



DANAGENE SALIVA KIT

Ref.0603.4 50 Extracciones / Ref.0603.41 160 Extracciones

1.INTRODUCCION

DANAGENE SALIVA Kit provee un método para la extracción de ADN genómico de alta calidad a partir de muestras de **saliva directa, muestras de frotis bucales con cepillos de espuma, muestras de saliva recolectadas con el DANASALIVA Sample Collection Kit y muestras de saliva recolectadas con el ORAGENE self collection kits (DNAGenotek).**

Es un método rápido, seguro y económico. Utiliza un paso de desproteinización 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. 0603.4	Ref. 0603.41	
Tampón de Lisis	40 ml	105 ml	Tªambiente
Tampón de Precipitación de proteínas	35 ml	85 ml	Tªambiente
Tampón de Hidratación	40 ml	100 ml	Tªambiente
Proteinasa K (20mg/ml)	300 µl	800 µl	-20°C
RNasa (10mg/ml)	300 µl	800 µl	-20°C

TIPOS DE MUESTRAS	Ref. 0603.4	Ref. 0603.41
600 µl de saliva directa	50 extracciones	160 extracciones
Frotis bucales con DANASALIVA HISOPOS Ref.0603.42	50 extracciones	160 extracciones
DANASALIVA Sample Collection Kit	50 extracciones	160 extracciones
Si se procesan 600 µl de saliva DANASALIVA Sample Collection Kit	20 extracciones	50 extracciones
Si se procesan 2.0 ml de saliva ORAGENE self collection kits (DNAGenotek) OG-500	20 extracciones	50 extracciones
ORAGENE self collection kits (DNAGenotek) OG-501	40 extracciones	100 extracciones

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, tubos de centrifuga de 15 o 50 ml.
- * Microcentrifuga o centrifuga clínica.
- * Vortex.
- * Baño de agua.

3.PROTOCOLO

3.1 Preparaciones preeliminarias

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

2. Las muestras de saliva se han de recoger antes de las comidas, lavarse la boca con agua y esperar unos 30 minutos para recoger la muestra. Las muestras de saliva directa deben ser procesadas, o mantener a 4° C si serán procesadas en menos de 2 horas.

3.2 Extracción a partir de muestras de 600 µl de saliva directa

Lisis Celular

1. Centrifugar **600 µl de saliva** durante 90 segundos a 13.000-16.000 x g. Eliminar el sobrenadante con pipeta sin dañar el pellet visible de células.

2. Añadir **600 µl de Tampón de Lisis + 5 µl de Proteinasa K (20 mg/ml) + 5 µl de RNasa** y resuspender mediante pipeta para lisar las células.

3. **Incubar a 37° C durante 30-60 minutos.** Si es posible vortex periódicamente durante el periodo de incubación.

Precipitación proteica.

1. Dejar enfriar las muestras 10min a 4°C

2. Añadir **200 µl de Tampón de Precipitación proteínas** al lisado celular.

3. Vortex vigorosamente a máxima velocidad durante 20-30 segundos.

4. Centrifugar a 13.000-16.000 x g durante 5 minutos. Se formará un precipitado. Si se observan partículas flotando volver a centrifugar después de incubar 5 minutos en hielo.

Precipitación del ADN.

1. Traspasar el sobrenadante que contiene el ADN a un microtubo nuevo que contiene 600µl de **Isopropanol**.

2. Mezclar por inversión unas 50 veces.

3. Centrifugar a 13.000-16.000 x g durante 2 minutos. El ADN será visible como un pellet blanco.

4. Eliminar el sobrenadante y secar el tubo de forma breve en papel absorbente. Añadir 600 µl de **Etanol 70%** para lavar el ADN.

5. Centrifugar a 13.000-16.000 x g durante 1 minuto. Cuidadosamente eliminar el sobrenadante sin tocar el pellet de ADN. Se puede volver a centrifugar brevemente para recoger las últimas gotas de etanol residual.

6. Invertir el microtubo en un papel absorbente y dejar secar durante unos 5-10 minutos.

Hidratación del ADN.

1. Añadir 100-750 µl de **Tampón de Hidratación** dependiendo del tamaño del pellet de ADN y resuspender con micropipeta. Los pellets de gran tamaño es posible que necesiten una incubación a 55°C durante 1 hora con periódicas agitaciones para resuspenderse completamente o incubar “overnight” a temperatura ambiente con ligera agitación. Para pellets muy pequeños se puede utilizar 25-50 µl de **Tampón de Hidratación**.

