

# BIOTOOLS

BIOTOOLS B&M LABS.S.A.

*Fabricado por:*

BIOTOOLS B&M Labs, S.A.  
Valle de Tobalina - 52 - Nave 39  
28021 Madrid  
España

Tel. (34) 91 710 00 74  
Fax (34) 91 505 31 18  
e-mail: [info@biotools.eu](mailto:info@biotools.eu)  
[www.biotools.eu](http://www.biotools.eu)

## **SPEEDTOOLS DNA EXTRACTION KIT**

***Kit para la Extracción y Purificación de ADN Genómico  
de Cultivos Celulares, Sangre, Plasma, Suero y otros  
Fluidos Orgánicos***

### **Instrucciones de Uso (Ref. 21.130M/1/2)**

**ANTES DE USAR ESTE KIT LEA EN SU TOTALIDAD LAS INSTRUCCIONES DE USO  
ESPECIALMENTE SI NO ESTÁ FAMILIARIZADO CON EL PROTOCOLO**

## 1. EXPLICACIÓN DEL KIT

SPEEDTOOLS DNA EXTRACTION KIT permite una rápida y eficiente extracción de ADN genómico de alta calidad procedente de diversas muestras:

- cultivos celulares
- sangre
- suero
- plasma
- otros fluidos orgánicos

En un primer paso la muestra se incuba en una solución que contiene de proteinasa K y agentes caotrópicos que produce la lisis celular y prepara la muestra para posteriores pasos. La adición de etanol en el segundo paso de extracción crea las condiciones necesarias de unión del ADN a las partículas de sílica de la membrana de la columna. El paso de unión del ADN es específico además de reversible. Los contaminantes presentes en la muestra son eliminados mediante sucesivos lavados de la columna con diferentes buffers. Finalmente el ADN es eluido específicamente en un buffer de baja fuerza iónica y pH ligeramente alcalino.

## 2. REACTIVOS INCLUIDOS EN EL KIT

SPEEDTOOLS DNA EXTRACTION KIT			
Reactivo	10 Preps Ref.21.130M	50 Preps Ref.21.131	250 Preps Ref.21.132
Buffer BB3	10 mL	15 mL	5 x 15 mL
Buffer BB5 (concentrado)	6 mL	12 mL	5 x 12 mL
Buffer BBW	6 mL	30 mL	5 x 30 mL
Buffer BBE	13 mL	13 mL	5 x 13 mL
Proteinase K (liofilizada)	6 mg	30 mg	5 x 30 mg
Proteinase Buffer	1.8 mL	1.8 mL	5 x 1.8 mL
Columnas para unión del ADN (más Collection Tubes)	10	50	5 x 50
Collection Tubes	20	100	5 x 100
Protocolo	1	1	5 x 1

## 3. USO PREVISTO

El kit SPEEDTOOLS DNA debe utilizarse con los siguientes tipos de muestras: cultivos celulares, sangre, suero, plasma y otros fluidos orgánicos. También es posible purificar ADN de origen viral ya que el ADN viral se co-purificaría junto al ADN celular. En estos casos se recomienda partir de muestras libres de células como suero o plasma.

El kit puede emplearse en muestras de sangre tratadas con EDTA, citrato, o heparina. Si el material es rico en leucocitos se debe emplear volúmenes menores de muestra o incluso diluir la muestra en solución PBS estéril (disolver 8 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 1.44 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, y 0.24 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en 800 mL H<sub>2</sub>O, ajustar el pH a 7.4 con HCl y añadir H<sub>2</sub>O hasta llegar a un volumen de 1 L).

El kit permite purificar ADN genómico con una alta pureza. El ratio A260/A280 alcanzado es de alrededor de 1.60 - 1.90 y las concentraciones obtenidas se encuentran en el rango de 40–60 ng por µl.

El ADN obtenido es adecuado para posteriores usos como *Southern blotting*, PCR en Tiempo Real o reacciones con enzimas.

