

REAL SPIN GENOMIC DNA KIT

Ref. **RBMEGS01:** (para **50 EXTRACCIONES**)
 Ref. **RBMEGS02:** (para **250 EXTRACCIONES**)
 Ref. **RBMEGS15:** (para **1000 EXTRACCIONES**)

(for **50 EXTRACTION**)
 (for **250 EXTRACTION**).
 (for **1000 EXTRACTION**).

1. INTRODUCCIÓN

Este kit está designado para una rápida extracción y purificación de ADN genómico de alta calidad a partir de una amplia variedad de muestras incluyendo sangre total, células en cultivo, tejidos animales, colas de ratón, bacterias, levaduras, muestras clínicas (suero, plasma, heces, orina), muestras de forense y tejidos embebidos en parafina.

El kit contiene suficientes reactivos y columnas para realizar extracciones de ADN genómico según el kit de diferentes muestras:

- 200 µl sangre total.
- 200 µl "buffy coat".
- 10⁴-10⁶ células en cultivo.
- 25-50 mg tejido.
- 0.2-0.5 cm cola de ratón.
- 10⁸ bacterias.
- 10⁹ levaduras.
- Secciones de tejidos embebidos en parafina.
- **Para cualquier otro tipo de muestra solicitar el protocolo al servicio técnico de DURVIZ S.L**

El procedimiento incluye una lisis en SDS y proteinasa K, después se añade una solución caotrópica que creará las condiciones necesarias para que el ADN se una a la membrana de fibra de vidrio y finalmente el ADN es eluido con un tampón de elución.

El ADN obtenido es de elevada calidad y puede ser utilizado directamente en PCR, Southern, clonaje, cualquier reacción enzimática, etc .

1. SAMPLE TAKING

This kit is designed for rapid extraction and purification of high quality genomic DNA from a wide variety of samples including whole blood, cultured cells, animal tissues, mouse tails, bacteria, yeast, clinical samples (serum, plasma, stool, urine), forensic samples and paraffin-embedded tissues.

The kit contains sufficient reagents and columns to perform genomic DNA extractions according to the kit from different samples:

- 200 µl whole blood.
- 200 µl buffy coat.
- 104-106 cells in culture.
- 25-50 mg tissue.
- 0.2-0.5 cm mouse tail.
- 108 bacteria.
- 109 yeast.
- Paraffin-embedded tissue sections.
- **For any other type of sample, please request the protocol to DURVIZ S.L. technical service.**

The procedure includes a lysis in SDS and proteinase K, then a chaotropic solution is added to create the necessary conditions for the DNA to bind to the glass fiber membrane and finally the DNA is eluted with an elution buffer.

The DNA obtained is of high quality and can be used directly in PCR, Southern blotting, cloning, any enzymatic reaction, etc...

2. COMPONENTES DEL KIT / KIT COMPONENTS

Componente REAL	Ref.	Envase. (50 Preps)	Envase. (250 Preps)	Envase. (1000 Preps)	T ^a
Lysis Solution	E21	10 ml	50 ml	200 ml	RT
Lysis/Binding Solution	REA01	10 ml	50 ml	200 ml	RT
Proteinase K	REA02	22 mg	110 mg	440 mg	-20 °C
Disinhibition Solution (GHCL 8M)	REA03	16.5 ml	82.5 ml	330 ml	RT
Washing Solution	EP08	10 ml	50 ml	200 ml	RT
Hydration Solution	REA05	10 ml	50 ml	200 ml	RT
Columnas Spin DNA	RSC03	50 unid	250 unid	1000 unid	RT
Collection Tubes	R30	50 unid	250 unid	1000 unid	RT

Equipos y reactivos necesarios y no provistos

- * Isopropanol.
- * Agua Libre de Nucleasas.
- * EDTA 50 mM y 7.5 µl de Lyticasa (75 unidades/ µl) SIGMA ref. L2524
- * PBS con 20 mg/ml de lisozima y/o lisostafina
- * Etanol 100%.
- * Microtubos de 1.5 ml.
- * Microcentrifuga o centrifuga clínica.

Equipment and reagents needed and not provided

- * Isopropanol.
- * Nuclease-free water.
- * 50 mM EDTA and 7.5 µl of Lyticase (75 units/ µl) SIGMA ref. L2524
- * PBS with 20 mg/ml lysozyme and/or lysostaphin
- * 100% ethanol.
- * Microtubes of 1.5 ml.
- * Microcentrifuge or clinical centrifuge.

