



## DANAGENE SPIN BLOOD DNA KIT

Ref. 0606.1 50 extracciones

Ref. 0606.2 250 extracciones

### 1.INTRODUCCION

Este kit está designado para una rápida extracción y purificación de **ADN genómico de alta calidad a partir de sangre total, suero, plasma y fluidos biológicos** utilizando Spin columnas con membrana de sílica que une selectivamente el ADN

**Este Kit utiliza un nuevo Tampón de Lisis / Unión formulado específicamente para la extracción de ADN a partir de muestras de sangre para la obtención de un alto rendimiento.**

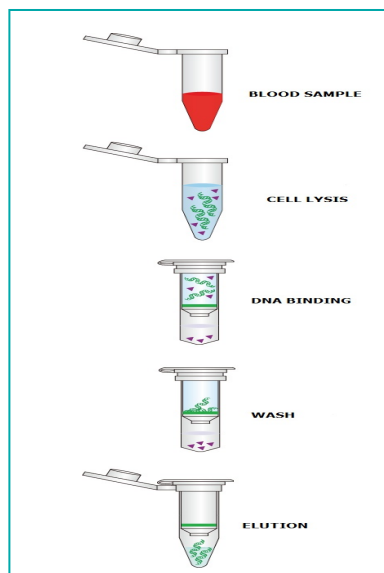
#### Características:

- Para una rápida obtención de ADN de elevada calidad y listo para su uso a partir de sangre.
- Tamaño de muestra: 300 µl de sangre total, plasma, suero y fluidos biológicos.
- No se utilizan extracciones orgánicas o precipitaciones con alcohol.
- Completa eliminación de inhibidores o contaminantes.
- Típico rendimiento: 6- 9 µg ADN genómico.
- Volumen de elución: 50-200 µl.
- Se obtiene un ADN de elevada calidad que puede ser utilizado directamente en PCR, Southern, clonaje y en cualquier reacción enzimática.

#### Aplicaciones:

- Extracciones de ADN genómico, viral y bacteriano.
- ADN a partir de sangre total (sangre humana o animal, fresca o congelada).
- ADN a partir de sangre tratada con citrato, EDTA, heparina.
- ADN a partir de suero, plasma, plaquetas, “buffy coat”, fluidos biológicos y “dried blood spots.”

**Procedimiento:** En el caso muestras de sangre y si se requiere el ADN genómico, la mejor opción es una lisis previa y selectiva de los eritrocitos con el Tampón Lisis RBC para procesar sólo los linfocitos que nos proporcionará mejores resultados en cuanto calidad y rendimiento. Si se está buscando otro tipo de ADN (bacteriano, vírico) la lisis se consigue mediante la incubación de la sangre total en una solución caotrópica en presencia de proteinasa K a 70°C. Se crearán las condiciones apropiadas para que el ADN se una a la membrana de fibra de sílica al añadir etanol al lisado. Los contaminantes son eliminados por 2 diferentes lavados y finalmente el ADN es eluido con un tampón de elución.



## 2.COMONENTES KIT

Reactivos	Ref.0606.1	Ref.0606.2	Tª Stock
	50 extracciones	250 extracciones	
Tampón Lisis RBC	50 ml	250 ml	15-25°C
Tampón Lisis de Tejidos	10 ml	50 ml	15-25°C
Tampón de Lisis/Unión	15 ml	75 ml	15-25°C
Proteinasa K*	30 mg	2 x 75 mg	-20°C
Tampón de Desinhibición*	18 ml	90 ml	15-25°C
Tampón de Lavado*	10 ml	50 ml	15-25°C
Tampón de Elución	10 ml	50 ml	15-25°C
Spin Columns	50 units	250 units	15-25°C
Tubos de Recogida	100 units	500 units	15-25°C

\*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 Recolección y almacenamiento de muestras

**Muestras de sangre total** debería ser conservadas a 4°C inmediatamente después de su recolección. Son estables durante semanas a 4°C. También pueden ser enviadas en contenedores refrigerados.

**Muestras de plasma y suero**, deberían ser enfriadas y centrifugadas inmediatamente en la hora siguiente a su obtención. Para la preparación de suero sanguíneo centrifugar a 3.000 rpm durante 10 minutos y para muestras de plasma centrifugar a 3500 rpm durante 15 minutos.

Las muestras de plasma deberían ser separadas de las células y pasadas a un nuevo microtubo de 1.5 ml, la capa intermedia que incluye las células blancas, plaquetas no debe ser transferida con el plasma.

Las muestras de suero, son generalmente obtenidas con tubos de vidrio normal sin anticoagulantes que permite la formación de coágulos de sangre después de que el suero es recolectado y pasado a un nuevo microtubo para su transporte.