**Tabla 1: Características Generales del Kit**

Muestra	
<b>Tamaño de la Muestra</b>	hasta 200 µl
<b>Rendimiento Medio</b>	4-6 µg
<b>Volumen de Elución</b>	100 µl
<b>Capacidad de Unión</b>	60 µg
<b>Tiempo Empleado / Prep</b>	30 min
<b>Tipo de Columna</b>	mini

#### 4. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

**NOTA:** Buffers BB3 y BBW contienen hidrocloreto de guanidina por lo tanto utilice en todo momento guantes y gafas de protección.

Los reactivos incluidos en el kit pueden almacenarse a temperatura ambiente (18-25°C) hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta exterior del producto.

Antes de comenzar cualquier ensayo con **SPEEDTOOLS DNA EXTRACTION KIT** prepare las siguientes soluciones:

##### I. Proteinase K:

- ✓ **Formato 10 preps:** Reconstituya el tubo liofilizado de Proteinase K añadiendo **260 µL** de Proteinase Buffer (PB).
- ✓ **Formato 50 preps:** Reconstituya el tubo liofilizado de Proteinase K añadiendo **1.35 mL** de Proteinase Buffer (PB).

*La solución de Proteinase K es estable a -20°C durante al menos 6 meses.*

##### II. Buffer BB5:

- ✓ **Formato 10 preps:** Añada **24 mL** de etanol (96-100%) al Buffer BB5 concentrado y mezcle el buffer resultante. Realice una marca en la etiqueta del frasco para indicar que el etanol ha sido añadido.
- ✓ **Formato 50 preps:** Añada **48 mL** de etanol (96-100%) al Buffer BB5 concentrado y mezcle el buffer resultante. Realice una marca en la etiqueta del frasco para indicar que el etanol ha sido añadido.

*El Buffer BB5 diluido es estable a temperatura ambiente (18-25°C) durante al menos 12 meses.*

***El Buffer BB3 puede precipitar a bajas temperaturas formando un precipitado blanco. Disuelva los precipitados blanquecinos incubando el frasco a 50-70 °C antes de utilizar.***

#### 5. ELUCIÓN DEL ADN

Utilizando el método de extracción estándar se recupera entre un 70-90% del ADN unido a la membrana; a fin de incrementar el rendimiento y/o la concentración del ADN purificado es posible aplicar diferentes modificaciones sobre este protocolo.

A continuación se detallan diferentes procedimientos de elución del ADN:

- **Para obtener mayor rendimiento:** Realice dos pasos de elución con el volumen indicado en el protocolo individual, de esta forma se podrá recuperar entre un 90-100% del ADN unido a la membrana.
- **Para obtener mayor concentración:** Realice un solo paso de elución utilizando un 60% del volumen de elución indicado en el protocolo individual. La concentración de ADN será un 30% superior a la obtenida con la elución estándar y se recuperará alrededor del 80% del ADN unido a la membrana.
- **Para obtener rendimiento y concentración elevados:** Utilice la mitad del volumen de elución indicado en el protocolo individual, incube 3 minutos y centrifugue. Repita esta operación con la otra mitad del volumen de elución. Con esta modificación podrá recuperarse entre el 85-100% del ADN unido a la membrana y la concentración de ADN será superior a la obtenida con el método de elución convencional.
- **Elución a 70 °C:** Para algunas muestras particulares es posible incrementar el rendimiento precalentando el buffer de elución (BBE) a 70 °C.

**NOTA:** Si se utiliza el Buffer BBE de elución a temperatura ambiente el rendimiento será un 20% inferior que si se utiliza precalentado.

El ADN puede eluirse en buffer Tris-EDTA (TE) a  $\text{pH} \geq 8$ . El buffer TE aumenta la estabilidad del ADN en muestras almacenadas a largo plazo, o en muestras de uso frecuente almacenadas a 4 °C / temperatura ambiente, pues inhibe las ADNasas presentes en la muestra. Sin embargo, la presencia de EDTA (dependiendo de la concentración final) puede interferir en algunas aplicaciones posteriores.

**NOTA:** El Buffer de elución BBE (Tris/HCl 5 mM, pH 8.5) incluido en el kit no contiene EDTA en su composición.

Para posteriores aplicaciones del ADN purificado y obtención de resultados óptimos se recomienda utilizar el buffer de elución BBE incluido en el kit y almacenar las muestras (especialmente por periodos de tiempo prolongados) a -20°C. Los ciclos frecuentes de congelación/descongelación del ADN no suele afectar a la mayoría de las aplicaciones; una de las excepciones suele ser su uso en reacciones de amplificación de fragmentos largos (>10 kb).

