



DANAGENE TURBO SANGRE KIT

Ref. 1105 100 extracciones y amplificaciones

1. INTRODUCCION

1.1 Descripción de producto

Este kit permite la obtención de **ADN genómico listo para PCR a partir de muestras de sangre total o semen** en tan solo 5 minutos.

El protocolo consiste en una incubación durante 5 minutos de 5 μ l de sangre total con la solución de lisis, esto permite la liberación del ADN, luego se añade la solución de neutralización, el extracto que se obtiene puede ser utilizado directamente para realizar amplificaciones por PCR.

El kit además de los reactivos para la extracción, incluye **una polimerasa "HOT STAR"** lista para su uso 2X, que permite amplificar cualquier fragmento a partir del extracto y de forma que el usuario sólo ha de añadir agua y "primers". Se requiere un paso de activación de 7 minutos a 95°C de forma que se eliminen los productos no específicos como "primers-dimers". Además contiene un **colorante rojo** que permite la fácil visualización y la siembra directa en el gel sin necesidad de mezclar con un tampón de carga.

1.2 Componentes del Kit y condiciones de almacenaje

Reactivos suficientes para	100 extracciones y amplificaciones	T ^a Stock
Solución de Lisis	2.5 ml	4°C
Solución de Neutralización	18 ml	4°C
Polimerasa "HOT STAR"	1.25 ml	-20°C

1.3 Equipos y reactivos necesarios y no provistos

- * Agua libre nucleasas.
- * Primers para PCR.
- * Microtubos o placas para PCR.
- * Microcentrifuga.
- * Termociclador.

1.4 Almacenamiento y estabilidad

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

La Polimerasa "HOT STAR" puede mantenerse a 4°C durante 2 semanas, para largos almacenamientos conservar a -20°C.

2.PROTOCOLO

2.1 Extracción de ADN a partir de sangre

1. Recoger la sangre en tubos que contenga EDTA o citrato de sodio. Mezclar bien por inversión.
2. Colocar en un microtubo **5 µl de sangre** total.
3. Añadir **20 µl de Solución de Lisis**. Mezclar bien con la pipeta.
4. Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
5. Añadir **180 µl de Solución de Neutralización**. Mezclar bien con la pipeta.
6. Conservar a 4°C el extracto neutralizado o utilizar **2.5 µl** inmediatamente en el proceso de PCR (apartado 3).El ADN es estable a 4°C durante unos 4 meses.

2.2 Extracción de ADN a partir de sangre recogida en el Papel Matrix

1. Recoger la sangre mediante la punción de un dedo con la lanceta y depositar las gotas de sangre entre los 5 círculos dibujados en el Papel Matrix. Permitir que se seque completamente a temperatura ambiente. El papel Matrix puede ser enviado al laboratorio a temperatura ambiente, una vez allí conservar a 4°C.
2. Recortar un disco o cuadrado de **unos 3 mm que contenga sangre** a partir del Papel Matrix y colocarlo en un microtubo de PCR.
3. Añadir **25 µl de Solución de Lisis** de forma que quede cubierto todo el Papel Matrix de solución y pipetear para mezclar. Las muestras pueden ser centrifugadas brevemente para recoger la solución y papel matrix.
4. Incubar en el termociclador a 75°C durante 5 minutos.
5. Añadir **180 µl de Solución de Neutralización**. Mezclar bien con la pipeta.
6. Conservar a 4°C el extracto neutralizado o utilizar **2.5 µl** inmediatamente en el proceso de PCR (apartado 3).El ADN es estable a 4°C durante unos 4 meses.

2.3 Extracción de ADN a partir de semen

1. Colocar en un microtubo de PCR 5 µl de semen.
2. Añadir **20 µl de Solución de Lisis**. Mezclar bien con la pipeta.
3. Incubar en el termociclador a 75°C durante 30 minutos.
4. Añadir **180 µl de Solución de Neutralización**. Mezclar bien con la pipeta.
5. Conservar a 4°C el extracto neutralizado o utilizar **2.5 µl** inmediatamente en el proceso de PCR (apartado 3).El ADN es estable a 4°C durante unos 4 meses.

3. AMPLIFICACION POR PCR

1. Utilizar 2.5 μ l del extracto neutralizado para cada reacción de PCR.
2. Las concentraciones típicas de los primers y parámetros utilizados dependerá de cada sistema utilizado. Una concentración final típica de primers es 0.5 μ M.

REACTIVOS	VOLUMEN
Agua libre nucleasas	X μ l
Polimerasa "HOT STAR"	12.5 μ l
Primers	Y μ l
Extracto neutralizado de sangre	2.5 μ l
Volumen Total	25 μl

3. Mezclar bien, el colorante rojo incluido en la polimerasa facilita el proceso.
4. Para aquellos termocicladores que no tengan un "heated lid", añadir 25 μ l de aceite mineral para prevenir la evaporación.
5. Realizar el proceso de amplificación. Los parámetros de amplificación deben ser optimizados par cada par de primers y ADN molde. **IMPORTANTE:** Para la activación de la Polimerasa "HOT STAR" es necesario programar un paso de desnaturalización inicial de 10 minutos a 95°C, después programar los 30 o 40 ciclos específicos de cada producto a amplificar.
6. El producto de la PCR puede ser sembrado directamente en un gel de agarosa después de la PCR ya que el colorante rojo actúa como tampón de carga.

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