

REAL SALIVA DNA KIT

Ref. **RBMEG06:** (para **50 EXTRACCIONES**)
 Ref. **RBMEG07:** (para **160 EXTRACCIONES**)

(for **50 EXTRACTION**)
 (for **160 EXTRACTION**)

1. DESCRIPCIÓN

REAL SALIVA Kit provee un método para la extracción de ADN genómico de alta calidad a partir de muestras de **saliva directa, muestras de frotis bucales con cepillos de espuma, muestras de saliva recolectadas con el REALSALIVA Sample Collection Kit y muestras de saliva recolectadas con el ORAGENE self collection kits (DNAGenotek).**

Es un método rápido, seguro y económico. Utiliza un paso de desproteización con un novedoso tampón salino evitando el uso de disolventes orgánicos tóxicos como fenol o cloroformo.

En el caso de la saliva, la obtención de ADN en un mismo individuo presenta una variabilidad intrasujeto, es decir, no existe una cantidad aproximada de ADN / ml ya que puede variar según el momento de la recogida de la muestra, dándose el caso de que no se obtenga una gran cantidad de ADN y no se puedan llevar a cabo aplicaciones posteriores que requieren gran cantidad de ADN.

1. DESCRIPTION

REAL SALIVA Kit provides a method for the extraction of high-quality genomic DNA from **direct saliva samples, buccal swab samples with foam brushes, saliva samples collected with the REALSALIVA Sample Collection Kit and saliva samples collected with the ORAGENE self-collection kits (DNAGenotek).**

It is a fast, safe and economical method. It uses a deproteinization step with a novel saline buffer avoiding the use of toxic organic solvents such as phenol or chloroform.

In the case of saliva, obtaining DNA in the same individual presents an intrasubject variability, i.e., there is no approximate amount of DNA / ml as it may vary depending on the time of sample collection, and it may happen that a large amount of DNA is not obtained and subsequent applications that require a large amount of DNA cannot be carried out.

2. COMPONENTES DEL KIT / KIT COMPONENTS

Componentes REAL	Ref.	ENVASE (50 Extracciones)	ENVASE (160 Extracciones)	T ^a
Lysis Solution	E21	40 ml	105 ml	RT
Protein Precipitation Solution	E23M	35 ml	85 ml	RT
Hydration Solution	E24	40 ml	100 ml	RT
Proteinase K	E40	300 µl	2x400 µl	-20°C
RNase	E30	300 µl	2x400 µl	-20°C

Tipos de Muestra/ Types of Samples	Ref. RBMEG06	Ref. RBMEG07
600 µl de Saliva directa / 600 µl of direct saliva	50 Extracciones	160 Extracciones
Frotis bucales con REALSALIVA SWABS / Mouth swabs with REALSALIVA SWABS	50 Extracciones	160 Extracciones
REAL SALIVA RNA SAMPLE COLLECTION KIT Si se procesan 600 µl de saliva / If 600 µl of saliva are processed	50 Extracciones	160 Extracciones
REAL SALIVA RNA SAMPLE COLLECTION KIT Si se procesan 2.0 ml de saliva / If 2.0 ml of saliva are processed	20 Extracciones	50 Extracciones
ORAGENE SELF COLLECTION KIT (DANAGenotek) OG-500	20 Extracciones	50 Extracciones
ORAGENE SELF COLLECTION KIT (DANAGenotek) OG-501	40 Extracciones	100 Extracciones

Equipos y reactivos necesarios no incluidos:

- * Isopropanol
- * Etanol 70 %.
- * Microtubos de 1.5.
- * Tubos de centrifuga de 15 o 50 ml.
- * Microcentrifuga o centrifuga clínica
- * Vortex
- * Baño de Agua

Equipment and additional reagents required

- * Isopropanol
- * 70 % Ethanol
- * 1.5 ml of microtubes.
- * 15- or 30-ml centrifuge tubes
- * Microcentrifuge or clinic centrifuge.
- * Vortex
- * Water Bath

3.PROTOCOLO GENERAL

3. GENERAL PROCEDURE

3.1. Preparaciones preliminares

- Si la solución de lisis contiene un precipitado debido a las bajas temperaturas. Incubar a 37°C y mezclar para disolver el precipitado.
- Las muestras de saliva se han de recoger antes de las comidas, lavarse la boca con agua y esperar unos 30 minutos para recoger la muestra. Las muestras de saliva directa deben ser procesadas, o mantener a 4° C si serán procesadas en menos de 2 horas.