2. Conservar a 2-8°C. Para almacenajes largos conservar a -20°C o – 80.

3.3 Extracción a partir de muestras de frotis bucales con DANASALIVA HISOPOS (Ref.0603.42)

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. 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 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.
2. Añadir **5 µl de Proteinasa K (20 mg/ml) + 5 µl de RNasa** e incubar a 37°C durante 1 hora. 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. Dejar enfriar las muestras 10 min a 4°C
2. Añadir **200 µl de Tampón de precipitación de proteínas**.
3. Vortex vigorosamente durante 30 segundos.
4. 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.
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 5-10 minutos.

Hidratación del ADN

1. Añadir **30-50 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.

3.4 Extracción a partir de muestras de saliva conservadas en el DANASALIVA Sample Collection Kit (Ref. 0603.43)

2 OPCIONES: Dependerá de la cantidad necesaria de ADN para las aplicaciones posteriores o la preferencia de trabajar con una microcentrífuga con tubos de 1.5 ml (opción A) o una centrífuga clínica y tubos de 15 ml (opción B).

A) Procesar 1.2 ml (saliva + solución conservadora de saliva) que representará procesar aproximadamente 600 µl de saliva directa.

Lisis Celular

1. En el DANASALIVA Sample Collection Kit se observará un pellet blanco que contiene las células de donde se va a extraer el ADN. Agitar bien el tubo que contiene los 2 ml de saliva recolectados. **Es importante** que se vea una solución homogénea.
2. Centrifugar **1.2 ml (saliva + solución conservadora de saliva)** durante 90 segundos a 13.000-16.000 x g. Eliminar el sobrenadante con pipeta sin dañar el pellet visible de células.
3. Añadir **600 µl de Tampón de Lisis + 5 µl de Proteinasa K (20 mg/ml) + 5 µl de RNasa** y resuspender mediante pipeta para lisar las células.
4. **Incubar a 37° C durante 30-60 minutos.** Si es posible vortex periódicamente durante el periodo de incubación.

Precipitación proteica.

1. Dejar enfriar las muestras 10min a 4°C
2. Añadir **200 µl de Tampón de Precipitación proteínas** al lisado celular.
3. Vortex vigorosamente a máxima velocidad durante 20-30 segundos.
4. Centrifugar a 13.000-16.000 x g durante 5 minutos. Se formará un precipitado. Si se observan partículas flotando volver a centrifugar después de incubar 5 minutos en hielo.

Precipitación del ADN.

1. Traspasar el sobrenadante que contiene el ADN a un microtubo nuevo que contiene 600µl de **Isopropanol**.
2. Mezclar por inversión unas 50 veces.
3. Centrifugar a 13.000-16.000 x g durante 2 minutos. El ADN será visible como un pellet blanco.
4. Eliminar el sobrenadante y secar el tubo de forma breve en papel absorbente. Añadir 600 µl de **Etanol 70%** para lavar el ADN.
5. Centrifugar a 13.000-16.000 x g durante 1 minuto. Cuidadosamente eliminar el sobrenadante sin tocar el pellet de ADN. Se puede volver a centrifugar brevemente para recoger las últimas gotas de etanol residual.
6. Invertir el microtubo en un papel absorbente y dejar secar durante unos 5-10 minutos.

Hidratación del ADN.

1. Añadir 100-750 µl de **Tampón de Hidratación** dependiendo del tamaño del pellet de ADN y resuspender con micropipeta. Los pellets de gran tamaño es posible que necesiten una incubación a 55°C durante 1 hora con periódicas agitaciones para resuspenderse completamente o incubar “overnight” a temperatura ambiente con ligera agitación. Para pellets muy pequeños se puede utilizar 25-50 µl de **Tampón de Hidratación**.
2. Conservar a 2-8°C. Para almacenajes largos conservar a -20°C o -80.

B) Procesar todo el contenido del DANASALIVA Sample Collection Kit (saliva + solución conservadora de saliva)

Lisis Celular

1. En el DANASALIVA Sample Collection Kit se observará un pellet blanco que contiene las células de donde se va a extraer el ADN. Agitar bien el tubo que contiene los 2 ml de saliva recolectados. **Es importante** que se vea una solución homogénea.
2. Traspasar todo el contenido **del tubo (4,50 ml)** del DANASALIVA Sample Collection Kit a **un tubo de centrifuga de 15 ml**. Asegurarse que se ha traspasado todo el contenido incluido el pellet blanco.
3. Centrifugar a 4000 rpm durante 2 minutos. Se observará la formación de un pellet blanco. Eliminar el sobrenadante **sin perder nada de pellet celular**.
4. Añadir **2 ml de Tampón de Lisis + 15 µl de Proteinasa K (20 mg/ml) + 15 µl de RNasa** y resuspender mediante pipeta para lisar las células. Incubar a 37° C durante 60 minutos. **Muy importante que todo el pellet celular sea resuspendido**. Si es posible vortex periódicamente durante el periodo de incubación.