La sensibilidad y/o eficiencia de las aplicaciones pueden verse afectadas por el almacenamiento prolongado del ADN a 4 °C o a temperatura ambiente, así como por múltiples ciclos de congelación/descongelación.

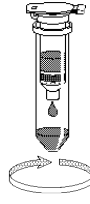
## 6. INSTRUCCIONES DE USO

### A. Protocolo Estándar

#### Antes de comenzar el protocolo:

- Corroborar que el Buffer BB5 y la Proteinase K han sido preparados como se indica en la Sección 4.
- Preparar un incubador o baño de agua a 70 °C.
- Antes de la elución pre-calentar el Buffer BBE a 70°C.

PASO	DESCRIPCIÓN		
1	<p><b>LISIS DE LA MUESTRA</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• En un microtubo de 1.5 mL añada <b>200 µl de muestra</b> (equilibrada a temperatura ambiente) y <b>25 µl</b> de la solución de <b>Proteinase K</b>.</li> </ul> <p><i>Si el volumen de la muestras es inferior a <b>200 µl de sangre, fluido biológicos, etc</b>, completar con solución PBS. Para purificar ADN de origen vírico se recomienda utilizar 200 µl de suero o plasma. Si se utilizan cultivos celulares resuspender <math>5 \times 10^6</math> células en 200 µl de solución PBS.</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Añadir <b>200 µl</b> de <b>Buffer BB3</b> de lisis, mezclar vigorosamente con el <b>vortex</b> (10-20 seg) e incubar a <b>70°C</b> durante <b>10-15 min</b>.</li> </ul> <p><i>Durante el periodo de incubación el lisado adquiere color marrón. Aumente el periodo de incubación (30 min) y vortex un par de veces si la muestra es antigua o presenta dificultad a ser digerida.</i></p>		<p>200 µl MUESTRA + 25 µl PROTEINASE K + 200 µl BUFFER BB3</p> <p>mix 70°C 10-15 min</p>
2	<p><b>ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES PARA LA UNIÓN DEL ADN A LA COLUMNA</b></p> <p>Añada <b>210 µl</b> de <b>etanol</b> (96-100%) al lisado y mezclar bien usando el <b>vortex</b>.</p> <p><i>Antes de adicionar el etanol dejar reposar el lisado a temperatura ambiente.</i></p>		<p>+ 210 µl ETANOL mix</p>
3	<p><b>UNIÓN DEL ADN</b></p> <p>Por cada muestra utilice una <b>columna</b>. Colocar la columna en un Collection tube de 2 mL (incluido en el kit) y <b>cargue el lisado</b>.</p> <p>Centrifugue <b>1 min a 11,000 x g</b>. Si la muestra no pasa en su totalidad por la columna centrifugar a mayor velocidad (&lt; 15,000 x g). <b>Descarte el filtrado</b> y coloque la columna nuevamente en el Collection tube.</p>		<p>Cargar lisado en la columna</p> <p>1 min, 11,000 x g</p>
4	<p><b>LAVADOS DE LA MEMBRANA DE SÍLICA</b></p> <p><b>1<sup>er</sup> Lavado</b> Añada <b>500 µl</b> de <b>Buffer BBW</b>. Centrifugue <b>1 min a 11,000 x g</b>. <b>Descartar el filtrado</b> y coloque la columna nuevamente en el Collection tube.</p> <p><b>2<sup>do</sup> Lavado</b> Añada <b>600 µl</b> de <b>Buffer BB5</b>. Centrifugue <b>1 min a 11,000 x g</b>. <b>Descarte</b> el tubo y <b>el filtrado</b>.</p>		<p>+ 500 µl BUFFER BBW 1 min, 11,000 x g</p> <p>+ 600 µl BUFFER BB5 1 min, 11,000 x g</p>
5	<p><b>SECADO DE LA MEMBRANA DE SÍLICA</b></p> <p>En este paso se elimina el etanol residual. Coloque la columna en un microtubo de 1.5 mL y centrifugue <b>1 min a 11,000 x g</b> para secar la membrana.</p>		<p>1 min, 11,000 x g</p>