3.PROTOCOLO GENERAL

3. GENERAL PROCEDURE

El protocolo implica los pasos siguientes:

- Las muestras son lisadas con el **Lysis Solution** adecuado y **Proteinase K**
- Los ácidos nucleicos se unen a la matriz de fibra de vidrio empaquetada en las **Columnas Spin DNA**.
- Los ácidos nucleicos son lavados primero con el **Disinhibition Solution (GHCL8M)** para eliminar los inhibidores de la PCR.
- Lavado de los ácidos nucleicos para eliminar sales, proteínas y otras impurezas.
- Los ácidos nucleicos son eluidos.

3.1 Preparaciones preeliminarias

- Disolver la **Proteinase K** en **1.1 ml** de agua libre de nucleasas (kit 50 extracciones) y en **5.2 ml** (kit 250 extracciones) y conservar a -20°C . Se recomienda realizar varias alícuotas para evitar demasiados ciclos de descongelado-congelado. A esta temperatura es estable durante 1 año.
- Verificar que el **Lysis Solution, Lysis/Binding Solution** no tienen precipitados debido a las bajas temperaturas. Si es necesario, disolver calentando a 37°C .
- Añadir el Etanol 100 % al **Disinhibition Solution (GHCL8M)** indicado en la etiqueta, unos **10 ml** (kit 50 extracciones) y unos **50 ml** (kit 250 extracciones). Mantener el envase bien cerrado para evitar la evaporación del etanol.
- Añadir el Etanol 100 % al **Washing Solution** indicado en la etiqueta, unos **40 ml** (kit 50 extracciones) y unos **200 ml** (kit 250 extracciones). Mantener el envase bien cerrado para evitar la evaporación del etanol.
- **Pre-calentar el Hydration Solution a 70°C puede aumentar el rendimiento de ADN obtenido. Para alguna aplicación posterior puede ser necesario que el ADN esté concentrado, la elución en volúmenes más pequeños de 200 μl incrementará la concentración final de ADN en el eluido, pero reducirá el rendimiento global de ADN obtenido. Para muestras que contenga $< 3 \mu\text{g}$ ADN, se recomienda una elución en 100 μl . Para muestras que contenga $< 1 \mu\text{g}$ ADN, se recomienda una elución en 50 μl .**

3.2 Protocolo de extracción de ADN genómico a partir de sangre total, "buffy coat" y células en cultivo

- 200 μl sangre total.
- 200 μl "buffy coat".
- 10^4 - 10^6 células en cultivo.

Si el material no llega a 200 μl llevar el volumen final de la muestra a 200 μl con agua libre de nucleasas.

The protocol involves the following steps:

- Samples are lysed with the appropriate **Lysis Solution** and **Proteinase K**.
- Nucleic acids are bound to the glass fiber matrix packed in the **Columnas Spin DNA**.
- The nucleic acids are first washed with **Disinhibition Solution (GHCL8M)** to remove PCR inhibitors.
- Nucleic acids are washed to remove salts, proteins and other impurities.
- Nucleic acids are eluted.

3.1 Preliminary preparations

- Dissolve **Proteinase K** in **1.1 ml** of nuclease-free water (kit 50 extractions) and in **5.2 ml** (kit 250 extractions) and store at -20°C . It is recommended to make several aliquots to avoid too many thaw-freeze cycles. At this temperature it is stable for 1 year.
- Verify that the **Lysis Solution, Lysis/Binding Solution** do not have precipitates due to low temperatures. If necessary, dissolve by heating to 37°C .
- Add 100% Ethanol to the **Disinhibition Solution (GHCL8M)** indicated on the label, about **10 ml** (kit 50 extractions) and about **50 ml** (kit 250 extractions). Keep the container tightly closed to avoid evaporation of the ethanol.
- Add 100% Ethanol to the **Washing Solution** indicated on the label, about **40 ml** (kit 50 extractions) and about **200 ml** (kit 250 extractions). Keep the container tightly closed to avoid evaporation of the ethanol.
- **Pre-warming the Hydration Solution to 70°C may increase the yield of DNA obtained. For some subsequent application it may be necessary for the DNA to be concentrated, elution in volumes smaller than 200 μl will increase the final concentration of DNA in the eluate, but will reduce the overall yield of DNA obtained. For samples containing $< 3 \mu\text{g}$ DNA, elution in 100 μl is recommended. For samples containing $< 1 \mu\text{g}$ DNA, a 50 μl elution is recommended.**

3.2 Protocol for extraction of genomic DNA from whole blood, buffy coat and cells in culture

- 200 μl whole blood.
- 200 μl buffy coat.
- 104- 106 cells in culture

If the material does not reach 200 μl , bring the final volume of the sample to 200 μl with nuclease-free water.