Precipitación proteica.

1. Dejar enfriar las muestras 10min a 4°C
2. Añadir **750 µl de Tampón de Precipitación proteínas** al lisado celular.
3. Vortex vigorosamente a máxima velocidad durante 20-30 segundos.
4. Centrifugar a 4000 rpm durante 5 minutos. Se formará un precipitado. Si se observan partículas flotando volver a centrifugar después de incubar 5 minutos en hielo.

Precipitación del ADN.

1. Traspasar el sobrenadante que contiene el ADN a **un tubo de centrifuga de 15 ml** nuevo que contiene **2 ml de Isopropanol**.
2. Mezclar por inversión unas 25 veces.
3. Centrifugar a 4000 rpm durante 3 minutos. El ADN será visible como un pellet blanco en el fondo o pared del tubo.
4. Eliminar el sobrenadante y secar el tubo de forma breve en papel absorbente. Añadir **2 ml de Etanol 70%** para lavar el ADN.
5. Centrifugar a 4000 rpm durante 1 minuto. Cuidadosamente eliminar el sobrenadante sin tocar el pellet de ADN. Se puede volver a centrifugar brevemente para recoger las últimas gotas de etanol residual.
6. Invertir el tubo en un papel absorbente y dejar secar durante unos 5-10 minutos.

Hidratación del ADN.

1. Añadir 750-1.000 µl de agua estéril o **Tampón de Hidratación** y resuspender con pipeta.
2. Incubar a 50°C durante 1 hora con periódicas agitaciones para ayudar a la rehidratación del ADN, o incubar "overnight" a temperatura ambiente con ligera agitación.
3. Conservar a 2-8°C. Para almacenajes largos conservar a -20°C o -80 °C.

3.5 Extracción a partir de muestras de saliva conservadas en el ORAGENE self collection kits (DNA Genotek). OG-500 (2ml saliva) / OG-501 (1ml saliva)

Lisis Celular

1. Incubar las muestras de ORAGENE/saliva a 50°C en un incubador de agua durante 1 hora o en un incubador de aire por un mínimo de 2 horas.
2. Traspasar todo el contenido **del tubo (4 ml / 2 ml) a un tubo de centrifuga de 15 ml.**
3. Añadir **(1 ml / 0,50 ml) de Tampón de Lisis + (15 µl / 7,50 µl) de RNasa** . Vortex para mezclar bien. Incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.

Precipitación proteica.

1. Añadir **(1.60 ml / 0,80 ml) de Tampón de Precipitación proteínas** al lisado celular.
2. Vortex vigorosamente a máxima velocidad durante 20-30 segundos.
3. Centrifugar a 4000 rpm durante 5 minutos. Se formará un precipitado. Si se observan partículas flotando volver a centrifugar después de incubar 5 minutos en hielo.

Precipitación del ADN.

1. Traspasar el sobrenadante que contiene el ADN a **un tubo de centrifuga de 15 ml** nuevo que contiene **(5 ml / 2,50 ml) de Isopropanol.**
2. Mezclar por inversión unas 25 veces.
3. Centrifugar a 4000 rpm durante 3 minutos. El ADN será visible como un pellet blanco.
4. Eliminar el sobrenadante y secar el tubo de forma breve en papel absorbente. Añadir **(5 ml / 2,50 ml) de Etanol 70%** para lavar el ADN.
5. Centrifugar a 4000 rpm durante 1 minuto. Cuidadosamente eliminar el sobrenadante sin tocar el pellet de ADN. Se puede volver a centrifugar brevemente para recoger las últimas gotas de etanol residual.
6. Invertir el tubo en un papel absorbente y dejar secar durante unos 5-10 minutos.

Hidratación del ADN.

1. Añadir **(750-1.000 µl / 350-500 µl)** de agua estéril o **Tampón de Hidratación** y resuspender con pipeta.
2. Incubar a 50°C durante 1 hora con periódicas agitaciones para ayudar a la rehidratación del ADN, o incubar “overnight” a temperatura ambiente con ligera agitación.
3. 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