

KIT DE EXTRACCIÓN DE ADN CIRCULANTE DE ALTA CALIDAD A PARTIR DE MUESTRAS DE PLASMA O SUERO

Consideraciones generales

- LEER TODO EL PROTOCOLO ANTES de empezar.

- Para evitar errores en el uso de las soluciones del kit, se recomienda rotular los viales de cada solución en la tapa, a la llegada del mismo.

-Mantener las soluciones bien cerradas y en una zona bien ventilada.

-Este kit está indicado para su uso en diagnóstico *in vitro*.

-El tiempo aproximado de procesamiento es de 45 minutos.

Contenido del Kit

	Kit 20 extracciones	Kit 50 extracciones
Proteinasa K	0,65 ml	1,6 ml
Solución A	2,1 ml	5,2 ml
Solución B	4,5 ml	10,5 ml
Solución C	1,7 ml	4,2 ml
Solución D	12,5 ml	32 ml (2 x 16 ml)
Solución E	12 ml	25,5 ml
Solución F	1,5 ml	3 ml
Microtubos (1,5 ml)	40	100

Equipamiento y material requerido pero no suministrado

Para la utilización del kit se requiere del siguiente material no suministrado:

Pipetas y puntas (es altamente recomendable el uso de puntas con filtro para evitar contaminaciones cruzadas)

Guantes desechables.

Bloque térmico para la lisis a 56°C.

Microcentrífuga

Agitador vórtex

Consideraciones técnicas

Este kit ha sido especialmente diseñado con el objetivo de obtener, de forma reproducible, ADN circulante de alta calidad a partir de muestras de 1 ml de suero o plasma, para su uso posterior en análisis genéticos o epigenéticos. Este kit se puede utilizar también para la obtención de ADN circulante a partir de otros fluidos libres de células tales como la orina.

Se pueden utilizar volúmenes menores de muestra reduciendo de manera proporcional el volumen de las soluciones a utilizar. Para volúmenes mayores, se recomienda dividir la muestra en alícuotas de 0,5 ml y proceder con la purificación por separado. El DNA purificado de alícuotas de la misma muestra se puede mezclar al final del proceso, pero se incrementa el volumen de muestra final.

Es importante tener en cuenta que el ADN circulante suele estar presente en concentraciones muy bajas (1-100 ng/ml en personas sanas) y en fragmentos menores de 1000 bp. La concentración también varía de manera considerable entre diferentes individuos. No obstante, el ADN purificado con este kit ha sido analizado de manera exitosa en diversas aplicaciones como experimentos de genotipado o amplificaciones por PCR.

IDENTIFICACION DE LA SUSTANCIA O PREPARADO

SOLUCIÓN A

No peligrosa

SOLUCION B:

No peligrosa

SOLUCIÓN C: Contiene acetato de sodio

1. IDENTIFICACIÓN DE LOS PELIGROS

a. Identificación de la sustancia o preparado.

- **Clasificación de acuerdo con la regulación (EC) No 1272/2008 [EU-GHS/CLP]**

Iritación ocular (Categoría 2)

No es una sustancia o preparado peligroso, de acuerdo con las directivas comunitarias 67/548/EEC or 1999/45/EC.

b. Etiquetado



2. MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO

a. Precauciones para una correcta manipulación

Evitar contacto con piel y ojos. Evitar la inhalación de gases y vapores.

Tomar las medidas normales en protección contra incendios.

b. Almacenamiento

Almacenar en un lugar fresco. Conservar el envase herméticamente cerrado en un lugar seco y bien ventilado.

3. MEDIDAS EN CASO DE VERTIDO ACCIDENTAL

a. Equipo de protección del personal y procedimientos de emergencias

Usar equipo de protección. Evite respirar los gases o vapores que desprenda

Asegúrese de que hay buena ventilación

b. Información medioambiental

No dejar que el producto entre en el sistema de alcantarillado

c. Material y métodos de contención y limpieza

Absorber con un material inerte y tirar a contenedores apropiados y cerrados para su eliminación.

SOLUCIÓN D: Contiene 2-Propanol

1. IDENTIFICACIÓN DE LOS PELIGROS

- **Identificación de la sustancia o preparado. Clasificación de acuerdo con el Reglamento (CE) 1272/2008 [EU-GHS/CLP]**

Líquidos inflamables (Categoría 2)

Iritación ocular (Categoría 2)

Toxicidad específica en determinados órganos - exposición única (Categoría 3)

- **Clasificación de acuerdo con las Directivas de la UE 67/548/CEE ó 1999/45/CE**

Fácilmente inflamable e irritante. La inhalación d los vapores puede provocar somnolencia y vértigo.

a. Etiquetado



2. MANIPULACIÓN

a. Precauciones para una correcta manipulación

Evítese el contacto con los ojos y la piel. Evitar la inhalación de vapor o neblina.

