



DANAGENE SWABS DNA KIT

Ref.0616.100 100 Extracciones

Ref.0616.500 500 Extracciones

Ref.0616.1000 1000 Extracciones

1.INTRODUCCION

DANAGENE SWABS DNA Kit provee un método para la extracción de ADN genómico de alta calidad a partir **muestras de frotis bucales con cepillos de espuma y muestras de saliva recolectadas con nuestro sistema DANASWABS Sample Collection Kit**

Es un método rápido, seguro y económico. Utiliza un paso de desproteización con un novedoso tampón salino evitando el uso de disolventes orgánicos tóxicos como fenol o cloroformo.

En el caso de la saliva , la obtención de ADN en un mismo individuo presenta una variabilidad intrasujeto, es decir, no existe una cantidad aproximada de ADN / ml ya que puede variar según el momento de la recogida de la muestra, dándose el caso de que no se obtenga una gran cantidad de ADN y no se puedan llevar a cabo aplicaciones posteriores que requieren gran cantidad de ADN.

2.COMPONENTES KIT

	Ref.0616.100	Ref.0616.500	Ref.0616.1000	
Tampón de Resuspensión	105 ml	2x 250 ml	2 x 500 ml	Temperatura ambiente
Tampón de Lisis	35 ml	305 ml	2 x 305 ml	Temperatura ambiente
Tampón de Precipitación de proteínas	22 ml	105 ml	2 x 105 ml	Temperatura ambiente
Tampón de Hidratación	5ml	25 ml	50 ml	Temperatura ambiente
Proteinasas K	500 ul	2.50 ml	10 ml	- 20°C
RNasa	500 ul	2.50 ml	10 ml	-20°C

Almacenamiento y estabilidad

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

Equipos y reactivos necesarios y no provistos

- * Isopropanol.
- * Etanol 70%.
- * Microtubos de 1.5 ml y 2.0 ml.
- * Microcentrifuga o centrifuga clínica.
- * Vortex.
- * Baño de agua.

3.PROTOCOLO

3.1 Preparaciones preliminares

Toma de la muestra

1. Se recomienda que el individuo al que se le va a extraer la muestra se abstenga de beber café y tomar comida alguna al menos 30 minutos antes de la recogida. Si no fuera posible se recomienda un lavado suave sólo con agua de la boca.

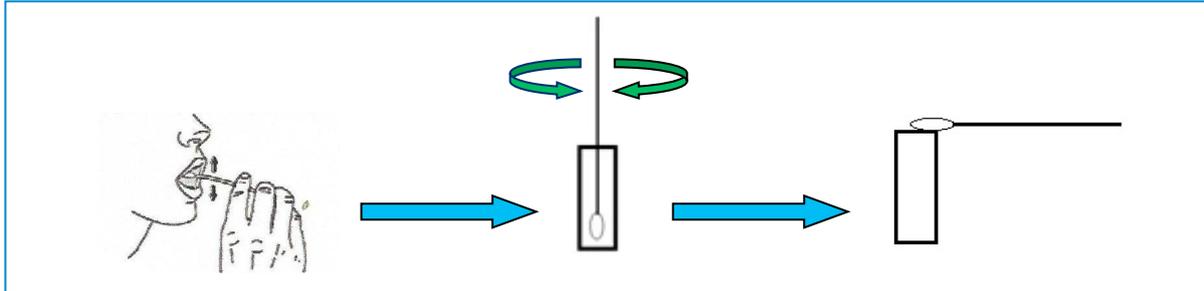
2. Recoger la muestra de células bucales con el hisopo de espuma. Frotar el escobillón en el interior de la mejilla (pared bucal) y encías con una firme presión unas 30 veces por cada lado de la cara y cada lado del escobillón.

Importante: realizar una presión firme, sólida y razonable con el hisopo. Se puede colocar la mano en la mejilla para ofrecer una superficie más sólida.

3. Proceder con la extracción o con el método de conservación indicado según el hisopo que se utilice.

4. SI se utiliza nuestro DANASWABS Sample Collection Kit proceder de la siguiente manera:

5. Introducir el hisopo en el microtubo con **la Solución de Conservación**. Rotar el hisopo de una forma rápida para liberar las células bucales en la solución **con el mismo movimiento de agitación de una cucharilla de café**. Presionar el hisopo contra la pared del microtubo y girar para asegurar que la mayor parte del líquido permanece en el microtubo. Se recomienda también pasar la cabeza de espuma del hisopo varias veces por la parte superior del microtubo para liberar las últimas gotas.



4. La solución debe observarse que adquiere una ligera turbidez lo cual indicará la presencia de células bucales. **Si la solución continua transparente se debería realizar una nueva recogida de muestra con un nuevo hisopo y en otro momento.**

5. La muestra conservada es estable a temperatura ambiente (15-25°C) durante 1 año y puede ser enviada al laboratorio para la purificación del ADN genómico. Si se almacena a -20°C o -80°C la muestra es estable indefinidamente.

