



DANAGENE TURBO “Tejidos y Células” Kit

1. INTRODUCCION

1.1 Descripción de producto

Este kit permite la obtención de **ADN genómico listo para PCR** a partir de muestras de tejidos y células animales, colas de ratón, pelo y bacterias en **tan solo 2 pasos y en 15 minutos**.

La preparación de ADN genómico puede ser laboriosa y consumir bastante tiempo, estos métodos pueden ser necesarios para algunas aplicaciones en concreto o si se necesita gran cantidad de ADN. En el caso de la PCR, se necesita poca cantidad de ADN y no se requiere una elevada pureza del ADN.

El Danapure Turbo “Tejidos y Células” Kit incluye todos los reactivos necesarios para extraer ADN listo para PCR a partir de pequeñas muestras y amplificar los fragmentos de interés 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 10 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		Tª
Solución de Lisis	10 ml	4°C
Solución de Neutralización	10 ml	4°C
Polimerasa “HOT STAR”	1.25 ml	-20°C

1.3 Equipos y reactivos necesarios y no provistos

- * Agua libre nucleasas.
- * Cebadores 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 tejido

1. Añadir **100 µl de Solución de Lisis** en un microtubo de PCR.
2. Colocar 2-10 mg de tejido en la solución. Mezclar bien por vortex, asegurándose que el tejido está sumergido en la solución.
3. Incubar en el termociclador a 95°C durante 15 minutos. El tejido no se digerirá completamente al final de la incubación, esto es normal y no afectará al resultado.
4. Añadir **100 µl de Solución de Neutralización**. Vortex.
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.

2.2 Extracción de ADN a partir de cola de ratón

1. Añadir **100 µl de Solución de Lisis** en un microtubo de PCR.
2. Colocar 0.5-1.0 cm de la punta de una cola de ratón en la solución. Mezclar bien por vortex , asegurándose que la cola está sumergida en la solución.
3. Incubar en el termociclador a 95°C durante 15 minutos. El tejido no se digerirá completamente al final de la incubación, esto es normal y no afectará al resultado.
4. Añadir **100 µl de Solución de Neutralización**. Vortex.
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.

2.3 Extracción de ADN a partir de pelo con raiz

1. Añadir **100 µl de Solución de Lisis** en un microtubo de PCR.
2. Colocar 1o 2 pelos con raiz en la solución. Intentar eliminar el exceso de pelo dejando la raiz. Mezclar bien por vortex o pipeteo, asegurándose que el pelo está sumergido en la solución.
3. Incubar en el termociclador a 95°C durante 15 minutos. El tejido no se digerirá completamente al final de la incubación, esto es normal y no afectará al resultado.
4. Añadir **100 µl de Solución de Neutralización**. Vortex.
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.

2.4 Extracción de ADN a partir de células animales

1. Crecer una monocapa de células en una microplaca hasta un 90-95 % de confluencia.Aspirar completamente el medio.
2. Añadir **100 µl de Solución de Lisis** . Mezclar bien. Tapar la microplaca adecuadamente para evitar las evaporación durante la incubación.
3. Incubar en el termociclador a 95°C durante 15 minutos.
4. Añadir **100 µl de Solución de Neutralización**. Vortex.
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 µl** 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 µM.

REACTIVOS	VOLUMEN
Agua libre nucleasas	X µl
Polimerasa "HOT STAR"	12.5 µl
Primers	Y µl
Extracto neutralizado	2.5 µl
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 µl 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 productoa 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 actua como tampón de carga.