Conservar alejado de toda llama o fuente de chispas - No fumar. Tomar medidas para impedir la acumulación de descargas electrostáticas.

b. Protección de manos

Manipular con guantes. Los guantes deben ser inspeccionados antes de su uso. Utilice la técnica correcta de quitarse los guantes (sin tocar la superficie exterior del guante) para evitar el contacto de la piel con este producto. Deseche los guantes contaminados después de su uso, de conformidad con las leyes aplicables y buenas prácticas de laboratorio. Lavar y secar las manos.

3. MEDIDAS EN CASO DE VERTIDO ACCIDENTAL

a. Equipo de seguridad el personal y procedimiento de emergencia

Utilícese equipo de protección individual. Evitar respirar los vapores, la neblina o el gas. Asegúrese una ventilación apropiada. Retirar todas las fuentes de ignición. Evacuar el personal a zonas seguras. Tener cuidado con los vapores que se acumulan formando así, concentraciones explosivas. Los vapores pueden acumularse en las zonas inferiores.

b. Información medioambiental

Impedir nuevos escapes o derrames si puede hacerse sin riesgos. No dejar que el producto entre en el sistema de alcantarillado.

SOLUCIÓN E

No peligroso.

SOLUCIÓN F

No peligroso

Condiciones de almacenamiento

Conservar las botellas, bien cerradas, en lugar ventilado. Todas las soluciones se pueden almacenar a temperatura ambiente (15-25°C). Si la temperatura es superior a 25°C se recomienda almacenar, al menos las soluciones A,B y C en un lugar refrigerado (2-8°C).

La proteinasa K es estable a temperatura ambiente, pero se recomienda almacenarla a 2-8°C para alargar su vida útil.

Si se han conservado las soluciones en frío, éstas deberán ser homogeneizadas y atemperadas a temperatura ambiente antes de su uso, especialmente la solución A para disolver el precipitado de sales.

Todas las soluciones son estables durante 1 año cuando se almacenan a temperatura ambiente (15-25 ° C), siempre y cuando no se exceda la fecha de caducidad del kit (ver pegatina en la caja). Cuando se conserva a 4°C, el kit es estable más de un año sin disminución de la calidad.

Recomendaciones del protocolo

- Muestras

Es muy importante un correcto procesado de las muestras de sangre para minimizar la posibilidad de contaminación con ADN celular en las muestras de plasma. **Se recomienda realizar una centrifugación adicional a alta velocidad en una microcentrífuga previa a la extracción del ADN circulante o del almacenamiento de la muestra.** Para muestras de orina también es recomendable realizar este paso, para evitar la presencia de células epiteliales que pudieran contaminar la muestra. La extracción de ADN puede realizarse a partir de muestras frescas, o muestras congeladas, de plasma, suero u orina.

- Soluciones

Homogeneizar suavemente cada solución antes de usar. En la solución A pueden aparecer precipitados de sales cuando se conserva a 4°C o incluso a temperatura ambiente. Se recomienda precalentarla a 55°C y homogeneizarla antes de su uso.

Cantidad de ADN

Concentración

El ADN circulante está presente en muy bajas concentraciones en los fluidos libres de células, siendo difíciles de determinar con espectrofotómetros. La cantidad de ADN purificado debería determinarse por métodos fluorimétricos (por ejemplo métodos basados en PicoGreen®) para obtener datos fiables y precisos de la concentración de la muestra final.

HIGH QUALITY CIRCULATING DNA EXTRACTION KIT FROM SERUM OR PLASMA SAMPLES

General instructions:

To ensure proper use and handling, please, READ THE ENTIRE MANUAL BEFORE using the Kit.

Labelling the top of each vial upon arrival of the kit is highly recommended to avoid mistakes.

This DNA Kit has been designed for in vitro diagnostic use.

The approximate processing time after proteinase K digestion is 45 minutes.

Kit contents

	20 extractions kit	50 extractions kit
Proteinase K	0.65 ml	1.6 ml
Solution A	2.1 ml	5.2 ml
Solution B	4.5 ml	10.5 ml
Solution C	1.7 ml	4.2 ml
Solution D	12.5 ml	32 ml (2 x 16 ml)
Solution E	12 ml	25.5 ml
Solution F	1.5 ml	3 ml
Microtubes (1.5 ml)	40	100

Equipment and materials required but not supplied

The following equipment and materials are required:

Pipets and pipet tips (to prevent cross-contamination, pipet tips with aerosol barriers are strongly recommended)

Disposable gloves

Heating block for lysis of samples at 56°C

Microcentrifuge

Vortexer

Technical considerations

This Kit was specially designed with the aim of obtaining, in a reproducible manner, circulating DNA from as little as 0.5 ml serum or plasma samples, for subsequent uses in genetic or epigenetic analysis procedures. Other cell free body fluids such as urine can also be used to obtain circulating DNA with this kit.