1. A 200 µl del material indicado añadir **200 µl del Lysis/Binding Solution + 20 µl Proteinase K**. Mezclar bien. Incubar a 70°C durante 10 minutos.
2. Añadir **100 µl de Isopropanol**. Mezclar bien.
3. Pipetear el lisado en el reservorio de la **Spin Columna DNA** con su **Collection tube**. Centrifugar a **8.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el **Collection tube**.
4. Colocar la **Spin Columna DNA** en un nuevo **Collection tube** y añadir al reservorio **500 µl de Disinhibition Solution (GHCL8M)**. Centrifugar a **12.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el líquido.
5. Añadir **500 µl de Washing Solution** en el reservorio de la **Spin Columna DNA**. Centrifugar a **12.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el líquido.
6. 2º Lavado. Añadir **500 µl de Washing Solution** en el reservorio de la **Spin Columna DNA**. Centrifugar a **14.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el líquido.
7. Centrifugar a máxima velocidad durante **90 segundos para eliminar el etanol residual**.
8. Eliminar el **Collection tube** e insertar el **Spin Columna DNA** en un microtubo de 1.5 ml. Añadir **50-200 µl de Hydration Solution** (precalentado a 70°C) en el reservorio del **Spin Columna DNA**. Incubar 2 minutos.
9. Centrifugar a máxima velocidad durante **60 segundos**. El microtubo contiene ahora el ADN genómico.

3.3 Protocolo de extracción de ADN genómico a partir de 25 mg de Tejidos animales

1. Cortar 25 mg de tejido humano o animal en pequeños trozos y colocar en un microtubo de 1.5 ml. Añadir **180 µl del Lysis Solution + 20 µl Proteinase K**. Mezclar bien. Incubar a 55°C durante 1 hora o hasta que la lisis sea completa, las muestras pueden ser incubadas "overnight".
Las muestras que son difíciles de lisar pueden ser molidas con Ni líquido o pueden ser tratadas directamente con un homogenizador tipo Polytron.
2. Añadir **200 µl de Lysis/Binding Solution**. Vortex. Incubar a 70°C durante 10 minutos. Si se encuentran partículas insolubles, centrifugar 5 minutos a máxima velocidad y traspasar el sobrenadante a un nuevo microtubo.
3. Añadir **100 µl de Isopropanol**. Mezclar bien.
4. Pipetear el lisado en el reservorio de la **Spin Columna DNA** con su **Collection Tube**. Centrifugar a **8.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el **Collection Tube**.
5. Colocar la **Spin Columna DNA** en un nuevo **Collection Tube** y añadir al reservorio **500 µl de Tampón de Disinhibition Solution (GHCL8M)**. Centrifugar a **12.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el líquido.
6. Añadir **500 µl de Washing Solution** en el reservorio de la **Spin Columna DNA**. Centrifugar a **12.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el líquido.
7. 2º Lavado. Añadir **500 µl de Washing Solution** en el reservorio de la **Spin Columna DNA**. Centrifugar a **14.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el líquido.
8. Centrifugar a máxima velocidad durante **90 segundos para eliminar el etanol residual**.
9. Eliminar el **Collection Tube** e insertar el **Spin Columna DNA** en un microtubo de 1.5 ml. Añadir **50-200 µl de Hydration Solution** (precalentado a 70°C) en el reservorio del spin microcolumna. Incubar 2 min.

