

REAL SWABS DNA KIT

Ref. RBMEG20:	(para 100 EXTRACCIONES)	(for 100 EXTRACTION)
Ref. RBMEG21:	(para 500 EXTRACCIONES)	(for 500 EXTRACTION).
Ref. RBMEG22:	(para 1000 EXTRACCIONES)	(for 1000 EXTRACTION).

1. INTRODUCCIÓN

REAL SWABS DNA Kit provee un método para la extracción de ADN genómico de alta calidad a partir **muestras de frotis bucales con cepillos de espuma y muestras de saliva recolectadas con nuestro sistema REALSWABS Sample Collection Kit**

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 intra sujeto, 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.

REAL SWABS DNA Kit provides a method for the extraction

1. SAMPLE TAKING

of high quality genomic DNA from **buccal swab samples with foam brushes and saliva samples collected with our REALSWABS Sample Collection Kit system.**

It is a fast, safe and economical method. It uses a deproteinization 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, that is, there is not an approximate amount of DNA / ml since it can vary according to the time of collection of the sample, given the case of that a large amount of DNA is not obtained using swabs and subsequent applications that require a large amount of DNA cannot be carried out.

2. COMPONENTES DEL KIT / KIT COMPONENTS

Componente REAL	Ref.	Envase. (100 Preps)	Envase. (500 Preps)	Envase. (1000 Preps)	T ^a
Lysis Solution	E21	60 ml	305 ml	2x305 ml	RT
Protein Precipitation Solution	E23M	22 ml	105 ml	2x105 ml	RT
Hydration Solution	E24	5 ml	25 ml	50 ml	RT
Resuspension Solution	E25	105 ml	2x250 ml	2x500 ml	RT
RNAse	E30	500 µl	2,50 ml	5 ml	-20 °C
Proteinase K	E40	500 µl	2,50 ml	5 ml	-20 °C

Equipos y reactivos necesarios y no provistos

- * Isopropanol.
- * Etanol 70%.
- * Microtubos de 1.5 ml y 2.0 ml.
- * Microcentrifuga o centrifuga clínica.
- * Vortex.
- * Baño de agua

Equipment and reagents needed and not provided

- * Isopropanol.
- * 70% ethanol.
- * Microtubes of 1.5 ml and 2.0 ml.
- * Microcentrifuge or clinical centrifuge.
- * Vortex.
- * Water bath

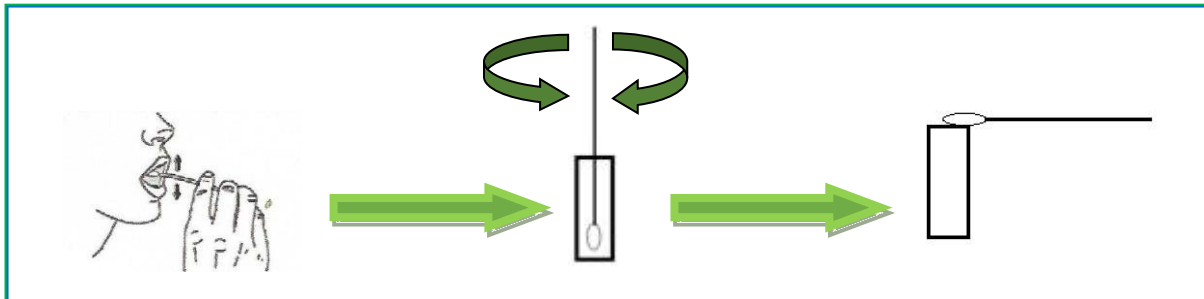
3. PROTOCOLO GENERAL

3. GENERAL PROCEDURE

3.1 Preparaciones preliminares

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 hisopo de espuma. Frotar el escobillón en el interior de la mejilla (pared bucal) y encías con una firme presión unas 30 veces por cada lado de la cara y cada lado del escobillón. **Importante: realizar una presión firme, sólida y razonable con el hisopo. Se puede colocar la mano en la mejilla para ofrecer una superficie más sólida.**
3. Proceder con la extracción o con el método de conservación indicado según el hisopo que se utilice.
4. Si se utiliza nuestro **REALSWABS Sample Collection Kit** proceder de la siguiente manera:
5. Introducir el hisopo en el microtubo con **la Solución de Conservación**. Rotar el hisopo de una forma rápida para liberar las células bucales en la solución **con el mismo movimiento de agitación de una cucharilla de café**. Presionar el hisopo contra la pared del microtubo y girar para asegurar que la mayor parte del líquido permanece en el microtubo. Se recomienda también pasar la cabeza de espuma del hisopo varias veces por la parte superior del microtubo para liberar las últimas gotas.