Smaller sample volumes can be used, reducing solutions volumes in the same ratio. For larger volumes, divide into 0.5 ml aliquots and proceed to DNA purification separately. Purified DNA from the same sample aliquots can be mixed at the end of the procedure, but this step increases final volume.

It is important to notice that circulating DNA is often present in very low concentrations (1-100 ng/ml in healthy people) and as short fragments, <1000 bp. The concentration also varies considerably among different individuals. However, purified DNA using this kit, has been successfully analyzed in different applications such as genotyping experiments and PCR amplifications.

Identification of the substance/mixture

SOLUTION A

Non Hazardous

SOLUTION B:

Non Hazardous

SOLUTION C: Contains sodium acetate solution

1. HAZARDS IDENTIFICATION

a. Classification of the substance or mixture

- Classification according to Regulation (EC) No 1272/2008

Eye irritation (Category 2)

Not a hazardous substance or mixture according to EC-directives 67/548/EEC or 1999/45/EC.

b. Label elements



2. HANDLING

a. Precautions for safe handling

Avoid contact with skin and eyes. Avoid inhalation of vapour or mist.

Normal measures for preventive fire protection.

3. ACCIDENTAL RELEASE MEASURES

a. Personal precautions, protective equipment and emergency procedures

Use personal protective equipment. Avoid breathing vapors, mist or gas.

Ensure adequate ventilation.

b. Environmental precautions

Do not let product enter drains.

c. Methods and materials for containment and cleaning up

Soak up with inert absorbent material and dispose of as hazardous waste. Keep in suitable, closed containers for disposal.

SOLUTION D: Contains 2-Propanol

1. HAZARDS IDENTIFICATION

a. Classification of the substance or mixture

- Classification according to Regulation (EC) No 1272/2008 [EU-GHS/CLP]

Flammable liquids (Category 2)

Eye irritation (Category 2)

Specific target organ toxicity - single exposure (Category 3)

- Classification according to EU Directives 67/548/EEC or 1999/45/EC
Highly flammable. Irritating to eyes. Vapours may cause drowsiness and dizziness.

b. Label elements



2. HANDLING

a. Precautions for safe handling

Avoid contact with skin and eyes. Avoid inhalation of vapour or mist. Keep away from sources of ignition - No smoking. Take measures to prevent the build up of electrostatic charge.

b. Skin protection

Handle with gloves. Gloves must be inspected prior to use.

Use proper glove removal technique (without touching glove's outer surface) to avoid skin contact with this product. Dispose of contaminated gloves after use in accordance with applicable laws and good laboratory practices.

Wash and dry hands.

3. ACCIDENTAL RELEASE MEASURES

a. Personal precautions, protective equipment and emergency procedures

Use personal protective equipment. Avoid breathing vapors, mist or gas.

Ensure adequate ventilation. Remove all sources of ignition.

Evacuate personnel to safe areas. Beware of vapours accumulating to form explosive concentrations.

Vapours can accumulate in low areas.

b. Environmental precautions

Prevent further leakage or spillage if safe to do so. Do not let product enter drains.

SOLUTION E

Non Hazardous

SOLUTION F

Non Hazardous

Storage

Keep container tightly closed in a well-ventilated place.

All buffers can be stored at room temperature (15-25°C). If temperature exceeds 25°C, is recommended to storage at least solution A, B and C, in a cool place (2-8°C).

Proteinase K is also stable at room temperature but storage at 2-8°C is recommended to prolong its lifetime.

Remember, if stored at (2-8°C) solutions should be homogenized and equilibrated to room temperature before use (especially solution A to dissolve white precipitated formed).

All buffers are stable for at least 1 year when stored at room temperature (15-25°C) but only until the kit expiration date (see box label). If stored at 2-8°C the kit is stable for more than 1 year and quality does not decrease.

Procedure recommendations

- Samples

It is important to process blood samples appropriately in order to minimize contamination by cellular DNA in plasma samples. **An additional high-speed spin in a bench microcentrifuge is recommended prior to storage and/or DNA extraction.** For urine samples this step is also recommended in order to avoid the presence of epithelial cells that could contaminate the sample.

The DNA extraction procedure can be performed from fresh or frozen serum/plasma or urine samples.

- Solutions

Gently homogenize every solution before use. White precipitates can appear in solution A when store at 2-8°C or even at room temperature. Homogenization at 55°C is recommended before use.

DNA Quantity

Concentration

Circulating DNA in cell free body fluids is present in very low concentrations and are therefore difficult to determine with spectrophotometers. DNA quantity in the purified sample must be determined by fluorometric based method in order to get accurate and reliable concentration readings (e.g. PicoGreen® based methods).