



DANAGENE microSPIN DNA KIT

Ref. 0607.1 50 extracciones

Ref. 0607.2 250 extracciones

1.INTRODUCCION

Este kit permite una eficiente extracción de **ADN genómico y mitocondrial a partir de muestras de pequeño tamaño, como diferentes tipos de células y tejidos, muestras microdisseccionadas por láser, pequeñas cantidades de sangre** utilizando un diseño especial de columnas para ello,

El diseño especial de la columna está conectado con un reducido volumen muerto y un pequeño diámetro de la membrana de sílica **que permite una eluir en tan sólo 10 µl.**

MUESTRA	TAMAÑO
Tejidos	< 10 mg
Células en cultivo	< 10 ⁵
Sangre	< 100 µl
Tejidos microdisseccionados por láser	Una muestra
“Buccal swab”	uno



MicroSpin Columnna Columna normal

Características:

- Tecnología de membranas de sílica pero con un diseño especial de MicroSpin columnas.
- Purificación rápida de ADN de elevada calidad a partir de muestras de reducido tamaño..
- Rapid purification of high-quality DNA from small samples quantities.
- No se utilizan extracciones orgánicas o precipitaciones con alcohol.
- Completa eliminación de inhibidores o contaminantes.
- Volumen de elución: 10-30 µl.
- Se obtiene un ADN de elevada calidad que puede ser utilizado directamente en PCR, Southern, clonaje y en cualquier reacción enzimática.

Aplicaciones:

- Extracción de ADN a partir de tejidos (tejido humano o de ratón, tejidos microdisseccionados por láser).
- Extracción de ADN a partir de células (células en cultivo).
- Extracción de ADN a partir de muestras clínicas (muestras de sangre, biopsias).
- Extracción de ADN a partir de muestras forenses (“buccal swabs”).

2.COMONENTES KIT

	Ref.0607.1	Ref.0607.2	Conservación
Tampón de Lisis RBC	8 ml	40 ml	
Tampón de Lisis de Tejidos	10 ml	50 ml	T.ambiente
Tampón de Lisis / Unión	10 ml	50 ml	T.ambiente
Proteinasa K (*)	22 mg	105 mg	-20°C
Tampón de Desinhibición (*)	18 ml	85 ml	T.ambiente
Tampón de Lavado (*)	6 ml	30 ml	T.ambiente
Tampón de Elución	2 ml	10 ml	T.ambiente
MicroSpin Columns	50	250	T.ambiente
Tubos de recolección 2.0 ml	100 unidades	500 unidades	T.ambiente

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

Equipos y reactivos necesarios y no provistos

- Etanol 100 %
- Microcentrifuga.
- Microtubos de 1.5 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 de Lisis/Unión y el Tampón de Desinhibición contiene guanidine hydrochloride que es irritante, utilizar guantes y gafas.

3.PROTOCOLO

3.1 Preparaciones preliminares

- Disolver la proteinasa K en **1.1 ml** de agua libre de nucleasas (kit 50 extracciones) y en **5.2 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 de Tejidos, Tampón de Lisis/ Unión no tienen 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 **24 ml** (kit 50 extracciones) y unos **120 ml** (kit 250 extracciones). Mantener el envase bien cerrado para evitar la evaporación del etanol.
- Pre-calentar el Tampón de Elución a 70°C .

3.2 Protocolo para extracción de ADN genómico a partir de sangre

1. Pipetear **30 o 50 µl de sangre** en un microtubo de 1.5 ml. Añadir **150 µl de Tampón Lisis RBC**. Vortex e incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
2. Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto. Eliminar el sobrenadante por decantación mejor que con micropipeta que puede aspirar el pequeño pellet celular no visible y dejar 10-20 µl de líquido residual. Vortex el microtubo para resuspender el pellet.
3. Add **180 µl de Tampón de lisis de Tejidos + 20 µl Proteinasa K**. Mezclar por vortex durante 2-5 segundos.
4. **Incubar a 56°C** durante 10 minutos.
5. Añadir **200 µl de Tampón de Lisis / Unión**. Mezclar por vortex. **Incubar a 70°C durante 10 minutos**.
6. Añadir **200 µl de Etanol (96-100%) al lisado** . Mezclar por vortex.
7. **Pasar la muestra a una MicroSpin columna** con su tubo de recolección.
8. **Centrifugar a 8.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el tubo de recolección. Si la muestra no ha pasado completamente, repetir el paso de centrifugación.
9. Colocar la MicroSpin columna en un nuevo tubo de recolección y añadir **500 µl de Tampón de Desinhibición**. **Centrifugar a 12.000-14.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el líquido.
10. **Añadir 500 µl of Tampón de Lavado**. **Centrifugar a 14.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el líquido.
11. **Centrifugar a máxima velocidad durante 3 minutos para eliminar el etanol residual**.
12. Colocar la MicroSpin columna en un microtubo de 1.5 ml y añadir **10-50 µl de Tampón de elución (10 mM Tris.HCl, pH 8.5)** . *Asegurarse que el Tampón de elución es dispensado directamente en el centro de la membrana para una completa elución del ADN unido. El promedio de volumen de eluido son 10 µl a partir de 12 µl de tampón de elución utilizado.*
13. **Incubar 1 minuto**. **Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto**. El microtubo contiene ahora el ADN genómico.

