

Instrucciones de uso

PSP® Spin Stool DNA Basic Kit



REF 1038120200
1038120300



50 preparaciones
250 preparaciones



Invitek Molecular GmbH
Robert-Rössle-Straße 10
13125 Berlin
Alemania

INVITEK
Molecular

Notas importantes

Le agradecemos que haya comprado el **PSP® Spin Stool DNA Basic Kit** de Invitek Molecular.

En combinación con el **Stool DNA Stabilizer** o el **Stool Collection Tubes with DNA Stabilizer**, este producto se utiliza para el aislamiento manual de ADN de microorganismos y huéspedes a partir de muestras de heces usando la tecnología de columna de centrifugación.

¡ADVERTENCIA! Una manipulación inadecuada y el uso con fines distintos del previsto pueden causar daños y situaciones peligrosas. Por este motivo, le rogamos que lea detenidamente estas instrucciones de uso y que las respete estrictamente. Téngalas siempre a mano. Cumpla las instrucciones de seguridad para evitar daños personales.

Todas las versiones de las instrucciones de uso se pueden descargar desde nuestro sitio web o se pueden solicitar a través de: www.invitek-molecular.com

Contacto:

Invitek Molecular GmbH

Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlín, Alemania

+ 49 30 9489 2908

www.invitek-molecular.com

Soporte técnico:

techsupport@invitek-molecular.com

© 2022 Invitek Molecular. Todos los derechos reservados.

Este kit es conforme con el REGLAMENTO (UE) 2017/746 sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Sin embargo, no puede usarse para el diagnóstico in vitro en países donde no se reconozca el REGLAMENTO (UE) 2017/746 sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro.

Marcas comerciales: Invisorb®, PSP®, InviMag® y Eppendorf®. Todas las marcas registradas, marcas comerciales, etc. que se usan en este documento están protegidas por la ley, aunque no estén identificadas explícitamente como tales.

InviGenius®, InviMag®, Invisorb®, Invitek®, InviTrap®, MSB®, PSP® y RTP® son marcas comerciales registradas de Invitek Molecular GmbH.

Tabla de contenido

1.	Instrucciones de seguridad.....	3
2.	Información del producto.....	4
2.1	Contenido del kit	4
2.2	Reactivos y equipamiento que debe proporcionar el usuario.....	5
2.3	Almacenamiento, apariencia y caducidad	6
2.4	Uso previsto	6
2.5	Especificaciones e información del producto.....	7
2.6	Principio y procedimiento	7
3.	Extracción de ácido nucleico con el PSP® Spin Stool DNA Basic Kit.....	8
3.1	Antes de iniciar un protocolo	8
3.2	Toma de muestras y almacenamiento del material inicial.....	9
3.3	Preparación de los materiales iniciales	9
3.4	Protocolo resumido del PSP® Spin Stool DNA Basic Kit.....	10
3.5	Protocolo 1: Aislamiento de ADN de muestras frescas o congeladas de heces	11
3.6	Protocolo 2: Aislamiento de ADN de muestras estabilizadas de heces	13
4.	Apéndice	15
4.1	Solución de problemas.....	15
4.2	Garantía	16
4.3	Símbolos utilizados en el producto y las etiquetas	16
4.4	Otros documentos e información complementaria.....	17
4.5	Información para pedidos.....	17

1. Instrucciones de seguridad

Asegúrese de que todas las personas que usen este producto hayan sido instruidas sobre la seguridad general en laboratorios y conozcan la información de seguridad que contiene el presente documento.

- Al manipular sustancias químicas se debe usar siempre vestimenta de protección, guantes desechables y gafas de seguridad.
- Cambie siempre la punta de las pipetas para transferir distintos líquidos. Se recomienda el uso de puntas de pipeta de barrera para aerosoles para evitar la contaminación cruzada.
- No reutilice los productos consumibles.
- Deseche los guantes si resultan contaminados.
- No combine componentes de distintos kits, salvo que tengan el mismo número de lote.
- Evite la contaminación microbiana de los reactivos del kit.
- Para minimizar el riesgo de infecciones con materiales potencialmente infecciosos, se recomienda trabajar con un flujo de aire laminar hasta que se hayan lisado las muestras.

Antes de manipular sustancias químicas, lea todas las fichas de datos de seguridad (FDS) aplicables y asegúrese de que las comprende. Puede encontrarlas en Internet, en www.invitek-molecular.com.

Deseche los residuos del kit y los fluidos residuales de conformidad con la reglamentación de su país (consulte la FDS). Invitek Molecular no ha verificado la presencia de materiales infecciosos residuales en los residuos líquidos que genera el kit. Si bien es muy improbable que los residuos líquidos se contaminen con materiales infecciosos residuales, no puede excluirse por completo. Por ese motivo, los residuos líquidos deben considerarse infecciosos y deben manipularse y desecharse de conformidad con el reglamento local en materia de seguridad.