3.1 Preliminary preparations

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 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 foam swab. Rub the swab on the inside of the cheek (buccal wall) and gums with firm pressure about 30 times on each side of the face and each side of the swab. **Important: apply firm, solid and reasonable pressure with the swab. The hand can be placed on the cheek to provide a more solid surface.**
3. Proceed with extraction or the indicated preservation method depending on the swab used.
4. If using our **REALSWABS Sample Collection Kit** proceed as follows.
5. Insert the swab into the microtube with **the Preservative Solution**. Rotate the swab in a rapid manner to release the buccal cells into the solution **with the same stirring motion of a teaspoon**. Press the swab against the wall of the microtube and rotate to ensure that most of the liquid remains in the microtube. It is also recommended to pass the foam head of the swab several times over the top of the microtube to release the last drops.

6. La solución debe observarse que adquiere una ligera turbidez lo cual indicará la presencia de células bucales. **Si la solución continua transparente se debería realizar una nueva recogida de muestra con un nuevo hisopo y en otro momento.**
7. La muestra conservada es estable a temperatura ambiente (15-25°C) durante 1 año y puede ser enviada al laboratorio para la purificación del ADN genómico. Si se almacena a -20°C o -80°C la muestra es estable indefinidamente.

Si el Lysis Solution contiene un precipitado debido a las bajas temperaturas, incubar a 37°C y mezclar para disolver el precipitado.

6. The solution should be observed to become slightly turbid indicating the presence of buccal cells. **If the solution remains clear, a new sample should be collected with a new swab at a different time.**
7. The preserved sample is stable at room temperature (15-25°C) for 1 year and can be sent to the laboratory for genomic DNA purification. If stored at -20°C or -80°C the sample is stable indefinitely.

If the Lysis Solution contains a precipitate due to low temperatures, incubate at 37°C and mix to dissolve the precipitate.

3.2 Extracción a partir de muestras conservadas con nuestro REALSWABS Sample Collection Kit

1. Aquellas muestras que se hayan dejado en posición vertical durante varios días se podrá observar un pellet blanco que contiene las células bucales. Utilizando una micropipeta, resuspender el pellet completamente y traspasar toda la solución a un nuevo microtubo de 2.0 ml.
2. Añadir **1000 µl del Resuspension Solution** y Centrifugar a 13.000-16.000 x g durante 2 minutos.
3. Eliminar el sobrenadante por decantación **vigilando no perder el pellet celular**. Volver a centrifugar brevemente y eliminar con micropipeta todo el líquido.
4. Añadir **300 µl de Lysis Solution + 5 µl de Proteinase K + 5 µl de RNase** y resuspender el pellet con micropipeta. Incubar a 37°C durante 30 minutos.
Realizar varios vortex durante el periodo de incubación.
5. Añadir **100 µl de Protein Precipitation Solution**.
6. Vortex vigorosamente durante 30 segundos.
7. Centrifugar a 13.000-16.000 x g durante 5 minutos. *Se observará que el precipitado proteico forma un pellet muy tenue (si había poco pellet celular, a veces no se observa el pellet proteico).*
8. Pasar el sobrenadante que contiene el ADN a un tubo de 1.5 ml que contenga **300 µl de Isopropanol**. Mezclar por inversión varias veces.
9. Centrifugar a 13.000-16.000 x g durante 3 minutos.
10. Eliminar el sobrenadante. Añadir **300 µl de etanol 70%** e invertir varias veces para lavar el pellet de ADN.
Vigilar no perder el pellet de ADN que será muy pequeño o indetectable y será más visible después del lavado de etanol 70%.
11. Centrifugar a 13.000-16.000 x g durante 2 minutos. Cuidadosamente eliminar todo el etanol. Vigilar no perder el pellet de ADN que será muy pequeño o indetectable.
12. Invertir el tubo y dejar secar en papel absorbente durante 5 minutos. *También se puede hacer un pulso con centrifuga y retirar el líquido con micropipeta.*
13. Añadir **30-40 µl de Hydration Solution** del ADN y resuspender con micropipeta.
14. Conservar a 2-8°C. Para almacenajes largos conservar a -20°C o -80°C.

