



DANAGENE CIRCULATING DNA MINIKIT

Ref. 0614.1 50 extracciones

1.INTRODUCCION

DANAGENE Circulating DNA Minikit proporciona un método rápido, seguro y conveniente para purificar y concentrar ADN circulante de elevada calidad, pureza y libre de inhibidores a partir de **muestras frescas o congeladas de suero/plasma u otros fluidos biológicos a partir de muestras de 1 ml** utilizando para ello columnas y un tampón especial que unen especialmente los fragmentos de menor tamaño.

Normalmente el ADN circulante se encuentra altamente fragmentado 50-1000 pb. El grado de fragmentación depende de varios parametros como el origen del ADN (fetal, tumor, ADN microbiano), salud del donante de sangre, procedimiento de recolección de la sangre, manejo y almacenamiento de la muestra.

El contenido de ADN circulante depende las condiciones particulares de cada muestra pero típicamente oscila en el rango de 0.1-100 ng / ml plasma/suero.

Características:

- **Para una rápida obtención de ADN circulante a partir de plasma y suero.**
- **Tamaño de muestra: 1000 ul de plasma o suero y fluidos biológicos.**
- **No se utilizan extracciones orgánicas o precipitaciones con alcohol.**
- **Completa eliminación de inhibidores o contaminantes.**
- **Típico rendimiento: 0.1-100 ng por ml de plasma/suero. Variable debido a cada donante y estado de la enfermedad.**
- **Volumen de elución: 30 ul.**
- **Se obtiene un ADN que puede ser utilizado directamente en PCR o real-time PCR.**

Aplicaciones:

- **ADN circulante a partir de plasma o suero.**
- **Ideal para la detección de Biomarcadores en diferentes enfermedades.**
- **Análisis de ADN fetal a partir del plasma materno.**

2.COMPONENTES KIT

Reactivos	Ref.0613.1	
	50	Tª Stock
	extracciones	
Tampón Lisis PS	55 ml	15-25°C
Proteinasa K*	2 x 100 mg	-20°C
Tampón Desinhibición*	18 ml	15-25°C
Tampón de Lavado*	10 ml	15-25°C
Tampón de Elución	2 ml	15-25°C
MicroSpin Columns	50 unidades	15-25°C
Tubos de Recogida	250 unidades	15-25°C
Tubos de 3 ml	50 unidades	15-25°C

*Ver en el apartado de preparaciones pre-eliminares como preparar estas soluciones

Equipos y reactivos necesarios y no provistos

- Baño termostático.
- Etanol 100 % y isopropanol.
- Microcentrifuga.
- Microtubos de 1.5 y 2.0 ml.

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 Lisis PS y el Tampón Desinhibición contiene guanidine hydrochloride que es irritante, utilizar guantes y gafas. NO añadir hipoclorito de sodio o soluciones ácidas ya que pueden reaccionar con ambos tampones formando componentes tóxicos.

3.PROTOCOLO

3.1 Recolección y almacenamiento de muestras

Muestras de plasma y suero, deberían ser enfriadas y centrifugadas inmediatamente en la hora siguiente a su obtención. Para la preparación del plasma :

1. Centrifugar sangre fresca a 1600-2000 x g durante 10 minutos.
2. Recuperar el plasma vigilando de no añadir la capa que contiene las células.
3. Conservar el plasma a -80°C hasta la extracción del ADN.
4. **Descongelar el plasma y centrifugar a máxima velocidad durante 5 minutos para eliminar el posible DNA celular contaminante que provenga de células residuales. Utilizar el sobrenadante para la extracción de ADN.**

3.2 Preparaciones preliminares

- Disolver la proteinasa K en **2 x 2.0 ml** 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.
- Añadir el Etanol 100 % al Tampón de Lavado indicado en la etiqueta, unos **40 ml**. Mantener el envase bien cerrado para evitar la evaporación del etanol.
- Añadir el Etanol 100 % al Tampón de Desinhibición indicado en la etiqueta, unos **10 ml**.
- **Pre-calentar el Tampón de Elución a 70°C.**

3.3 Protocolo para la extracción de ADN circulante a partir 1ml de plasma / suero

Descongelar el plasma y centrifugar a máxima velocidad durante 5 minutos para eliminar el posible DNA celular contaminante que provenga de células residuales. Utilizar el sobrenadante para la extracción de ADN.