A continuación se indican las frases de riesgo y seguridad de la Comunidad Europea en relación con los componentes del **PSP® Spin Stool DNA Basic Kit** al que se aplican:

Stool DNA Stabilizer



Advertencia

H319 –H412.-P280- P305-351-338-P273

Proteinase K



Peligro

H315-319-334-335 P280-P305-P351-P338

Wash Buffer I



Advertencia

H302-H412-P280-P305-P351-P338-P273-EUH032

H302: Nocivo en caso de ingestión.

H315: Provoca irritación cutánea.

H319: Puede provocar una reacción alérgica en la piel.

H334: Provoca irritación ocular grave.

H335: Puede provocar síntomas de alergia o asma o dificultades respiratorias en caso de inhalación.

H412: Puede irritar las vías respiratorias.

P273: Evitar su liberación al medio ambiente.

P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

P305+P351+P338: EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto cuando estén presentes y pueda hacerse con facilidad. Proseguir con el lavado.

EUH032: En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos.

Puede solicitar información médica de emergencia las 24 horas a través de infotrac:

www.infotrac.net:

Fuera de EE. UU.: 1 – 352 – 323 – 3500

En EE. UU.: 1 – 800 – 535 – 5053

2. Información del producto

2.1 Contenido del kit

El **PSP® Spin Stool DNA Basic Kit** no contiene tampón para la lisis de la muestra. Para la lisis de la muestra hay que combinar el **PSP® Spin Stool DNA Basic Kit** con el **Stool DNA Stabilizer** o el **Stool Collection Tubes with DNA Stabilizer** (consulte el capítulo 2.2 o 4.5 sobre la información para pedidos). El **Stool DNA Stabilizer** tiene la función de un tampón de lisis.

El **Stool DNA Stabilizer** (frasco de 180 ml) es para el aislamiento directo de muestras frescas o congeladas de heces.

Los **Stool Collection Tubes with DNA Stabilizer** pueden usarse para gestionar toda la muestra y permiten recoger la muestra, transportarla, estabilizarla y almacenarla durante un máximo de tres meses a temperatura ambiente (TA).

	50 purificaciones	250 purificaciones
Ref. catálogo	1038120200	1038120300
InviAdsorb	50 tubos	5 x 50 tubos
Zirconia Beads II (Perlas de zirconio II)	2 viales	8 viales
Proteinase K (proteínasa K)	1 vial de 1,5 ml solución de trabajo	5 viales de 5 x 1,5 ml solución de trabajo
Binding Buffer A (tampón de unión A)	9 ml/frasco (volumen final 30 ml)	36 ml/frasco (volumen final 120 ml)
Wash Buffer I (tampón de lavado I)	30 ml/frasco (volumen final 60 ml)	80 ml/frasco (volumen final 160 ml)
Wash Buffer II (tampón de lavado II)	18 ml/frasco (volumen final 60 ml)	2 x 45 ml/frasco (volumen final 2 x 150 ml)
Elution Buffer (tampón de elución)	15 ml/frasco	60 ml/frasco
2.0 ml Safe-Lock-Tubes (tubos Safe-Lock de 2,0 ml)	2 x 50 tubos	2 x 250 tubos
RTA Spin Filter Set (juego de filtros de centrifugación RTA)	50 juegos	5 x 50 juegos
RTA Receiver Tubes (tubos receptores RTA)	2 x 50 tubos	10 x 50 tubos
1.5 ml Receiver Tubes (tubos receptores de 1,5 ml)	2 x 50 tubos	10 x 50 tubos
Short protocol	1 folleto	1 folleto

2.2 Reactivos y equipamiento que debe proporcionar el usuario

Equipo de laboratorio:

- Microcentrífuga (*todos los protocolos se han validado con una centrífuga 5415 D Eppendorf*)
- Opcional: centrífuga para 15 o 50 ml
- Agitador térmico (37 °C - 95 °C)
- Probeta graduada (250 ml)
- Guantes desechables
- Pipeta y puntas para pipeta
- Mezclador de vórtice
- Tubos de reacción (1,5 ml, 2,0 ml)

Para la lisis de la muestra:

Producto	Tamaño del paquete	Ref. catálogo
Stool DNA Stabilizer (estabilizador de ADN de heces)*)	180 ml	1038111100
Stool Collection Tube with DNA Stabilizer (tubo de recogida de heces con estabilizador de ADN)	50 tubos	1038111200
Stool Collection Tube with DNA Stabilizer (tubo de recogida de heces con estabilizador de ADN)	250 tubos	1038111300

***) Para 50 reacciones basta con un frasco de Stool DNA Stabilizer, mientras que para 250 reacciones se necesitan dos frascos.**

Líquidos y disolventes:

- 96 - 100 % etanol (no desnaturalizado)
- Isopropanol*

*El kit se ha validado con propan-2-ol; Rotipuran® > 99,7 %, p.a., ACS, ISO (ref. 6752) de Carl Roth

*** Posibles proveedores de isopropanol:**

Carl Roth

Propan-2-ol
Rotipuran® > 99,7 %, p.a., ACS, ISO
Ref. 6752

Applichem

Propan-2-ol para biología molecular
Ref. A3928

Sigma

Propan-2-ol
Ref. 59304-1L-F

2.3 Almacenamiento, apariencia y caducidad

Caducidad: Todos los tampones y componentes del kit deben almacenarse a temperatura ambiente, respetando el plazo de caducidad indicado en la etiqueta del envase exterior del kit.