3.2. Extracción a partir de muestras de 600 µl de saliva directa

Lisis Celular

1. Centrifugar **600 µl de saliva** durante 90 segundos a 13.000-16.000 x g. Eliminar el sobrenadante con pipeta sin dañar el pellet visible de células.
2. Añadir **600 µl de Lysis solution + 5 µl de Proteinase K (20 mg/ml) + 5 µl de RNase** y resuspender mediante pipeta para lisar las células.
3. **Incubar a 37° C durante 30-60 minutos.** Si es posible vortex periódicamente durante el periodo de incubación.

Precipitación proteica.

1. Dejar enfriar las muestras 3 min a -20°C
2. Añadir **250 µl de Protein Precipitation Solution** al lisado celular.
3. Vortex vigorosamente a máxima velocidad durante 20-30 segundos.
4. Centrifugar a 13.000-16.000 x g durante 5 minutos. Se formará un precipitado. Si se observan partículas flotando volver a centrifugar después de incubar 5 minutos en hielo.

Precipitación del ADN.

1. Traspasar el sobrenadante que contiene el ADN a un microtubo nuevo con 600µl de **Isopropanol**.
2. Mezclar por inversión unas 50 veces.
3. Centrifugar a 13.000-16.000 x g durante 2 minutos. El ADN será visible como un pellet blanco.
4. Eliminar el sobrenadante y secar el tubo de forma breve en papel absorbente. Añadir 600 µl de **Etanol 70%** para lavar el ADN.
5. Centrifugar a 13.000-16.000 x g durante 1 minuto. Cuidadosamente eliminar el sobrenadante sin tocar el pellet de ADN. Se puede volver a centrifugar brevemente para recoger las últimas gotas de etanol residual con micropipeta.
6. Invertir el microtubo en un papel absorbente y dejar secar durante unos 5 minutos.

Hidratación del ADN.

1. Añadir 100-750 µl de **Hydration Solution** dependiendo del tamaño del pellet de ADN y resuspender con micropipeta. Los pellets de gran tamaño es posible que necesiten una incubación a 55°C durante 1 hora con periódicas agitaciones para resuspenderse completamente o incubar "overnight" a temperatura ambiente con ligera agitación. Para pellets muy pequeños se puede utilizar 25-50 µl de **Hydration Solution**.
2. Conservar a 2-8°C. Para almacenajes largos conservar a -20°C o -80°C.

3.1.Preliminary preparations

- If the lysis solution contains a precipitate due to low temperatures. Incubate at 37°C and mix to dissolve the precipitate.
- Saliva samples should be collected before meals, rinse the mouth with water and wait about 30 minutes to collect the sample. Direct saliva samples should be processed, or kept at 4°C if they will be processed in less than 2 hours.

3.2. Extraction from 600 µl of direct saliva samples

Cell Lysis

1. Centrifuge **600 µl of saliva** for 90 seconds at 13,000-16,000 x g. Remove the supernatant by pipette without damaging the visible cell pellet.
2. Add **600 µl Lysis solution + 5 µl Proteinase K (20 mg/ml) + 5 µl RNase** and resuspend by pipette to lyse the cells.
3. **Incubate at 37°C for 30-60 minutes.** If possible, vortex periodically during the incubation period.

Protein precipitation.