3.3 Protocolo para extracción de ADN genómico a partir de células en cultivo

1. Resuspender hasta 10^5 células en un volumen final de **80 µl de Tampón de lisis de Tejidos + 10 µl Proteinasa K**. Mezclar por vortex durante 2-5 segundos.
2. **Incubar a 56°C durante 10 minutos**.
3. Añadir **80 µl de Tampón de Lisis / Unión**. Mezclar por vortex. **Incubar a 70°C durante 5 minutos**. *Permitir que el lisado se enfríe a temperatura ambiente.*
4. Añadir **80 µl de Etanol (96-100%) al lisado**. Mezclar por vortex. Brevemente centrifugar para recoger las posibles gotas presentes en el microtubo.
5. **Pasar la muestra a una MicroSpin columna** con su tubo de recolección.
6. **Centrifugar a 8.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el tubo de recolección. Si la muestra no ha pasado completamente, repetir el paso de centrifugación.

7. Colocar la MicroSpin columna en un nuevo tubo de recolección y añadir **80 µl de Tampón de Desinhibición**.
8. **Centrifugar a 12.000-14.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el líquido.
9. **Añadir 80 µl de Tampón de Lavado. Centrifugar a 12.000-14.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el líquido.
10. **Centrifugar a máxima velocidad durante 3 minutos para eliminar el etanol residual**.
11. Colocar la MicroSpin columna en un microtubo de 1.5 ml y añadir **10-50 µl de Tampón de elución (10 mM Tris.HCl, pH 8.5)** . *Asegurarse que el Tampón de elución es dispensado directamente en el centro de la membrana para una completa elución del ADN unido. El promedio de volumen de eluido son 10 µl a partir de 12 µl de tampón de elución utilizado.*
12. **Incubar 1 minuto. Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto**. El microtubo contiene ahora el ADN genómico.

3.4 Protocolo para extracción de ADN genómico a partir menos de 10 mg de tejido animal

1. Pasar una muestra de tejido de menos de 10 mg a un microtubo de 1.5 ml.
2. Add **180 µl de Tampón de lisis de Tejidos + 20 µl Proteinasa K**. Mezclar por vortex durante 2-5 segundos.
3. **Incubar a 56°C** durante 1-4 horas o hasta que la lisis sea completa, las muestras pueden incubarse overnight. Todas las muestras y especialmente las muestras que son difíciles de lisar pueden ser molidas con Ni líquido o pueden ser tratadas directamente con un homogenizador tipo Polytron.
4. Añadir **200 µl de Tampón de Lisis / Unión**. Mezclar por vortex. **Incubar a 70°C durante 10 minutos**. Si se observan partículas insolubles, centrifugar 5 minutos a máxima velocidad y pasar el sobrenadante a un nuevo microtubo.
5. Añadir **200 µl de Etanol (96-100%) al lisado** . Mezclar por vortex. Brevemente centrifugar para recoger las posibles gotas presentes en el microtubo.
6. **Pasar la muestra a una MicroSpin columna** con tubo de recolección.
7. **Centrifugar a 8.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el tubo de recolección. Si la muestra no ha pasado completamente, repetir el paso de centrifugación.
8. Colocar la MicroSpin columna en un nuevo tubo de recolección y añadir **500 µl de Tampón de Desinhibición**.
9. **Centrifugar a 12.000-14.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el líquido
10. **Añadir 500 µl of Tampón de Lavado. Centrifugar a 12.000-14.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el líquido.
11. **Centrifugar a máxima velocidad durante 3 minutos para eliminar el etanol residual**.
12. Colocar la MicroSpin columna en un microtubo de 1.5 ml y añadir **10-50 µl de Tampón de elución (10 mM Tris.HCl, pH 8.5)** . *Asegurarse que el Tampón de elución es dispensado directamente en el centro de la membrana para una completa elución del ADN unido. El promedio de volumen de eluido son 10 µl a partir de 12 µl de tampón de elución utilizado.*
13. **Incubar 1 minuto. Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto**. El microtubo contiene ahora el ADN genómico.

