

DNAREady Lysis Buffer

para extraer el ADN de suspensiones bacterianas como paso previo para su amplificación por PCR

DNAREady es un tampón de lisis de nueva generación, desarrollado específicamente para extraer de forma rápida el ADN de una suspensión bacteriana, como por ejemplo un enriquecimiento en Agua de Peptona Tamponada o en medio Half Fraser, permitiendo su posterior amplificación por PCR a tiempo real. También puede usarse para extraer el ADN de bacterias en muestras ambientales de aguas después de su filtración. Se trata del complemento ideal de los detectores de Microbial (Salmofast®, Listerfast®, Campylofast™ THERMO, Cronofast, Bactoplex, Bactoplex PIF, Legiofast® ENVIRON y Legiofast® SPECIES). El protocolo recomendado para DNAREady está optimizado para obtener el mayor rendimiento con el menor número de pasos posible, tanto en bacterias gramnegativas como grampositivas, eliminando la mayor parte de los inhibidores que puedan estar presentes en las suspensiones bacterianas sin la necesidad de realizar largos y tediosos pasos de purificación en columna.

PROTOCOLO

1. A partir de cultivos bacterianos/ enriquecimientos:

Centrifugar 1 ml del enriquecimiento de la muestra durante 5 minutos a 8.000 g. Descartar el sobrenadante.

En caso de utilizar el kit Bactoplex, centrifugar 0,9 ml del enriquecimiento de Salmonella spp. y 0,9 ml del enriquecimiento de Listeria monocytogenes en el mismo tubo.

En caso de utilizar el kit Cronofast o el kit Bactoplex PIF, es posible mezclar directamente 100 µl de enriquecimiento con 200 µl de DNAREady Lysis Buffer, pipetear o agitar con el vórtex y pasar al paso 3 sin centrifugar.

A partir de muestras ambientales (aguas):

Filtrar el volumen de agua a analizar con membranas de 0,45 µm de policarbonato u otro compuesto capaz de retener proteínas y ADN. Recuperar el filtro, o bien raspar el contenido adherido a su superficie estérilmente (p.e. con un asa o espátula), e introducirlo en un microtubo de centrifuga.

2. Resuspender el pellet o filtro con 200 µl de DNAREady Lysis Buffer. Pipetear o agitar con el vórtex hasta disolver completamente el pellet, o las partículas adheridas al filtro.

En algunos casos puede ser necesario usar un mayor volumen de DNAREady Lysis Buffer para conseguir una correcta disolución del filtro.

3. Incubar 30 minutos a 56°C.

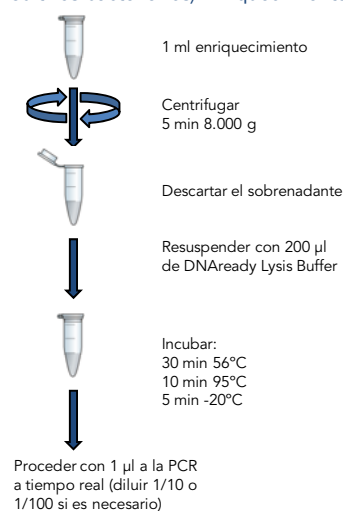
4. Incubar 10 minutos a 95°C

5. Incubar 5 minutos a -20°C.

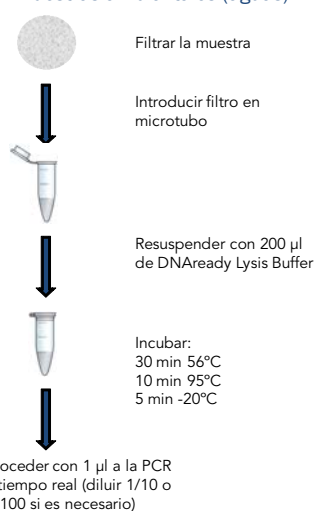
6. Proceder a realizar la PCR a tiempo real con el kit de Microbial deseado usando 1 µl del extracto de ADN resultante *. El DNAREady Lysis Buffer se encargará de inactivar los inhibidores de la PCR permitiendo una correcta reacción de amplificación. Para determinadas muestras, como por ejemplo los enriquecimientos en medio Half Fraser para la detección de *Listeria monocytogenes*, es aconsejable realizar una dilución 1/10 o 1/100 antes de la PCR a tiempo real.

* En caso de enriquecimientos con gran cantidad de sólidos en suspensión es aconsejable no agitar el extracto final para no resuspender partículas, pues podrían contener inhibidores que dificultarían la reacción de amplificación.

Cultivos bacterianos/Enriquecimientos



Muestras ambientales (aguas)



Nota: DNAREady ha sido testado satisfactoriamente en muestras de aguas ambientales y enriquecimientos bacterianos a partir de un gran número de matrices, como por ejemplo, leche, carne picada, lechuga, mojama, platos precocinados, salmón ahumado, helados, mayonesa, huevos, zumos, frutas, pescados y chocolate. No obstante, ciertas matrices pueden ser problemáticas. En caso que no se observe amplificación (ni del detector ni del control interno de amplificación) ni diluyendo la muestra, repetir la extracción de ADN con un método que incluya pasos de purificación en columna o similar. DNAREady no se recomienda para extraer ADN de bacterias sin realizar un paso previo de enriquecimiento/concentración.

RECOMENDACIONES

Como medida preventiva, en caso de enriquecimientos con gran cantidad de sólidos en suspensión, puede ser muy recomendable el uso de bolsas stomacher con filtro a fin de evitar, o al menos reducir, la presencia de partículas que puedan inhibir la PCR.

Las matrices con grasas o con presencia de agentes antimicrobianos suelen ser problemáticas al interferir en el enriquecimiento de las bacterias a detectar. En estas situaciones se puede aumentar el tiempo de crecimiento, realizar un segundo paso de enriquecimiento selectivo o, en el caso específico de matrices con alto contenido en grasa, realizar el enriquecimiento añadiendo Tween 80 al 10%.

CONSERVACIÓN

Conservar a 4°C o a -20°C indistintamente. Evitar congelar/descongelar repetidamente.