1. Allow samples to cool for 3 min at -20°C.
2. Add **250 µl of Protein Precipitation Solution** to the cell lysate.
3. Vortex vigorously at maximum speed for 20-30 seconds.
4. Centrifuge at 13,000-16,000 x g for 5 minutes. A precipitate will form. If floating particles are observed, centrifuge again after incubating for 5 minutes on ice.

DNA precipitation.

1. Transfer the supernatant containing the DNA to a new microtube with 600µl of Isopropanol.
2. Mix by inversion about 50 times.
3. Centrifuge at 13,000-16,000 x g for 2 minutes. The DNA will be visible as a white pellet.
4. Remove the supernatant and dry the tube briefly on absorbent paper. Add 600 µl of 70% Ethanol to wash the DNA.
5. Centrifuge at 13,000-16,000 x g for 1 minute. Carefully remove the supernatant without touching the DNA pellet. Centrifuge again briefly to collect the last drops of residual ethanol with a micropipette.
6. Invert the microtube on absorbent paper and allow to dry for about 5 minutes.

DNA hydration.

1. Add 100-750 µl of **Hydration Solution** depending on the size of the DNA pellet and resuspend with micropipette. Large pellets may require incubation at 55°C for 1 hour with periodic shaking to fully resuspend or incubate overnight at room temperature with gentle agitation. For very small pellets 25-50 µl of **Hydration Solution** can be used.
2. Store at 2-8°C. For long term storage store at -20°C or -80°C.

3.3. Extracción a partir de muestras de frotis bucales con REAL SALIVA SWABS

Toma de la muestra

1. Se recomienda que el individuo al que se le va a extraer la muestra se abstenga de beber café y tomar comida alguna al menos 30 minutos antes de la recogida. Si no fuera posible se recomienda un lavado suave sólo con agua de la boca.
2. Recoger la muestra de células bucales con el escobillón. Frotar el escobillón en el interior de la mejilla (pared bucal) y encías con una firme presión unas 20 veces por cada lado de la cara y cada lado del escobillón.
3. Utilizar inmediatamente para la extracción. Luego introducir el cepillo en el receptáculo que se provee para el envío. En este tubo contenedor la muestra puede permanecer 1 semana a 22-37°C antes de realizarse la extracción. Para almacenamientos largos conservar la muestra en el contenedor a -20°C hasta 6 meses.
4. El uso de cepillos de espuma como los que se proveen son los adecuados ya que permiten recuperar casi la totalidad del Tampón de lisis después del periodo de incubación.

Lisis celular

1. Añadir **600 µl** de **Lysis Solution** en un microtubo de 1.5 ml. Cortar la cabeza del cepillo con un poco de mango y introducirla en el microtubo. Vortex vigorosamente para liberar las células del cepillo.
2. Añadir **5 µl** de **Proteinase K (20 mg/ml)** + **5 µl** de **RNase** e incubar a 37°C durante 1 hora. Realizar varios vortex durante el periodo de incubación.
3. Retirar la cabeza del cepillo de la solución de lisis, frotándolo contra las paredes para recoger la máxima cantidad de líquido.

Precipitación de proteínas

1. Dejar enfriar las muestras 3 min a -20°C
2. Añadir **250 µl** de **Protein Precipitation Solution**
3. Vortex vigorosamente durante 30 segundos.
4. Centrifugar a 13.000-16.000 x g durante 5 minutos. Se observará que el precipitado proteico forma un pellet.

Precipitación del ADN

1. Pasar el sobrenadante que contiene el ADN a un tubo de 1.5 ml que contenga **600 µl** de **Isopropanol** Mezclar por inversión varias veces.
2. Centrifugar a 13.000-16.000 x g durante 3 minutos.
3. Eliminar el sobrenadante. Añadir **600 µl** de **etanol 70%** e invertir varias veces para lavar el pellet de ADN.
4. Centrifugar a 13.000-16.000 x g durante 1 minuto. Cuidadosamente eliminar el sobrenadante sin tocar el pellet de ADN. Se puede volver a centrifugar brevemente para recoger las últimas gotas de etanol residual con micropipeta.
5. Invertir el tubo y dejar secar en papel absorbente durante 5 minutos.