<b>6</b>	<p><b>ELUCIÓN DE ADN PURO</b></p> <p>Transferir la columna a un microtubo de 1.5 mL y añada <b>100 µl de Buffer BBE precalentado a (70°C)</b> directamente en la membrana. Incube a temperatura ambiente durante 1 min y centrifugue <b>1 min a 11,000 x g</b>. El eluido contiene el ADN puro extraído de la muestra.</p> <p><i>Para protocolos alternativos de elución ver Sección 5.</i></p>		<p>+ 100 µl BUFFER BBE (70°C)</p> <p>Incube 1 min</p> <p>1 min, 11,000 x g</p>
----------	---	---	--

**NOTA**

Para muestras respiratorias viscosas (esputos) seguir el siguiente pre-tratamiento de muestras antes de usar Speedtools DNA Extraction Kit:

1.- Añadir a la muestra una solución de NALC (1:1vol); incubar a temperatura ambiente durante 20 min.

Solución de NALC:

Citrato sódico 1.45%  
2 % hidróxido sódico  
N-acetil-L-cisteína 0.5%

2.- Centrifugar la muestra a 3,500 rpm durante 20 min.

3.- Recoger y desechar el sobrenadante


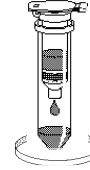
4.- Resuspender el pellet en 1 mL de PBS 1%

5.- Usar 200 µl para Speedtools DNA Extraction Kit.

**B. Protocolo de Extracción y Purificación de ADN de CMV a partir de Plasma**

Antes de comenzar el protocolo:

- Corroborar que el Buffer BB5 y la Proteinase K han sido preparados como se indica en la Sección 4.
- Preparar un incubador o baño de agua a 70 °C.
- Antes de la elución pre-calentar el Buffer BBE a 70°C.

PASO	DESCRIPCIÓN		
<b>1</b>	<p><b>LISIS DE LA MUESTRA</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• En un microtubo de 1.5 mL añada <b>250 µl de plasma</b> (equilibrado a temperatura ambiente) y <b>25 µl</b> de la solución de <b>Proteinase K</b>.</li> <li>• Añadir <b>200 µl de Buffer BB3</b> de lisis, mezclar vigorosamente la mezcla con el <b>vortex</b> (10-20 seg) e incubar a <b>70°C</b> durante <b>10-15 min</b>.</li> </ul>		<p>250 µl PLASMA + 25 µl PROTEINASE K + 200 µl BUFFER BB3 mix 70°C 10-15 min</p>
<b>2-5</b>	<p>Continuar con el Paso 2 del <i>Protocolo Estándar</i>. En el paso 3 cargue todo el lisado en dos pasos.</p>		
<b>6</b>	<p><b>ELUCIÓN Y CONCENTRACIÓN DE DNA DE CITOMEGALOVIRUS</b></p> <p>Transferir la columna a un microtubo de 1.5 mL y añada <b>40 µl de Buffer BBE precalentado a (70°C)</b> directamente en la membrana. Incube a temperatura ambiente durante 3 min y centrifugue <b>1 min a 11,000 x g</b>. El eluido contiene el ADN puro extraído de la muestra.</p>		<p>+ 40 µl BUFFER BBE (70°C)</p> <p>Incube 3 min</p> <p>1 min, 11,000 x g</p>