Una vez abiertos, tanto los componentes individuales del kit como los preparados antes del primer uso deben usarse antes de 3 meses.

Antes de cada uso, asegúrese de que todos los componentes estén a temperatura ambiente. Si en las soluciones se forman precipitados como consecuencia de la temperatura, disuélvalos con mucho cuidado aplicando calor (hasta 30 °C).

La temperatura ambiente (TA) se define como el intervalo de temperatura entre 15 y 30 °C.

Wash Buffer I y Wash Buffer II: después de añadir etanol, deben cerrarse herméticamente y guardarse a temperatura ambiente.

Binding Buffer A: después de añadir isopropanol, debe cerrarse herméticamente y guardarse a temperatura ambiente.

Proteinase K: una vez disuelta en DNase/RNase free water, la Proteinase K se puede almacenar a 2-8 °C durante un plazo de hasta dos meses. Para almacenar durante más tiempo, se debe conservar a -20 °C. Solo se puede congelar y descongelar una vez.

Stool DNA Stabilizer/Stool Collection Tubes with DNA Stabilizer (se debe encargar por separado): si el DNA Stabilizer contiene precipitados relacionados con la temperatura, disuélvalos con cuidado mediante calentamiento en baño de agua a 30 °C, agitando ocasionalmente durante el proceso de disolución.

2.4 Uso previsto

El **PSP® Spin Stool DNA Basic Kit** es un kit de extracción de ácido nucleico que utiliza la tecnología de columna de centrifugación para el aislamiento y la purificación de ADN bacteriano y ADN del huésped a partir de muestras de heces humanas.

El **PSP® Spin Stool DNA Basic Kit** está diseñado para el uso con muestras frescas, congeladas o estabilizadas de heces humanas. Para las muestras frescas o congeladas de heces, el producto debe combinarse con **Stool DNA Stabilizer**. Para la gestión completa de la muestra (toma de la muestra y transporte) y la estabilización a temperatura ambiente, el producto debe combinarse con **Stool Collection Tubes with DNA Stabilizer**. La incorporación de Stool DNA Stabilizer al **PSP® Spin Stool DNA Basic Kit** es fundamental para la lisis de la muestra. El **Stool DNA Stabilizer** y el **Stool Collection Tubes with DNA Stabilizer** deben adquirirse por separado.

El producto está destinado exclusivamente a personal profesional, como técnicos de laboratorio, personal médico y biólogos formados en técnicas de biología molecular y procedimientos de diagnóstico *in vitro*.

2.5 Especificaciones e información del producto

Material inicial	Rendimiento	Calidad	Tiempo
Muestras frescas o congeladas de heces: máx. 200 mg	Hasta 50 µg, según la muestra (almacenamiento y origen)	A ₂₆₀ : A ₂₈₀ 1,4 – 1,8	aprox. 45 min (lisis incluida)
Muestras estabilizadas de heces (Stool Collection Tubes with DNA Stabilizer): 1,4 ml			

El rendimiento y la calidad del ADN purificado de heces dependen del contenido bacteriano, el origen de la muestra, el transporte, el almacenamiento y la edad. El rendimiento y la calidad también pueden verse afectados por el estado de salud del donante; en especial, la calidad de los ácidos nucleicos purificados puede disminuir con ciertas enfermedades y medicamentos.

Aplicaciones posteriores:

El rendimiento y la calidad de los ácidos nucleicos aislados suelen ser adecuados para numerosas aplicaciones de diagnóstico molecular, como técnicas PCR, análisis de microbiomas (NGS) y métodos de hibridación. Las aplicaciones posteriores deben realizarse siguiendo las especificaciones del fabricante relevante.

2.6 Principio y procedimiento

1. Muestras lisadas

Las muestras de heces se lisan en Stool DNA Stabilizer en condiciones desnaturalizadas y con distintos niveles de temperatura específicos para el ácido nucleico objetivo. Las células humanas para el aislamiento del ADN del huésped se lisan a temperatura ambiente, mientras que las células bacterianas deben incubarse a mayores temperaturas. Para la lisis de células bacterianas, se añaden perlas de zirconio para aumentar la eficiencia de la lisis.

2. Eliminación de los inhibidores de PCR y la digestión de proteínas

Tras la lisis, las sustancias que degradan el ADN y los inhibidores de PCR presentes en las heces se absorben a la matriz del InviAdsorb. El InviAdsorb está en tubos Safe-Lock prellenados en los cuales debe colocarse el lisado. La contaminación unida y los restos celulares se pelletizan por centrifugación. El sobrenadante contiene el ADN prepurificado. Se añade Proteinase K al sobrenadante para digerir y degradar las proteínas a alta temperatura.