Hidratación del ADN

1. Añadir **30-50 µl** de **Hydration Solution** del ADN y resuspender con micropipeta.
2. Conservar a 2-8°C. Para almacenajes largos conservar a -20°C o -80°C.

3.3. Extraction from buccal swab samples with REAL SALIVA SWABS

Sample collection

1. It is recommended that the individual from whom the sample is to be taken refrain from drinking coffee and eating any food for at least 30 minutes prior to collection. If this is not possible, a gentle rinse of the mouth with water only is recommended.
2. Collect the buccal cell sample with the swab. Rub the swab on the inside of the cheek (buccal wall) and gums with firm pressure about 20 times on each side of the face and each side of the swab.
3. Use immediately for extraction. Then insert the brush into the receptacle provided for shipping. The sample can remain in this container tube for 1 week at 22-37°C before extraction. For long term storage keep the sample in the container at -20°C for up to 6 months.
4. The use of foam brushes such as those provided are suitable as they allow recovery of almost all of the lysis buffer after the incubation period.

Cell lysis

1. Add **600 µl** of **Lysis Solution** into a 1.5 ml microtube. Cut the brush head with a bit of handle and insert into the microtube. Vortex vigorously to release the cells from the brush.
2. Add **5 µl Proteinase K (20 mg/ml)** + **5 µl RNase** and incubate at 37°C for 1 hour. Vortex several times during the incubation period.
3. Remove the brush head from the lysis solution, rubbing it against the walls to collect the maximum amount of liquid.

Protein precipitation

1. Let the samples cool for 3 min at -20°C.
2. Add **250 µl** of **Protein Precipitation Solution**.
3. Vortex vigorously for 30 sec.
4. Centrifuge at 13,000-16,000 x g for 5 min. The protein precipitate will be observed to form a pellet.

DNA Precipitation

1. Transfer the supernatant containing the DNA to a 1.5 ml tube containing **600 µl** of **Isopropanol** Mix by inversion several times.
2. Centrifuge at 13,000-16,000 x g for 3 min.
3. Remove the supernatant. Add **600 µl** of **70% ethanol** and invert several times to wash the DNA pellet.
4. Centrifuge at 13,000-16,000 x g for 1 minute. Carefully remove the supernatant without touching the DNA pellet. Centrifuge again briefly to collect the last drops of residual ethanol with micropipette.
5. Invert the tube and allow to dry on absorbent paper for 5 minutes.

DNA hydration

1. Add **30-50 µl** of **DNA Hydration Solution** and resuspend with micropipette.
2. Store at 2-8°C. For long term storage store at -20°C or -80°C.

3.4 Extracción a partir de muestras de saliva conservadas en el REALSALIVA ARN Sample Collection Kit

2 OPCIONES: *Dependerá de la cantidad necesaria de ADN para las aplicaciones posteriores o la preferencia de trabajar con una microcentrífuga con tubos de 1.5 ml (opción A) o una centrífuga clínica y tubos de 15 ml (opción B).*

A) Procesar 1.2 ml (saliva + solución conservadora de saliva) que representará procesar aproximadamente 600 l de saliva directa.

Lisis Celular

1. En el REALSALIVA Sample Collection Kit se observará un pellet blanco que contiene las células de donde se va a extraer el ADN. Agitar bien el tubo que contiene los 2 ml de saliva recolectados. **Es importante** que se vea una solución homogénea.
2. Centrifugar **1.2 ml (saliva + solución conservadora de saliva)** durante 90 segundos a 13.000-16.000 x g. Eliminar el sobrenadante con pipeta sin dañar el pellet visible de células.
3. Añadir **600 µl de Lysis Solution + 5 µl de Proteinase K (20 mg/ml) + 5 µl de RNase** y resuspender mediante pipeta para lisar las células.
4. **Incubar a 37° C durante 30-60 minutos.** Si es posible vortex periódicamente durante el periodo de incubación.