3.3 Extracción a partir de muestras de hisopos

El uso de cepillos de espuma como los que se proveen son los adecuados ya que permiten recuperar casi la totalidad del **Lysis Solution** después del periodo de incubación.

Lisis celular

1. Añadir **600 µl de Lysis Solution** en un microtubo de 2.0 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 + 5 µl de RNasa** e incubar a 37°C durante 30 minutos. **Realizar varios vortex durante el periodo de incubación.**
3. Retirar la cabeza del cepillo de la **Lysis solution**, frotándolo contra las paredes para recoger la máxima cantidad de líquido.

3.2 Extraction from preserved specimens with our REALSWABS Sample Collection Kit

1. Those samples that have been left in an upright position for several days will show a white pellet containing the buccal cells. Using a micropipette resuspend the pellet completely and transfer the entire solution to a new 2.0 ml microtube.
2. Add **1000 µl of Resuspension Solution** and Centrifuge at 13,000-16,000 x g for 2 minutes.
3. Remove the supernatant by decanting **taking care not to lose the cell pellet**. Centrifuge again briefly and remove all the liquid by micropipetting.
4. Add **300 µl of Lysis Solution + 5 µl of Proteinase K + 5 µl of RNase** and resuspend the pellet with micropipette. Incubate at 37°C for 30 minutes. Vortex several times during the incubation period.
5. Add **100 µl of Protein Precipitation Solution**.
6. Vortex vigorously for 30 seconds.
7. Centrifuge at 13,000-16,000 x g for 5 minutes. The protein precipitate will be observed to form a very faint pellet (if there was little cell pellet, sometimes the protein pellet is not observed).
8. Transfer the supernatant containing the DNA to a 1.5 ml tube containing **300 µl of isopropanol**. Mix by inversion several times.
9. Centrifuge at 13,000-16,000 x g for 3 min.
10. Remove the supernatant. Add **300 µl of 70% ethanol** and invert several times to wash the DNA pellet. **Watch not to lose the DNA pellet which will be very small or undetectable and will be more visible after the 70% ethanol wash.**
11. Centrifuge at 13,000-16,000 x g for 2 minutes. Carefully remove all ethanol. Be careful not to lose the DNA pellet which will be very small or undetectable.
12. Invert the tube and allow to dry on absorbent paper for 5 minutes. Alternatively, pulse centrifuge and remove the liquid with a micropipette.
13. Add **30-40 µl of DNA Hydration Solution** and resuspend with micropipette.
14. Store at 2-8°C. For long term storage store at -20°C or -80°C.

3.3 Extraction from swab samples

The use of foam brushes such as those provided are suitable as they allow recovery of almost all of the **Lysis Solution** after the incubation period.

Cell lysis

1. Add **600 µl of Lysis Solution** into a 2.0 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 of Proteinase K + 5 µl of RNasa** and incubate at 37°C for 30 minutes. **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.

Precipitación de proteínas

1. Añadir **200 µl de Protein Precipitation Solution**.
2. Vortex vigorosamente durante 30 segundos.
3. 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. **Vigilar no perder el pellet de ADN que será muy pequeño o indetectable y será más visible después del lavado de etanol 70%.**
4. Centrifugar a 13.000-16.000 x g durante 2 minutos. Cuidadosamente eliminar todo el etanol. Vigilar no perder el pellet de ADN
5. Invertir el tubo y dejar secar en papel absorbente durante 5 minutos.

Hidratación del ADN

1. Añadir **30-40 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.

Protein Precipitation

1. Add **200 µl of Protein Precipitation Solution**
2. Vortex vigorously for 30 seconds.
3. Centrifuge at 13,000-16,000 x g for 5 minutes. 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 minutes.
3. Remove the supernatant. Add **600 µl of 70% ethanol** and invert several times to wash the DNA pellet. **Watch not to lose the DNA pellet which will be very small or undetectable and will be more visible after the 70% ethanol wash.**
4. Centrifuge at 13,000-16,000 x g for 2 minutes. Carefully remove all ethanol. Be careful not to lose the DNA pellet.
5. Invert the tube and allow to dry on absorbent paper for 5 minutes.

DNA hydration

1. Add **30-40 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.

4.GUIA 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. en durviz@durviz.com.

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

6.SIMBOLOS / SYMBOLS

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



B65699985