3. Unión de ácidos nucleicos

Mediante la adición de Binding Buffer A al lisado se ajustan las condiciones óptimas de unión. Luego, cada lisado se aplica a un RTA Spin Filter y los ácidos nucleicos se absorben a la membrana.

4. Lavado para eliminar la contaminación residual

La contaminación se lava eficazmente con Wash Buffer I y Wash Buffer II, mientras que los ácidos nucleicos permanecen unidos a la membrana.

5. Elución del ADN

Los ácidos nucleicos se eluyen del RTA Spin Filter usando 100-200 µl de Elution Buffer.

3. Extracción de ácido nucleico con el PSP® Spin Stool DNA Basic Kit

3.1 Antes de iniciar un protocolo

La primera vez que utilice el kit, asegúrese de que se preparen todos los tampones y reactivos siguiendo las indicaciones:

Preparación de los tampones antes del primer uso: 50 preparaciones
Binding Buffer A: Añada 21 ml de isopropanol al 99,7 % (para biología molecular) al frasco y mezcle por agitación intensamente durante 1 minuto. Mezcle por inversión varias veces justo antes del uso. Mantenga el frasco cerrado herméticamente en todo momento.
Proteinase K: Resuspenda la Proteinase K liofilizada incorporando 1,5 ml de DNase/RNase free water al vial y mezcle bien hasta que se diluya por completo.
Wash Buffer I: Añada 30 ml de etanol al 96-100 % al frasco. Mezcle bien, manteniendo el frasco cerrado herméticamente en todo momento.
Wash Buffer II: Añada 42 ml de etanol al 96-100 % al frasco. Mezcle bien, manteniendo el frasco cerrado herméticamente en todo momento.
Preparación de los tampones antes del primer uso: 250 preparaciones
Binding Buffer A: Añada 84 ml de isopropanol al 99,7 % (para biología molecular) al frasco y mezcle por agitación intensamente durante 1 minuto. Mezcle por inversión varias veces justo antes del uso. Mantenga el frasco cerrado herméticamente en todo momento.
Proteinase K: Resuspenda la Proteinase K liofilizada incorporando 1,5 ml de DNase/RNase free water a cada vial y mezcle bien hasta que se diluya por completo.
Wash Buffer I: Añada 80 ml de etanol al 96-100 % al frasco. Mezcle bien, manteniendo el frasco cerrado herméticamente en todo momento.
Wash Buffer II: Añada 105 ml de etanol al 96-100 % al frasco. Mezcle bien, manteniendo el frasco cerrado herméticamente en todo momento.

- Ajuste el agitador térmico a 70 °C.
- Ajuste el agitador térmico/los bloques de calentamiento a 70 °C y 95 °C
- Caliente la cantidad necesaria de **Elution Buffer** a 70 °C (se necesitan 100-200 µl de **Elution Buffer** por muestra).
- Determine el número de reacciones necesarias, incluidos los controles, y etiquete el número necesario de RTA Spin Filters (tapa) y el número necesario de 1.5 ml Receiver Tubes (por muestra: se necesita 1 Receiver Tube).

3.2 Toma de muestras y almacenamiento del material inicial

Para maximizar el rendimiento y la reproducibilidad, es fundamental que las muestras se almacenen correctamente. El rendimiento puede variar en función de factores como la situación nutricional del donante, la edad y el tipo de la muestra, el transporte y el almacenamiento.

Debe evitarse que las muestras se sometan a varios ciclos de congelación y descongelación para evitar la degradación del ácido nucleico. En general, las muestras frescas son las que dan mejores resultados. Se recomienda utilizar asesoramiento técnico, como las normas CEN/TS e ISO sobre el proceso de análisis previo para diagnóstico molecular según el reglamento europeo de diagnóstico in vitro (IVDR), como señala G. Dagher, et al. (<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.05.002>).

Muestras frescas de heces: Las muestras contienen ADNAsas que pueden causar la degradación rápida del ADN. Las muestras frescas de heces se pueden almacenar durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Debe añadirse Stool DNA Stabilizer a la muestra lo antes posible. De lo contrario, las muestras deben conservarse congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Muestras estabilizadas de heces: Las muestras de heces se pueden estabilizar con los Stool Collection Tubes with DNA Stabilizer de Invitek Molecular (consulte la información para pedidos), que permiten tomar las muestras, almacenarlas y transportarlas. Para la toma de muestras, se recoge 1 g de heces con la cuchara integrada que hay en la tapa del tubo de recogida. Tras recoger la muestra, el tubo de recogida debe cerrarse firmemente. La muestra debe mezclarse bien por agitación o vórtice para homogeneizarla con el Stool DNA Stabilizer en el tubo. Las muestras se pueden conservar en Stool Collection Tubes with DNA Stabilizer durante un máximo de 3 meses a temperatura ambiente. Los períodos de almacenamiento inferiores a 3 meses no afectan a la calidad o la cantidad del ADN. Para el almacenamiento a largo plazo, las muestras se pueden congelar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ o $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se recomienda separar las muestras en partes alícuotas antes de congelarlas.