Precipitación proteica.

1. Dejar enfriar las muestras 3 min a -20°C
2. Añadir **250 µl de Protein Precipitation Solution** al lisado celular.
3. Vortex vigorosamente a máxima velocidad durante 20-30 segundos.
4. Centrifugar a 13.000-16.000 x g durante 5 minutos. Se formará un precipitado. Si se observan partículas flotando volver a centrifugar después de incubar 5 minutos en hielo.

Precipitación del ADN.

1. Traspasar el sobrenadante que contiene el ADN a un microtubo nuevo que contiene **600 µl de Isopropanol**.
2. Mezclar por inversión unas 50 veces.
3. Centrifugar a 13.000-16.000 x g durante 2 minutos. El ADN será visible como un pellet blanco.
4. Eliminar el sobrenadante y secar el tubo de forma breve en papel absorbente. Añadir **600 µl de Etanol 70%** para lavar el ADN.
5. Centrifugar a 13.000-16.000 x g durante 1 minuto. Cuidadosamente eliminar el sobrenadante sin tocar el pellet de ADN. Se puede volver a centrifugar brevemente para recoger las últimas gotas de etanol residual.
6. Invertir el microtubo en un papel absorbente y dejar secar durante unos 5-10 minutos.

Hidratación del ADN.

1. Añadir **100-750 µl de Hydration Solution** dependiendo del tamaño del pellet de ADN y resuspender con micropipeta. Los pellets de gran tamaño es posible que necesiten una incubación a 55°C durante 1 hora con periódicas agitaciones para resuspenderse completamente o incubar "overnight" a temperatura ambiente con ligera agitación. Para pellets muy pequeños se puede utilizar **25-50 µl de Hydration Solution**.
2. Conservar a 2-8°C. Para almacenajes largos conservar a -20°C o -80.

3.4 Extraction from saliva samples preserved in the REALSALIVA RNA Sample Collection Kit.

2 OPTIONS: *Depend on the amount of DNA needed for downstream applications or the preference of working with a microcentrifuge with 1.5 ml tubes (option A) or a clinical centrifuge and 15 ml tubes (option B).*

A) Process 1.2 ml (saliva + saliva preservative solution) which will represent processing approximately 600 l of direct saliva.

Cell Lysis

1. In the REALSALIVA Sample Collection Kit a white pellet containing the cells from which DNA is to be extracted will be observed. Shake well the tube containing the 2 ml of collected saliva. **It is important** that a homogeneous solution is observed.
2. Centrifuge **1.2 ml (saliva + saliva preservative solution)** for 90 seconds at 13,000-16,000 x g. Remove the supernatant by pipette without damaging the visible cell pellet.
3. Add **600 µl of Lysis Solution + 5 µl de Proteinase K (20 mg/ml) + 5 µl de RNase** and resuspend by pipette to lyse the cells.
4. **Incubate at 37°C for 30-60 minutes.** If possible vortex periodically during the incubation period.

Protein precipitation.

1. Allow samples to cool for 3 min at -20°C.
2. Add **250 µl of Protein Precipitation Solution** to the cell lysate.
3. Vortex vigorously at maximum speed for 20-30 sec.
4. Centrifuge at 13,000-16,000 x g for 5 minutes. A precipitate will form. If floating particles are observed, centrifuge again after incubating for 5 minutes on ice.

DNA precipitation.