Si no es posible realizar la extracción en los tres días siguientes a su obtención, el plasma y el suero deberían ser congelados preferiblemente a -80°C o al menos a -20°C.

**Buffy coat** es una fracción enriquecida en leucocitos a partir de sangre total. Preparar esta fracción a partir de sangre total es simple y tiene un rendimiento aproximadamente de 5-10 veces más de ADN que un volumen equivalente de sangre total. Su preparación se realiza por centrifugación de la sangre a 2500 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de la centrifugación, se observan 3 fracciones. La fracción superior es el plasma; la intermedia es el byffy coat que contiene los leucocitos concentrados; y la fracción de abajo contiene los eritrocitos.

#### 3.2 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 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 **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.

### **3.3 Protocolo para la extracción de ADN genómico a partir de sangre (leucocitos)**

Este protocolo es para la purificación del ADN genómico a partir de los leucocitos realizando para ello una lisis selectiva de los eritrocitos con el Tampón de Lisis RBC. Si se requiere sólo el ADN genómico o mitocondrial este es método ideal ya que produce unos mejores resultados en cuanto a calidad y rendimiento.

1. Pipetear **300 µl de sangre** en un microtubo de 1.5 ml. Añadir **900 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 + 25 µl Proteinasa K**. Resuspender el pellet de células con micropipeta.
4. **Incubar a 56°C** durante 15 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 de Tampón de Lavado** en el reservorio de la Spin columna. **Centrifugar a 12.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el líquido.
11. 2º Lavado. **Añadir 500 µl de Tampón de Lavado** en el reservorio de la Spin columna. **Centrifugar a 14.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el líquido.
12. **Centrifugar a máxima velocidad durante 2 minutos para eliminar el etanol residual**.
13. Eliminar el tubo de recogida y insertar la spin columna 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 1 minuto**.
14. **Centrifugar a máxima velocidad durante 60 segundos**. El microtubo contiene ahora el ADN genómico.

### 3.4 Protocolo para la extracción de ADN a partir de sangre total, buffy coat y fluidos biológicos

Este protocolo es para la purificación del ADN total (genómico, mitocondrial, bacteriano y viral) a partir de sangre total, buffy coat y fluidos biológicos.

1. **Pipetear 25 µl proteinase K** en un microtubo de 1.5 ml.
2. **Añadir 300 µl de muestra** al microtubo. Utilizar hasta 300 µl de sangre total, plasma, suero, buffy coat o fluido biológico. Para muestras menores de 300 µl, añadir PBS para ajustar el volumen a 300 µl. Si purificamos ADN vírico, recomendamos empezar con 200 µl de suero o plasma.
3. **Añadir 300 µl del Tampón de Lisis/ Unión.** Vortex la mezcla vigorosamente (10–20 s). **Incubar a 70°C durante 15 minutos.** *El lisado se volverá marrón durante la incubación. Incrementar el periodo de incubación con proteinasa K hasta 30 minutos y vortex vigorosamente más veces durante el proceso de incubación si se procesa sangre vieja o coagulada.*
4. **Añadir 300 µL etanol (96–100 %)** a cada muestra y vortex.
5. Pipetear la mitad del lisado en el reservorio de la Spin column con su tubo de recogida. **Centrifugar a 10.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el tubo de recogida.
6. Repetir el punto 5 con la otra mitad del lisado.
7. Colocar la Spin column 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 500 µl de Tampón de Lavado** en el reservorio de la Spin column. **Centrifugar a 12.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el líquido.
9. 2º Lavado. **Añadir 500 µl de Tampón de Lavado** en el reservorio de la Spin column. **Centrifugar a 14.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el líquido.
10. **Centrifugar a máxima velocidad durante 2 minutos para eliminar el etanol residual.**
11. Eliminar el tubo de recogida y insertar la spin column 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 1 minuto.**
12. **Centrifugar a máxima velocidad durante 60 segundos.** El microtubo contiene ahora el ADN genómico.

### 3.5 Protocolo de extracción de ADN genómico a partir de “dried blood spots”

#### Paso obtención muestra

Colocar 3 círculos obtenidos de perforar un “dried blood spot” en un microtubo de 1.5 ml.

#### Paso de pre-tratamiento

**Añadir 200 µl de PBS** y vortex vigorosamente. Incubar a 85°C durante 10 minutos. Brevemente centrifugar para eliminar las gotas del tapón.

1. **Pipetear 25 µl proteinase K** en la muestra.
2. **Add 200 µl del Tampón de Lisis/ Unión.** Vortex la mezcla vigorosamente (10–20 s).
3. **Incubar a 70°C durante 1 hora.**
4. **Añadir 200 µl de etanol (96–100 %)** a cada muestra y vortex. Continuar en el punto 5 del protocolo 3.4.

#### **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](mailto:info@danagen.es)