrenadante. Mezclar bien por vortex.
6. Añadir en el reservorio de la Spin microcolumna con su tubo de recogida. **Centrifugar a 10.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el tubo de recogida.
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 el reservorio de la Spin microcolumna. **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 y insertar la spin microcolumna 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 microcolumna. Incubar 2 minutos.
11. **Centrifugar a máxima velocidad durante 60 segundos.** El microtubo contiene ahora el ADN .

2.3 Protocolo de extracción de ADN a partir de muestras de alimentos

Dada la gran variedad de muestras que abarcan los alimentos, origen vegetal, origen animal, alimentos procesados, materias primas, etc, se hace difícil presentar un protocolo universal para todas las muestras. Es por esto que el Departamento Técnico de DANAGEN puede estudiar y ponerle a punto su protocolo específico para su determinado tipo de muestra.

1. Pesar **100-200 mg** de la muestra en un microtubo de 2.0 ml y añadir **1.2 ml de Tampón CTAB + 25 µl Proteínasa K** Vortex vigorosamente.

El principal y más importante paso para obtener buenos rendimientos es una buena rotura y homogenización de la muestra que será específica para cada tipo de muestra. En todos los casos y para una mayor efectividad se debería utilizar nitrógeno líquido para pulverizar la muestra.

Como norma general en muestras sólida (salchichas, embutidos, etc), preparar varios fragmentos y homogenizar con un homogenizador eléctrico de mano; En muestras sólidas en polvo (harinas, etc.) homogenizar con un homogenizador eléctrico de mano; En muestras sólidas de gran tamaño (copos de maíz, chocolate, galletas, etc) utilizar un molinillo de café para pulverizar una muestra grande y luego pesar la cantidad requerida de polvo; En muestras líquidas utilizar directamente 200 µl. Se pueden utilizar también los diferentes rotores + partículas que existen en el mercado.

1. **Incubar a 65°C durante 30 minutos.** Repetir el vortex varias veces durante la incubación.
2. **Centrifugar a 14.000 rpm durante 5-10 minutos.** Aparecerá un pellet y en la superficie una capa de grasa, introducir la punta de pipeta atravesando esta capa superficial, intentando recoger sólo **500 µl de sobrenadante** que es el líquido transparente con color (evitar coger pellet y capa superficial) y colocar en un microtubo de 1.5 ml nuevo.
3. Añadir **250 µl del Tampón de Unión** a los 500 µl de sobrenadante. Mezclar bien por vortex.
4. Añadir en el reservorio de la Spin microcolumna con su tubo de recogida. **Centrifugar a 10.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el tubo de recogida.
5. 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.
6. **Añadir 700 µl de Tampón de Lavado** en el reservorio de la Spin microcolumna. **Centrifugar a 14.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el líquido.

7. **Centrifugar a máxima velocidad durante 3 minutos para eliminar el etanol residual.**
8. Eliminar el tubo de recogida y insertar la spin microcolumna 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 microcolumna. Incubar 2 minutos.
9. **Centrifugar a máxima velocidad durante 60 segundos.** El microtubo contiene ahora el ADN .

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. info@danagen.es