## 7. RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Problema	Posible causa y sugerencias
<p><b>Bajo rendimiento de ADN o ausencia de ADN</b></p>	<p><b>Concentración baja de leucocitos en la muestra</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Prepare “buffy coat” a partir de muestras enteras de sangre: centrifugue a temperatura ambiente (3,300 × g; 10 min) y de las tres capas que aparecen recoja la capa intermedia que corresponde a los leucocitos (<i>buffy coat</i>).</li> </ul> <p><b>Lisis celular incompleta</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• La muestra no ha sido bien mezclada con el Buffer BB3 / Proteinase K. Después de añadir el Buffer BB3 de lisis vortex vigorosamente la muestra.</li> <li>• Digestión deficiente de la Proteinasa K. Nunca añada directamente la solución de Proteinsa K al Buffer BB3 de lisis. Incube 15 - 20 min a 70°C/ 56°C.</li> </ul> <p><b>Reactivos no han sido preparados correctamente</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Prepare el Buffer BB5 y la solución de Proteinase K según las instrucciones de la sección 4. Añada etanol al lisado antes de cargar las columnas.</li> </ul> <p><b>Elución deficiente del DNA unido a la columna</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• El Buffer BBE de elución debe precalentarse a 70°C antes de su uso. Aplicar el Buffer BBE directamente sobre el centro de la membrana de sílica.</li> <li>• La eficiencia de elución disminuye drásticamente si el buffer utilizado para eluir tiene un pH &lt; 7.0. Así el Buffer BBE posee un pH 8.5. Utilice buffers ligeramente alcalinos para eluir el DNA.</li> <li>• Durante el periodo de incubación a 70°C mezcle vigorosamente la muestra especialmente si trabaja con muestras viejas o con sangre coagulada.</li> </ul>
<p><b>El ADN purificado no funciona bien en reacciones enzimáticas</b></p>	<p><b>Presencia de etanol</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Antes de pasar al paso de elución del ADN asegúrese que no quedan restos de etanol procedentes del Buffer BB5. Si por alguna circunstancia el nivel del Buffer BB5 ha sobrepasado la columna y ha alcanzado el exterior, descarte el eluido y coloque la columna en un nuevo tubo y centrifugue.</li> </ul> <p><b>Contaminación del ADN con inhibidores</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Si el ADN ha sido eluido con buffer Tris/EDTA (TE), asegúrese que EDTA no interfiera en posteriores aplicaciones del ADN o re-purifique el ADN y utilice el Buffer BBE.</li> <li>• Si purifica ADN de muestras viejas o sangre coagulada incube la muestra con la solución Proteinase K durante 30 min y vortex una o dos veces durante el proceso.</li> <li>• Si el ratio de <math>A_{260/280}</math> del eluido es menor de 1.6 repita el proceso de purificación: Añada un volumen de Buffer BB3 y un volumen de etanol al eluido, cargue una columna y continúe con el paso 3 del protocolo correspondiente.</li> </ul>

Problema	Posible causa y sugerencias
<b>ADN purificado de mala calidad</b>	<p><b>Reactivos no han sido preparados correctamente</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Prepare el Buffer BB5 y la solución de Proteinase K según las instrucciones de la sección 4. Añada etanol al lisado antes de cargar las columnas.</li> </ul> <p><b>Lisis celular incompleta</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>La muestra no ha sido bien mezclada con el Buffer BB3 / Proteinase K. Después de añadir el Buffer BB3 de lisis vortex vigorosamente la muestra.</li> <li>Digestión deficiente de la Proteinasa K. Nunca añada directamente la solución de Proteinasa K al Buffer BB3 de lisis. Incube 15-20min a 70°C/56°C.</li> </ul> <p><b>Presencia de ARN en la muestra</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Si se quiere ADN libre de ARN añada 20 µl de RNase A Solution (10 mg/mL) antes de añadir el Buffer BB3 de lisis.</li> </ul> <p><b>Las muestras son viejas o la sangre ha coagulado</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Para la extracción de ADN de muestras de sangre ya viejas o coaguladas se recomienda incubar la muestra con la solución Proteinase K durante 30 min y mezclar bien con el vortex varias veces durante el proceso de incubación.</li> </ul>