1. Transfer the supernatant containing the DNA to a new microtube containing **600 µl of Isopropanol**.
2. Mix by inversion about 50 times.
3. Centrifuge at 13,000-16,000 x g for 2 minutes. The DNA will be visible as a white pellet.
4. Remove the supernatant and dry the tube briefly on absorbent paper. Add **600 µl of 70% Ethanol** to wash the DNA.
5. Centrifuge at 13,000-16,000 x g for 1 minute. Carefully remove the supernatant without touching the DNA pellet. Centrifuge again briefly to collect the last drops of residual ethanol.
6. Invert the microtube on absorbent paper and allow to dry for about 5-10 minutes.

DNA hydration.

1. Add **100-750 µl of Hydration Solution** depending on the size of the DNA pellet and resuspend with micropipette. Large pellets may require incubation at 55°C for 1 hour with periodic shaking to fully resuspend or incubate overnight at room temperature with gentle agitation. For very small pellets **25-50 µl of Hydration Solution** can be used.
2. Store at 2-8°C. For long term storage store at -20°C or -80°C.

B) Procesar todo el contenido del REAL SALIVA ARNSample Colletion Kit (saliva + solución conservadora de saliva)

Lisis Celular

1. En el REAL SALIVA Sample Collection Kit se observará un pellet blanco que contiene las células de dónde se va a extraer el ADN. Agitar bien el tubo que contiene los 2 ml de saliva recolectados. **Es importante** que se vea una solución homogénea.
2. Traspasar todo el contenido **del tubo (4,50 ml)** del REAL SALIVA Sample Collection Kit a **un tubo de centrifuga de 15 ml**. Asegurarse que se ha traspasado todo el contenido incluido el pellet blanco.
3. Centrifugar a 4000 rpm durante 2 minutos. Se observará la formación de un pellet blanco. Eliminar el sobrenadante **sin perder nada de pellet celular**.
4. Añadir **2 ml de Lysis Solution + 15 µl de Proteinase K (20 mg/ml) + 15 µl de RNase** y resuspender mediante pipeta para lisar las células. Incubar a 37° C durante 60 minutos. **Muy importante que todo el pellet celular sea resuspendido**. Si es posible vortex periódicamente durante el periodo de incubación.

Precipitación proteica.

1. Dejar enfriar las muestras 3 min a -20°C
2. Añadir 750 µl de **Protein Precipitation Solution** al lisado celular.
3. Vortex vigorosamente a máxima velocidad durante 20-30 segundos.
4. Centrifugar a 4000 rpm durante 5 minutos. Se formará un precipitado. Si se observan partículas flotando volver a centrifugar después de incubar 5 minutos en hielo.

Precipitación del ADN.

1. Traspasar el sobrenadante que contiene el ADN a **un tubo de centrifuga de 15 ml** nuevo que contiene **2 ml de Isopropanol**.
2. Mezclar por inversión unas 25 veces.
3. Centrifugar a 4000 rpm durante 3 minutos. El ADN será visible como un pellet blanco en el fondo o pared del tubo.
4. Eliminar el sobrenadante y secar el tubo de forma breve en papel absorbente. Añadir **2 ml de Etanol 70%** para lavar el ADN.
5. Centrifugar a 4000 rpm durante 1 minuto. Cuidadosamente eliminar el sobrenadante sin tocar el pellet de ADN. Se puede volver a centrifugar brevemente para recoger las últimas gotas de etanol residual.
6. Invertir el tubo en un papel absorbente y dejar secar durante unos 5-10 minutos.

Hidratación del ADN.

1. Añadir 750-1.000 µl de agua estéril o **Hydration Solution** y resuspender con pipeta.
2. Incubar a 50°C durante 1 hora con periódicas agitaciones para ayudar a la rehidratación del ADN, o incubar "overnight" a temperatura ambiente con ligera agitación.
3. Conservar a 2-8°C. Para almacenajes largos conservar a -20°C o -80 °C.

B) Process the entire contents of the REAL SALIVA RNA Sample Colletion Kit (saliva + saliva preservative solution).