3.3 Preparación de los materiales iniciales

Muestras frescas de heces, líquidas: si la muestra es líquida, pipetee 200 μl en un 2.0 ml Safe-Lock-Tube. Corte el extremo de la punta de la pipeta para facilitar el pipeteo. Luego, añada el Stool DNA Stabilizer según se explica en el protocolo de extracción.

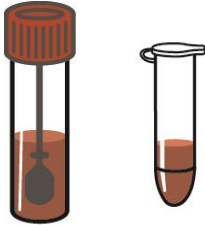
Muestras congeladas de heces: utilizando un escalpelo o una espátula, rasque pequeñas cantidades de heces e introdúzcalas en un 2.0 ml Safe-Lock-Tube en hielo. Asegúrese de que las muestras no se descongelen hasta que se añada el Stool DNA Stabilizer. De lo contrario, podría degradarse el ADN de la muestra.

Las muestras en Stool Stabilizer se pueden descongelar directamente calentándolas con cuidado. Evite congelar y descongelar varias veces para que no se fragmente el ADN. Para ello, separe las muestras en partes alícuotas.

3.4 Protocolo resumido del PSP® Spin Stool DNA Basic Kit

Muestras lisadas

1. **Muestras frescas/congeladas de heces:** Introduzca 200 mg de muestra de heces (fresca o congelada) en un 2.0 ml Safe-Lock-Tube, añada 1.2 ml de Stool DNA Stabilizer y mezcle por vórtice intensamente durante 1 min. **Muestras estabilizadas:** Transfiera 1,4 ml de muestra a un 2.0 ml Safe-Lock-Tube desde el Stool Collection Tube with DNA Stabilizer si estaba almacenada o directamente tras recogerla.



a) Aislamiento del ADN del huésped

Incube a temperatura ambiente durante 10 min mientras agita continuamente a 900 rpm

Centrifugue a 11 000 x g durante 1 min

b) Aislamiento de ADN bacteriano

Incube a 95 °C durante 10 min mientras agita continuamente a 900 rpm.

Añada 5 **Zirconia Beads II** al homogeneizado y mezcle por vórtice durante 2 min

Centrifugue a 11 000 x g durante 1 min

c) Aislamiento de ADN de bacterias difíciles de lisar

Incube a 95 °C durante 10 min mientras agita continuamente a 900 rpm

Incube en hielo durante 3 min

Añada 5 **Zirconia Beads II** e incube a 95 °C durante 3 min. Mezcle por vórtice la muestra durante 2 min y centrifugue a 11 000 x g durante 1 min



Eliminación de los inhibidores de PCR y la digestión de proteínas

2. Transfiera el sobrenadante a un **InviAdsorb-Tube** y mezcle por vórtice intensamente durante 15 s

Incube a temperatura ambiente durante 1 min. Centrifugue a máxima velocidad durante 3 min.

3. Transfiera la totalidad del sobrenadante a un nuevo 1.5 ml Receiver Tube y deseche el pellet con el InviAdsorb. Centrifugue a máxima velocidad durante 3 min.

4. Transfiera 25 µl de **Proteinase K** a un nuevo 2.0 ml Safe-Lock-Tube, pipetee 400 µl (o 800 µl para las muestras estabilizadas) del sobrenadante del paso 3 en el tubo Safe-Lock que contiene la **Proteinase K** y mezcle brevemente por vórtice. Incube a 70 °C durante 10 min mientras agita continuamente a 900 rpm.



Unión del ADN genómico

5. Añada 200 µl de **Binding Buffer A** (o 400 µl de **Binding Buffer A** para las muestras estabilizadas) al lisado y mezcle brevemente por vórtice o absorbiendo y expulsando varias veces con una pipeta

Agarre un juego de RTA Spin Filters. Transfiera toda la mezcla (en dos pasos para las muestras estabilizadas) al RTA Spin Filter.

Cierre el RTA Spin Filter e incube a temperatura ambiente durante 1 min.

Centrifugue a 11 000 x g durante 2 min. Deseche el filtrado y coloque el RTA Spin Filter en un nuevo 2.0 ml RTA Receiver Tube.

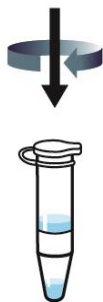


Lavado para eliminar la contaminación residual

6. Añada 500 µl de **Wash Buffer I** y centrifugue a 11 000 x g durante 1 min. Deseche el filtrado y coloque el RTA Spin Filter en un nuevo 2.0 ml RTA Receiver Tube

7. Añada 700 µl de **Wash Buffer II** y centrifugue a 11 000 x g durante 1 min. Deseche el filtrado y **vuelva a colocar** el RTA Spin Filter en el 2.0 ml RTA Receiver Tube

8. Centrifugue a máxima velocidad durante 4 min para eliminar el etanol por completo. Deseche el RTA Receiver Tube



Elución del ADN

9. Coloque el RTA Spin Filter en un 1.5 ml Receiver Tube. Añada 100-200 µl de **Elution Buffer** precalentado (70 °C)

Incube a temperatura ambiente durante 1 min

Centrifugue a 11 000 x g durante 1 min para eluir el ADN. Deseche el RTA Spin Filter