## 9. INFORMACIÓN SOBRE PEDIDOS

SPEEDTOOLS KIT	10 PREPS	50 PREPS	250 PREPS
SPEEDTOOLS <b>DNA</b> EXTRACTION KIT	Ref. 21.130M	Ref. 21.131	Ref. 21.132
SPEEDTOOLS <b>TISSUE</b> DNA EXTRACTION KIT	Ref. 21.135M	Ref. 21.136	Ref. 21.137
SPEEDTOOLS <b>RNA VIRUS</b> EXTRACTION KIT	Ref. 21.140M	Ref. 21.141	Ref. 21.142
SPEEDTOOLS <b>FOOD DNA</b> EXTRACTION KIT	Ref. 21.175M	Ref. 21.176	Ref. 21.177
SPEEDTOOLS <b>PLANT DNA</b> EXTRACTION KIT	Ref. 21.170M	Ref. 21.171	Ref. 21.172
SPEEDTOOLS <b>TOTAL RNA</b> EXTRACTION KIT	Ref. 21.210M	Ref. 21.211	Ref. 21.212
SPEEDTOOLS <b>PCR CLEAN-UP</b> KIT	Ref. 21.200M	Ref. 21.201	Ref. 21.202
SPEEDTOOLS <b>PLASMID</b> DNA PURIFICATION KIT	Ref. 21.220M	Ref. 21.221	Ref. 21.222



## 10. LIMITACIONES Y GARANTÍA

1. Producto para uso exclusivo en investigación en análisis *in vitro*.
2. El kit no ha sido diseñado para identificar un determinado microorganismo o para uso clínico (diagnóstico, terapia u otros usos no específicamente contemplados).
3. Es responsabilidad del usuario verificar la validez de uso del kit para una aplicación específica, pues el kit no ha sido validado para un determinado microorganismo o tipo de células.
4. La documentación incluida en el kit especifica su uso, deben seguirse fielmente las instrucciones con el fin de obtener ADN de alta calidad.
5. BIOTOOLS garantiza la conformidad del kit con las especificaciones del producto.
6. La obligación de BIOTOOLS y los derechos del comprador bajo esta garantía están limitados: bien al reemplazo por parte de BIOTOOLS de cualquier producto que sea deficiente en fabricación, y que deberá ser retornado a BIOTOOLS (portes pagados), o a opción de BIOTOOLS, devolución del precio de adquisición.
7. BIOTOOLS no se responsabilizará de daños o defectos debidos al transporte. Las reclamaciones por mercancía dañada han de dirigirse al transportista. El seguro de transporte de mercancías es responsabilidad del cliente.
8. BIOTOOLS no tendrá responsabilidad sobre ningún daño directo, indirecto, consecuencia o incidente resultante del uso, mal uso, resultado del uso o de la incapacidad de uso del kit. Tampoco se responsabiliza de los defectos en productos o componentes no manufacturados por BIOTOOLS, o daños consecuencia de esos productos o componentes exógenos a BIOTOOLS.
9. Ninguna otra garantía de ningún tipo, directa o indirecta, expresa o implícita, incluyendo sin limitación, garantías implícitas de capacidad de comercialización, o adecuación para un propósito determinado, son dadas por BIOTOOLS.
10. La garantía de este boletín, así como las especificaciones y descripciones de este kit que aparecen en el catálogo son los únicos documentos válidos de la garantía del producto. Comunicados escritos u orales por los comerciales, distribuidores o técnicos de BIOTOOLS, excepto declaraciones escritas firmadas por un directivo autorizado de BIOTOOLS, carecen de valor y no forman parte de la garantía del contrato de venta.
11. Las indicaciones/aplicaciones del producto están sujetas a cambios por lo cual se recomienda contactar con nuestro servicio técnico para obtener información actualizada de los productos de BIOTOOLS. También puede contactar su comercial o distribuidor local para una información general.
12. Las aplicaciones mencionadas en el boletín o demás documentos de BIOTOOLS tienen un carácter meramente informativo. BIOTOOLS no garantiza que todas las aplicaciones hayan sido testadas en sus laboratorios. Para más información contacte nuestro Departamento Técnico ([info@biotools.eu](mailto:info@biotools.eu)).

### Fabricado por:

BIOTOOLS, Biotechnological & Medical Laboratories, S.A. han sido evaluados y certificados en cuanto al cumplimiento de los requisitos de ISO 9001:2008 para las siguientes actividades: investigación y desarrollo de productos de biotecnología, fabricación de productos de biotecnología y fabricación de productos para diagnóstico *in vitro* (IVDs).  
Valle de Tobalina – 52 – Nave 39, 28021 Madrid – España