Cell Lysis

1. In the REAL SALIVA Sample Collection Kit a white pellet containing the cells from which the DNA is going to be extracted will be observed. Shake well the tube containing the 2 ml of saliva collected. It is important that a homogeneous solution is visible.
2. Transfer the entire contents **of the tube (4.50 ml)** from the REAL SALIVA Sample Collection Kit **into a 15 ml centrifuge tube**. Make sure that the entire contents including the white pellet have been transferred.
3. Centrifuge at 4000 rpm for 2 minutes. A white pellet should form. Remove the supernatant **without losing any cell pellet**.
4. Add **2 ml of Lysis Solution + 15 µl of Proteinase K (20 mg/ml) + 15 µl de RNase** and resuspend by pipette to lyse the cells. Incubate at 37°C for 60 minutes. **Very important that the entire cell pellet is resuspended**. If possible vortex periodically during the incubation period.

Protein precipitation.

1. Allow the samples to cool for 3 min at -20°C.
2. Add **750 µl of Protein Precipitation Solution** to the cell lysate.
3. Vortex vigorously at maximum speed for 20-30 sec.
4. Centrifuge at 4000 rpm for 5 minutes. A precipitate will form. If floating particles are observed, centrifuge again after incubating for 5 minutes on ice.

Precipitation of DNA.

1. Transfer the supernatant containing the DNA to **a fresh 15 ml centrifuge tube** containing **2 ml Isopropanol**.
2. Mix by inversion about 25 times.
3. Centrifuge at 4000 rpm for 3 minutes. The DNA will be visible as a white pellet on the bottom or wall of the tube.
4. Remove the supernatant and dry the tube briefly on absorbent paper. Add **2 ml of 70% ethanol** to wash the DNA.
5. Centrifuge at 4000 rpm for 1 minute. Carefully remove the supernatant without touching the DNA pellet. Centrifuge again briefly to collect the last few drops of residual ethanol.
6. Invert the tube on absorbent paper and allow to dry for 5-10 minutes.

Hydration of DNA

1. Add 750-1,000 µl of sterile water or **Hydration Solution** and resuspend by pipetting.
2. Incubate at 50°C for 1 hour with periodic shaking to aid DNA rehydration, or incubate "overnight" at room temperature with gentle agitation.
3. Store at 2-8°C. For long term storage store at -20°C or -80°C.

3.5 Extracción a partir de muestras de saliva conservadas en el ORAGENE self collection kits (DNA Genotek). **OG-500 (2ml saliva) / OG-501 (1ml saliva)**

Lisis Celular

1. Incubar las muestras de ORAGENE/saliva a 50°C en un baño de agua durante 1 hora o en una incubadora de aire por un mínimo de 2 horas.
2. Traspasar todo el contenido **del tubo (4 ml / 2 ml) a un tubo de centrifuga de 15 ml.**
3. Añadir **(1 ml / 0,50 ml) de Lysis Solution + (15 µl / 7,50 µl) de RNase.** Vortex para mezclar bien. Incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.

Precipitación proteica.

1. Añadir **(1.60 ml / 0,80 ml)** de **Protein Precipitation Solution** al lisado celular.
2. Vortex vigorosamente a máxima velocidad durante 20-30 segundos.
3. Centrifugar a 4000 rpm durante 5 minutos. Se formará un precipitado. Si se observan partículas flotando volver a centrifugar después de incubar 5 minutos en hielo.

Precipitación del ADN.

1. Traspasar el sobrenadante que contiene el ADN a **un tubo de centrifuga de 15 ml** nuevo que contiene **(5 ml / 2,50 ml) de Isopropanol.**
2. Mezclar por inversión unas 25 veces.
3. Centrifugar a 4000 rpm durante 3 minutos. El ADN será visible como un pellet blanco.
4. Eliminar el sobrenadante y secar el tubo de forma breve en papel absorbente. Añadir **(5 ml / 2,50 ml) de Etanol 70%** para lavar el ADN.
5. Centrifugar a 4000 rpm durante 1 minuto. Cuidadosamente eliminar el sobrenadante sin tocar el pellet de ADN. Se puede volver a centrifugar brevemente para recoger las últimas gotas de etanol residual.
6. Invertir el tubo en un papel absorbente y dejar secar durante unos 5-10 minutos.