3.5 Protocolo para extracción de ADN genómico a partir de tejido microdisecionado por láser

NOTA: Este protocolo de extracción de ADN genómico a partir d tejidos microdisecionados por láser es bastante difícil, la muestra es muy pequeña y la calidad del ADN puede verse adversamente afectada por la fijación y procesos de tinción, y puede ser necesario tanto modificar los protocolos de fijación o utilizar crio-secciones para minimizar este problema

1. Pasar una muestra de tejido microdisecionado por láser a un microtubo.
2. Añadir **80 µl de Tampón de lisis de Tejidos + 10 µl Proteinasa K**. Mezclar por vortex durante 2-5 segundos.
3. **Incubar a 56°C** durante 1-4 horas o hasta que la lisis sea completa, las muestras pueden incubarse overnight.
4. Añadir **80 µl de Tampón de Lisis / Unión**. Mezclar por vortex. **Incubar a 70°C durante 5 minutos**. *Permitir que el lisado se enfríe a temperatura ambiente.*
5. Añadir **80 µl de Etanol (96-100%) al lisado**. Mezclar por vortex. Brevemente centrifugar para recoger las posibles gotas presentes en el microtubo.
6. **Pasar la muestra a una MicroSpin columna** con su tubo de recolección.
7. **Centrifugar a 8.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el tubo de recolección. Si la muestra no ha pasado completamente, repetir el paso de centrifugación.
8. Colocar la MicroSpin columna en un nuevo tubo de recolección y añadir **80 µl de Tampón de Desinhibición**.
9. **Centrifugar a 12.000-14.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el líquido.
10. **Añadir 80 µl de Tampón de Lavado**. **Centrifugar a 12.000-14.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el líquido.
11. **Centrifugar a máxima velocidad durante 3 minutos para eliminar el etanol residual**.
12. Colocar la MicroSpin columna en un microtubo de 1.5 ml y añadir **10-30 µl de Tampón de elución (10 mM Tris.HCl, pH 8.5)**. *Asegurarse que el Tampón de elución es dispensado directamente en el centro de la membrana para una completa elución del ADN unido. El promedio de volumen de eluido son 10 µl a partir de 12 µl de tampón de elución utilizado.*
13. **Incubar 1 minuto**. **Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto**. El microtubo contiene ahora el ADN genómico

3.6 Protocolo para extracción de ADN genómico a partir de frotis bucales

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 escobillón. Frotar el escobillón en el interior de la mejilla (pared bucal) y encías con una firme presión unas 20 veces por cada lado de la cara y cada lado del escobillón.
3. Utilizar inmediatamente para la extracción. Si se ha de transportar la muestra, dejar secar el cepillo a temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego introducir el cepillo en el receptáculo que se provee para el envío. En este tubo contenedor la muestra puede permanecer 1 semana a 22-37°C antes de realizarse la extracción. Para almacenamientos largos conservar la muestra en el contenedor a -20°C hasta 6 meses.
4. Añadir **250 µl de Tampón de Lisis + 20 µl de Proteinasa K (20 mg/ml)** en un microtubo de 1.5 ml. Cortar la cabeza del cepillo con un poco de mango y introducirla en el microtubo. Vortex vigorosamente para liberar las células del cepillo. Asegurarse de que la muestra queda completamente cubierta con el tampón durante la incubación.

5. **Incubar a 56°C durante 30-60 minutos.** Centrifugar brevemente. Retirar la cabeza del cepillo de la solución de lisis, frotándolo contra las paredes para recoger la máxima cantidad de líquido. **Medir la cantidad de lisado.**
6. Añadir **1 volumen de Tampón de Lisis/Unión** equivalente a la cantidad de lisado. Mezclar por vortex. **Incubar a 70°C durante 10 minutos.**
7. Añadir **1 volumen de Etanol 96-100%** equivalente a la cantidad de lisado. Vortex.
8. **Pasar la muestra a una MicroSpin columna** con su tubo de recolección.
9. **Centrifugar a 8.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el tubo de recolección. Si la muestra no ha pasado completamente, repetir el paso de centrifugación.
10. Colocar la MicroSpin columna en un nuevo tubo de recolección y añadir **200 µl de Tampón de Desinhibición.**
11. **Centrifugar a 12.000-14.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el líquido.
12. **Añadir 200 µl de Tampón de Lavado. Centrifugar a 12.000-14.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el líquido.
13. **Centrifugar a máxima velocidad durante 3 minutos para eliminar el etanol residual.**
14. Colocar la MicroSpin columna en un microtubo de 1.5 ml y añadir **10-30 µl de Tampón de elución (10 mM Tris.HCl, pH 8.5)**. *Asegurarse que el Tampón de elución es dispensado directamente en el centro de la membrana para una completa elución del ADN unido. El promedio de volumen de eluido son 10 µl a partir de 12 µl de tampón de elución utilizado.*
15. **Incubar 1 minuto. Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.** El microtubo contiene ahora el ADN genómico

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.