3.5 Protocolo 1: Aislamiento de ADN de muestras frescas o congeladas de heces

1. Introduzca 200 mg de muestra de heces (fresca o congelada) en un 2.0 ml Safe-Lock-Tube y añada 1.2 ml de **Stool DNA Stabilizer** a cada muestra. Mezcle por vórtice intensamente durante 1 min. Utilice la misma cantidad de **Stool DNA Stabilizer** también para los volúmenes de muestras más pequeños.
 - a) **Aislamiento del ADN del huésped**
Incube a temperatura ambiente durante 10 min mientras agita continuamente a 900 rpm.
Centrifugue a 11 000 x g durante 1 min para pelletizar las partículas sólidas de heces.
 - b) **Aislamiento de ADN bacteriano**
Incube a 95 °C durante 10 min mientras agita continuamente a 900 rpm.
Añada 5 **Zirconia Beads II** al homogeneizado y mezcle por vórtice durante 2 min.
Centrifugue a 11 000 x g durante 1 min para pelletizar las partículas sólidas de heces y las perlas.
 - c) **Aislamiento de ADN de bacterias difíciles de lisar**
Incube a 95 °C durante 10 min mientras agita continuamente a 900 rpm.
Incube en hielo durante 3 min.
Añada 5 **Zirconia Beads II** al homogeneizado e incube a 95 °C durante 3 min.
Mezcle por vórtice la muestra durante 2 min y centrifugue a 11 000 x g durante 1 min para pelletizar las partículas sólidas de heces y las perlas.
2. Transfiera el sobrenadante a un **InviAdsorb-Tube** y mezcle por vórtice intensamente durante 15 s.
Incube a temperatura ambiente durante 1 min.
Centrifugue a máxima velocidad durante 3 min.
3. Transfiera la totalidad del sobrenadante a un nuevo 1.5 ml Receiver Tube y deseche el pellet con el InviAdsorb.
Centrifugue a máxima velocidad durante 3 min.
4. Transfiera 25 µl de **Proteinase K** a un nuevo 2.0 ml Safe-Lock-Tube, pipetee 400 µl del sobrenadante del paso 3 en el tubo Safe-Lock que contiene la **Proteinase K** y mezcle brevemente por vórtice.
Incube a 70 °C durante 10 min mientras agita continuamente a 900 rpm.
5. Añada 200 µl de **Binding Buffer A** al lisado y mezcle brevemente por vórtice o absorbiendo y expulsando varias veces con una pipeta.
Agarre el juego de RTA Spin Filters. Transfiera toda la mezcla al RTA Spin Filter.
Cierre el RTA Spin Filter e incube a temperatura ambiente durante 1 min.
Centrifugue a 11 000 x g durante 2 min.
Deseche el filtrado y coloque el RTA Spin Filter en un nuevo 2.0 ml RTA Receiver Tube.
6. Añada 500 µl de **Wash Buffer I** y centrifugue a 11 000 x g durante 1 min.
Deseche el filtrado y coloque el RTA Spin Filter en un nuevo 2.0 ml RTA Receiver Tube.
7. Añada 700 µl de **Wash Buffer II** y centrifugue a 11 000 x g durante 1 min.
Deseche el filtrado y **vuelva a colocar** el RTA Spin Filter en el 2.0 ml RTA Receiver Tube.

8. Centrifugue a máxima velocidad durante 4 min para eliminar el etanol por completo. Deseche el RTA Receiver Tube.
9. Coloque el RTA Spin Filter en un 1.5 ml Receiver Tube. Añada 100-200 µl de **Elution Buffer** precalentado (70 °C).
Incube a temperatura ambiente durante 1 min.
Centrifugue a 11 000 x g durante 1 min para eluir el ADN. Deseche el RTA Spin Filter.

Nota: *El ADN también se puede eluir en un menor volumen de Elution Buffer (según el rendimiento previsto). El volumen mínimo para la elución es de 50 µl. Tenga en cuenta que el uso de un volumen de elución bajo puede reducir el rendimiento máximo. Si se prevé una gran cantidad de ADN, también se puede incrementar el volumen de elución.*

Nota: *Para el almacenamiento a largo plazo, se recomienda conservar el ADN eluido a – 20 °C.*