1. Pipetear **1000 µl de plasma/suero** en un microtubo de 1.5 ml. **Incubar a 55°C** durante 15 minutos. Centrifugar a máxima velocidad durante 5 minutos.
2. Traspasar el SN al tubo de 3 ml suministrado. Añadir **1000 µl de Tampón Lisis PS + 75 µl Proteinasa K** . Vortex y mezclar bien. **Incubar a 55°C** durante 15 minutos.
3. Añadir **750 µl de Isopropanol. Mezclar bien.**
4. **Pasar 700 µl de la muestra a una MicroSpin columna** con su tubo de recolección. La capacidad de la columna son 800 ul, así que se requiere realizar este paso 4 veces para pasar toda la muestra.
5. **Centrifugar a 8.000 rpm durante 30 segundos.**
6. **Repetir este proceso 3 veces hasta pasar toda la muestra por la MicroSpin columna.** En el cuarto paso centrifugar a 14.000 rpm.
7. Colocar la MicroSpin columna en un nuevo tubo de recolección y **Añadir 500 µl de Tampón de Desinhibición** en el reservorio de la MicroSpin columna. **Centrifugar a 14.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el líquido.
8. **Añadir 500 µl de Tampón de Lavado** en el reservorio de 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 30 µl de Tampón de elución (precalentado a 70°C)** en la MicroSpin columna. **Incubar 2 minutos.**
Es muy importante añadir el Tampón de elución en el centro de la membrana para que se humedezca completamente.
11. **Centrifugar a 10.000 rpm velocidad durante 60 segundos. Recoger los 30 µl y volver a depositar en el centro de la membrana.** Esto hace aumentar el rendimiento.
12. **Incubar 2 minutos y centrifugar a máxima velocidad.** Ahora el microtubo contiene el ADN circulante. Utilizar o almacenar a -20°C.

3.4 Protocolo OPCIONAL para la extracción de ADN circulante a partir de 250 µl / 500 µl plasma / suero

Descongelar el plasma/suero y centrifugar a máxima velocidad durante 5 minutos para eliminar el posible DNA celular contaminante que provenga de células residuales. Utilizar el sobrenadante para la extracción de ADN.

1. Pipetear **250-500 µl de plasma/suero** en un microtubo de **1.5 ml-3.0 ml**. Añadir **500-1000 µl de Tampón Lisis PS** + **40-75 µl Proteinasa K** . Vortex y mezclar bien.
2. **Incubar a 55°C** durante 30 minutos.
3. Añadir **375-600 µl de Isopropanol**. Mezclar bien.
4. **Pasar 600-700 µl de la muestra a una MicroSpin columna** con su tubo de recolección.
5. **Centrifugar a 8.000 rpm durante 30 segundos**.
6. **Pasar el resto de la muestra por la MicroSpin columna**.
7. **Centrifugar a 8.000 rpm durante 30 segundos**.
8. Colocar la MicroSpin columna en un nuevo tubo de recolección y **Añadir 500 µl de Tampón de Desinhibición** en el reservorio de la MicroSpin columna. **Centrifugar a 14.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el líquido.
9. **Añadir 500 µl de Tampón de Lavado** en el reservorio de 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 30 µl de Tampón de elución (precalentado a 70°C)** en la MicroSpin columna. **Incubar 2 minutos**.
Es muy importante añadir el Tampón de elución en el centro de la membrana para que se humedezca completamente.
12. **Centrifugar a 10.000 rpm velocidad durante 60 segundos**. **Recoger los 30 µl y volver a depositar en el centro de la membrana**. Esto hace aumentar el rendimiento.
13. **Incubar 2 minutos y centrifugar a máxima velocidad**. Ahora el microtubo contiene el ADN circulante. Utilizar o almacenar a -20°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 S.L info@danagen.es