Hidratación del ADN.

1. Añadir **(750-1.000 µl / 350-500 µl)** de agua estéril o **Hydration Solution** y resuspender con pipeta.
2. Incubar a 50°C durante 1 hora con periódicas agitaciones para ayudar a la rehidratación del ADN, o incubar "overnight" a temperatura ambiente con ligera agitación.
3. Conservar a 2-8°C. Para almacenajes largos conservar a -20°C o -80 °C.

3.5 Extraction from saliva samples stored in the ORAGENE self collection kits (DNA Genotek). **OG-500 (2ml saliva) / OG-501 (1ml saliva)**

Cell Lysis

1. Incubate the ORAGENE/saliva samples at 50°C in a water bath for 1 hour or in an air incubator for a minimum of 2 hours.
2. Transfer the entire contents **of the tube (4 ml / 2 ml) to a 15 ml centrifuge tube.**
3. Add **(1 ml / 0,50 ml) of Lysis Solution + (15 µl / 7,50 µl) of RNase.** Vortex to mix well. Incubate at room temperature for 15 minutes.

Protein Precipitation.

1. Add **(1.60 ml / 0,80 ml)** of **Protein Precipitation Solution** to the cell lysate.
2. Vortex vigorously at maximum speed for 20-30 seconds.
3. Centrifuge at 4000 rpm for 5 minutes. A precipitate will form. If floating particles are observed, centrifuge again after incubating for 5 minutes on ice.

Precipitation of the DNA.

1. Transfer the supernatant containing the DNA **to a fresh 15 ml centrifuge tube** containing **(5 ml / 2,50 ml) Isopropanol.**
2. Mix by inversion about 25 times.
3. Centrifuge at 4000 rpm for 3 minutes. The DNA will be visible as a white pellet.
4. Remove the supernatant and dry the tube briefly on absorbent paper. Add **(5 ml / 2,50 ml) of 70% Ethanol** to wash the DNA.
5. Centrifuge at 4000 rpm for 1 minute. Carefully remove the supernatant without touching the DNA pellet. Centrifuge again briefly to collect the last drops of residual ethanol.
6. Invert the tube on absorbent paper and allow to dry for about 5-10 minutes.

DNA hydration.

1. Add **(750-1.000 µl / 350-500 µl)** of sterile water or **Hydration Solution** and resuspend by pipette.
2. Incubate at 50°C for 1 hour with periodic shaking to aid DNA rehydration, or incubate "overnight" at room temperature with gentle agitation.
3. Store at 2-8°C. For long term storage store at -20°C or -80°C.

4.GUÍA DE PROBLEMAS Y POSIBLES SOLUCIONES / TROUBLESHOOTING

Para cualquier duda o consulta adicional sobre el protocolo pónganse en contacto con el servicio técnico de DURVIZ s.l.






For any further questions or doubts about the protocol, please contact DURVIZ s.l. technical service.


5.ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD / STORAGE AND STABILITY

Todos los componentes son estables durante 12 meses desde la fecha de compra siendo almacenados y utilizados como se indica.

All components are stable for 12 months from date of purchase when stored and used as directed.

6.SIMBOLOS / SYMBOLS

REF	Número de catálogo / <i>Catalogue number</i>		Contiene suficiente para n pruebas / <i>Contains enough for n tests</i> Fabricante / <i>Manufacturer</i>
	Limitación de temperatura / <i>Temperature limitation</i>		Fabricante / <i>Manufacturer</i>
	Fecha de caducidad / <i>Expiration date</i>	RUO	Uso exclusivo en investigación / <i>Research use only</i>
LOT	Lote / <i>Lot</i>		Peligro para la salud / <i>Health hazard</i>

 B65699985