3.6 Protocolo 2: Aislamiento de ADN de muestras estabilizadas de heces

1. Recoja la muestra con el **Stool Collection Tube with DNA Stabilizer**.
Transfiera 1,4 ml de la muestra bien homogeneizada de heces a un 2.0 ml Safe-Lock-Tube desde el tubo de recogida si estaba almacenada o directamente tras recogerla.
 - a) **Aislamiento del ADN del huésped**
Centrifugue a 11 000 x g durante 1 min para pelletizar las partículas sólidas de heces.
 - b) **Aislamiento de ADN bacteriano**
Incube a 95 °C durante 10 min mientras agita continuamente a 900 rpm.
Añada 5 **Zirconia Beads II** al homogeneizado y mezcle por vórtice durante 2 min.
Centrifugue a 11 000 x g durante 1 min para pelletizar las partículas sólidas de heces y las perlas.
 - c) **Aislamiento de ADN de bacterias difíciles de lisar**
Incube a 95 °C durante 10 min mientras agita continuamente a 900 rpm.
Incube en hielo durante 3 min.
Añada 5 **Zirconia Beads II** al homogeneizado
Incube a 95 °C durante 3 min.
Mezcle por vórtice la muestra durante 2 min y centrifugue a 11 000 x g durante 1 min para pelletizar las partículas sólidas de heces y las perlas.
2. Transfiera el sobrenadante a un **InviAdsorb-Tube** y mezcle por vórtice intensamente durante 15 s.
Incube a temperatura ambiente durante 1 min.
Centrifugue a máxima velocidad durante 3 min.
3. Transfiera la totalidad del sobrenadante a un nuevo 1.5 ml Receiver Tube y deseche el pellet con el InviAdsorb.
Centrifugue a máxima velocidad durante 3 min.
4. Transfiera 25 µl de **Proteinase K** a un nuevo 2.0 ml Safe-Lock-Tube, pipetee 800 µl del sobrenadante del paso 3 en el tubo Safe-Lock que contiene la **Proteinase K** y mezcle brevemente por vórtice.
Incube a 70 °C durante 10 min mientras agita continuamente a 900 rpm.
5. Añada 400 µl de **Binding Buffer A** al lisado y mezcle brevemente por vórtice o absorbiendo y expulsando varias veces con una pipeta.
Agarre el juego de RTA Spin Filters. Transfiera toda la mezcla al RTA Spin Filter **en dos pasos**.
Cierre el RTA Spin Filter e incube a temperatura ambiente durante 1 min.
Centrifugue a 11 000 x g durante 2 min.
Deseche el filtrado y coloque el RTA Spin Filter en un nuevo 2.0 ml RTA Receiver Tube.
6. Añada 500 µl de **Wash Buffer I** y centrifugue a 11 000 x g durante 1 min.
Deseche el filtrado y coloque el RTA Spin Filter en un nuevo 2.0 ml RTA Receiver Tube.
7. Añada 700 µl de **Wash Buffer II** y centrifugue a 11 000 x g durante 1 min.
Deseche el filtrado y **vuelva a colocar** el RTA Spin Filter en el 2.0 ml RTA Receiver Tube.
8. Centrifugue a máxima velocidad durante 4 min para eliminar el etanol por completo.
Deseche el RTA Receiver Tube.

9. Coloque el RTA Spin Filter en un 1.5 ml Receiver Tube. Añada 100-200 µl de **Elution Buffer** precalentado (70 °C).
Incube a temperatura ambiente durante 1 min.
Centrifugue a 11 000 x g durante 1 min para eluir el ADN. Deseche el RTA Spin Filter.

Nota: *El ADN también se puede eluir en un menor volumen de Elution Buffer (según el rendimiento previsto). El volumen mínimo para la elución es de 50 µl. Tenga en cuenta que el uso de un volumen de elución bajo puede reducir el rendimiento máximo. Si se prevé una gran cantidad de ADN, también se puede incrementar el volumen de elución.*

Nota: *Para el almacenamiento a largo plazo, se recomienda conservar el ADN eluido a – 20 °C.*

4. Apéndice

4.1 Solución de problemas

Problema	Causa posible	Recomendación
RTA Spin Filter obstruido	Lisis celular insuficiente o demasiado material inicial	Incremente el tiempo de la lisis Incremente la velocidad de centrifugación Reduzca la cantidad de material inicial
Contaminación del ARN	El RTA Spin Filter puede purificar pequeñas cantidades de ARN	Añada 20 µl de RNase A (10 mg/ml) e incube durante 10 minutos antes de añadir el Binding Buffer A.
Cantidad reducida de ácidos nucleicos	Lisis celular insuficiente	Incremente el tiempo de la lisis Reduzca la cantidad de material inicial para evitar que se sobrecargue la columna Alargue el tiempo de incubación a 95 °C, utilice Zirconia Beads
	Elución incompleta	Incremente el tiempo de incubación con Elution Buffer precalentado a 5 min Eluya dos veces con 100 µl de Elution Buffer Utilice un volumen más alto de Elution Buffer
	Concentración baja de ácido nucleico en la muestra	Eluya el ADN con un volumen más bajo de Elution Buffer ; no utilice un volumen inferior a 50 µl
	Almacenamiento incorrecto del material inicial	Asegúrese de que el material inicial se almacene correctamente. Evite congelar y descongelar varias veces el material de la muestra.
	Preparación incorrecta de los tampones	Asegúrese de que se añada la cantidad correcta de etanol/isopropanol a los tampones y que todas las soluciones se guarden cerradas herméticamente.
	Homogeneización insuficiente de la muestra y el Stool DNA Stabilizer	Repita el proceso de purificación del ADN con una muestra nueva. Asegúrese de que la muestra no deje de mezclarse en el Stool DNA Stabilizer hasta que esté bien homogeneizada. Utilice Zirconia Beads II y mezcle por vórtice para homogeneizar.
	Mezcla insuficiente de la muestra con Binding Buffer A	Mezcle bien la muestra por pipeteo antes de transferirla a la membrana del RTA Spin Filter.
Ácidos nucleicos degradados/proporción baja de A₂₆₀/A₂₈₀	Eliminación ineficiente de las sustancias inhibitoras por mezclado deficiente con la matriz del InviAdsorb	Repita el proceso de purificación del ADN con una muestra nueva. Asegúrese de que la muestra y la matriz del InviAdsorb no dejen de mezclarse hasta que la muestra esté bien homogeneizada.
	Reducción de la actividad de la Proteinase	Repita el proceso de purificación del ADN con una muestra nueva y con Proteinase K. En los casos difíciles, doble el volumen de Proteinase K.
	El Wash Buffer I y el Wash Buffer II se han usado en orden incorrecto	Asegúrese de que el Wash Buffer I y el Wash Buffer II se usen en el orden correcto establecido en el protocolo.