Si el Tamón de Lisis contiene un precipitado debido a las bajas temperaturas, incubar a 37°C y mezclar para disolver el precipitado.

3.2 Extracción a partir de muestras conservadas con nuestro DANASWABS Sample Collection Kit

1. Aquellas muestras que se hayan dejado en posición vertical durante varios días se podrá observar un pellet blanco que contiene las células bucales. Utilizando una micropipeta resuspender el pellet completamente y traspasar toda la solución a un nuevo microtubo de 2.0 ml.
2. Añadir **1000 µl del Tampón de Resuspensión y** Centrifugar a 13.000-16.000 x g durante 2 minutos.
3. Eliminar el sobrenadante por decantación **vigilando no perder el pellet celular**. Volver a centrifugar brevemente y eliminar con micropipeta todo el líquido.
4. Añadir **300 µl de Tampón de lisis + 5 µl de Proteinasa K + 5 µl de RNasa** y resuspender el pellet con micropipeta. Incubar a 37°C durante 30 minutos.
Realizar varios vortex durante el periodo de incubación.
5. Añadir **100 µl de Tampón de precipitación de proteínas**.
6. Vortex vigorosamente durante 30 segundos.
7. Centrifugar a 13.000-16.000 x g durante 5 minutos.
Se observará que el precipitado proteico forma un pellet muy tenue (si había poco pellet celular, a veces no se observa el pellet proteico).
8. Pasar el sobrenadante que contiene el ADN a un tubo de 1.5 ml que contenga **300 µl de isopropanol**. Mezclar por inversión varias veces.
9. Centrifugar a 13.000-16.000 x g durante 3 minutos.
10. Eliminar el sobrenadante. Añadir **300 µl de etanol 70%** e invertir varias veces para lavar el pellet de ADN.
Vigilar no perder el pellet de ADN que será muy pequeño o indetectable y será más visible después del lavado de etanol 70%.
11. Centrifugar a 13.000-16.000 x g durante 2 minutos. Cuidadosamente eliminar todo el etanol. Vigilar no perder el pellet de ADN que será muy pequeño o indetectable.
12. Invertir el tubo y dejar secar en papel absorbente durante 5 minutos.
También se puede hacer un pulso con centrifuga y retirar el líquido con micropipeta.
13. Añadir **30-40 µl de Tampón de Hidratación** del ADN y resuspender con micropipeta.
- 14 . Conservar a 2-8°C. Para almacenajes largos conservar a -20°C o -80°C.

3.3 Extracción a partir de muestras de hisopos

El uso de cepillos de espuma como los que se proveen son los adecuados ya que permiten recuperar casi la totalidad del Tampón de lisis después del periodo de incubación.

Lisis celular

1. Añadir **600 µl** de **Tampón de Lisis** en un microtubo de 2.0 ml. Cortar la cabeza del cepillo con un poco de mango y introducirla en el microtubo. Vortex vigorosamente para liberar las células del cepillo.
2. Añadir **5 ul** de **Proteinasa K** + **5 ul de RNasa** e incubar a 37°C durante 30 minutos. **Realizar varios vortex durante el periodo de incubación.**
3. Retirar la cabeza del cepillo de la solución de lisis, frotándolo contra las paredes para recoger la máxima cantidad de líquido.

Precipitación de proteínas

1. Añadir **200 µl de Tampón de precipitación de proteínas.**
2. Vortex vigorosamente durante 30 segundos.
3. Centrifugar a 13.000-16.000 x g durante 5 minutos. Se observará que el precipitado proteico forma un pellet.

Precipitación del ADN

1. Pasar el sobrenadante que contiene el ADN a un tubo de 1.5 ml que contenga **600 µl de isopropanol**. Mezclar por inversión varias veces.
2. Centrifugar a 13.000-16.000 x g durante 3 minutos.
3. Eliminar el sobrenadante. Añadir **600 µl de etanol 70%** e invertir varias veces para lavar el pellet de ADN. ***Vigilar no perder el pellet de ADN que será muy pequeño o indetectable y será más visible después del lavado de etanol 70%.***
4. Centrifugar a 13.000-16.000 x g durante 2 minutos. Cuidadosamente eliminar todo el etanol. Vigilar no perder el pellet de ADN
5. Invertir el tubo y dejar secar en papel absorbente durante 5 minutos.

Hidratación del ADN

1. Añadir **30-40 µl de Tampón de Hidratación** del ADN y resuspender con micropipeta.
2. Conservar a 2-8°C. Para almacenajes largos conservar a -20°C o -80°C.

4. GUIA DE PROBLEMAS Y SOLUCIONES

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