Mal rendimiento de los ácidos nucleicos en las aplicaciones posteriores (p. ej. NGS o PCR en tiempo real)	Se usa demasiado ADN en la reacción posterior	El ADN extraído puede proceder de distintos organismos presentes en la muestra original de heces (p. ej. humanos, animales, vegetales y bacterianos). Reduzca la cantidad de eluido o diluya la muestra usada en la reacción posterior.
	Lisis celular insuficiente	Vea más arriba

4.2 Garantía

Invitek Molecular garantiza que el kit funciona correctamente para las aplicaciones descritas en este manual y de conformidad con el uso previsto. De acuerdo con el sistema de gestión de calidad de Invitek Molecular certificado por EN ISO 13485, se ha probado el rendimiento de todos los componentes del kit para garantizar la calidad del producto.

Cualquier problema, incidente o defecto se deberá notificar inmediatamente a Invitek Molecular. En cuanto reciba el producto, inspecciónelo para verificar que no falte nada y esté en buenas condiciones. Si se encuentra algún problema, informe inmediatamente a Invitek Molecular por escrito. Cualquier modificación en el kit y los protocolos, así como el uso distinto del previsto, invalidará todas las garantías.

Invitek Molecular se reserva el derecho a cambiar, alterar o modificar cualquier producto en cualquier momento para mejorar su diseño y su rendimiento.

Invitek Molecular ofrece una garantía para sus productos de conformidad con lo expuesto en los Términos y condiciones generales, que se pueden consultar en www.invitek-molecular.com. Si tiene alguna duda, le rogamos que contacte con nosotros a través de techsupport@invitek-molecular.com.

4.3 Símbolos utilizados en el producto y las etiquetas



Fabricante



Número de lote



Identificador único de un dispositivo médico



Número de catálogo



Fecha de caducidad



Consultar las instrucciones de uso



Limitación de temperatura



No reutilizar



Cantidad de preparaciones de muestra



Productos sanitarios para diagnóstico in vitro

4.4 Otros documentos e información complementaria

Visite www.invitek-molecular.com para acceder a lo siguiente:

- Preguntas frecuentes y consejos para solucionar problemas
- Manuales en distintos idiomas
- Fichas de datos de seguridad (FDS)
- Asistencia web
- Vídeos de productos

Si sigue necesitando ayuda tras leer detenidamente las instrucciones de uso y la información adicional, le rogamos que contacte con nosotros a través de techsupport@invitek-molecular.com o que contacte con su distribuidor.

4.5 Información para pedidos

Producto	Tamaño del paquete	Ref. catálogo
PSP® Spin Stool DNA Basic Kit	50 preparaciones	1038120200
PSP® Spin Stool DNA Basic Kit	250 preparaciones	1038120300

Para la lisis de la muestra:

Producto	Tamaño del paquete	Ref. catálogo
Stool DNA Stabilizer (estabilizador de ADN de heces)*)	180 ml	1038111100
Stool Collection Tube with DNA Stabilizer (tubo de recogida de heces con estabilizador de ADN)	50 tubos	1038111200
Stool Collection Tube with DNA Stabilizer (tubo de recogida de heces con estabilizador de ADN)	250 tubos	1038111300

***) Para 50 reacciones basta con un frasco de Stool DNA Stabilizer, mientras que para 250 reacciones se necesitan dos frascos.**

Historial de revisiones

Revisión	Fecha	Descripción
ES-v1-2022	2022-06-15	Nuevo documento



<https://www.invitek-molecular.com/resources/manuals.html>

INVITEK Molecular

Invitek Molecular GmbH
Robert-Rössle-Str. 10
13125 Berlin
Alemania

Teléfono: +49 30 9489 2908
Fax: +49 30 9489 3795
info@invitek-molecular.com

www.invitek-molecular.com

2022-06-15 ES-v1-2022