1. To 200 µl of the indicated material add **200 µl of Lysis/Binding Solution + 20 µl Proteinase K**. Mix well. Incubate at 70°C for 10 minutes.
2. Add **100 µl of Isopropanol**. Mix well.
3. Pipette the lysate into the **Spin Columna DNA** reservoir with its **Collection tube**. Centrifuge at **8,000 rpm for 60 seconds**. Discard the **Collection tube**.
4. Place the **Spin Columna DNA** in a new **Collection tube** and add **500 µl of Disinhibition Solution (GHCL8M)** to the reservoir. Centrifuge at **12,000 rpm for 60 seconds**. Discard the liquid.
5. Add **500 µl of Washing Solution** to the **Spin Columna DNA** reservoir. Centrifuge at 12,000 rpm for 60 seconds. Remove the liquid.
6. 2º Wash. Add 500 µl of **Washing Solution** to the **Spin Columna DNA** reservoir. Centrifuge at **14,000 rpm for 60 seconds**. Eliminate the liquid.
7. Centrifuge at maximum speed for **90 seconds to remove residual ethanol**.
8. Remove the **Collection tube** and insert the **Spin Columna DNA** into a 1.5 ml microtube. Add **50-200 µl of Hydration Solution** (preheated to 70°C) to the **Spin Columna DNA** reservoir. Incubate for 2 minutes.
9. Centrifuge at maximum speed for **60 seconds**. The microtube now contains the genomic DNA.

3.3 Protocol for the extraction of genomic DNA from 25 mg of animal tissues

1. Cut 25 mg of human or animal tissue into small pieces and place into a 1.5 ml microtube. Add **180 µl of Lysis Solution + 20 µl Proteinase K**. Mix well. Incubate at 55°C for 1 hour or until lysis is complete, samples can be incubated "overnight".
Samples that are difficult to lyse can be ground with liquid Ni or can be treated directly with a Polytron type homogenizer.
2. Add **200 µl of Lysis/Binding Solution**. Vortex. Incubate at 70°C for 10 minutes. If insoluble particles are found, centrifuge 5 minutes at maximum speed and transfer the supernatant to a new microtube.
3. Add **100 µl of Isopropanol**. Mix well.
4. Pipette the lysate into the **Spin Columna DNA** reservoir with its **Collection Tube**. Centrifuge at **8,000 rpm for 60 seconds**. Discard the **Collection Tube**.
5. Place the **Spin Columna DNA** in a new **Collection Tube** and add **500 µl of Disinhibition Solution (GHCL8M)** to the reservoir. Centrifuge at **12,000 rpm for 60 seconds**. Discard the liquid.
6. Add **500 µl of Washing Solution** to the **Spin Columna DNA** reservoir. Centrifuge at **12,000 rpm for 60 seconds**. Eliminate the liquid.
7. 2º Wash. Add 500 µl of **Washing Solution** to the **Spin Columna DNA** reservoir. Centrifuge at **14,000 rpm for 60 seconds**. Eliminate the liquid.
8. Centrifuge at maximum speed for **90 seconds to remove residual ethanol**.
9. Remove the **Collection Tube** and insert the **Spin Columna DNA** into a 1.5 ml microtube. Add **50-200 µl of Hydration Solution** (preheated to 70°C) to the spin microcolumn reservoir. Incubate for 2 minutes.

10. **Centrifugar a máxima velocidad durante 60 segundos.** El microtubo contiene ahora el ADN genómico.

3.4 Protocolo de extracción de ADN genómico a partir de 25-50 mg de cola de ratón

1. Cortar 0.2-0.5 cm de cola de ratón en varios trozos y colocar en un microtubo de 1.5 ml. Añadir **180 µl de Lysis Solution + 20 µl Proteinase K**. Mezclar bien. Incubar a 55°C hasta que la lisis sea completa, las muestras pueden ser incubadas "overnight". Para eliminar residuos de huesos o pelos, centrifugar durante 5 minutos a velocidad máxima y traspasar el sobrenadante a un nuevo microtubo.
2. Añadir **200 µl de Lysis/Binding Solution y 100 µl de Isopropanol**. Mezclar bien por vortex.
3. Pipetear el lisado en el reservorio de la **Spin columna DNA** con su **Collection Tube**. Centrifugar a **8.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el **Collection Tube**.
4. Colocar la **Spin columna DNA** en un nuevo **Collection Tube** y añadir al reservorio **500 µl de Disinhibition Solution (GHCL8M)**. Centrifugar a **12.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el líquido.
5. Añadir **500 µl de Washing solution** en el reservorio de la **Spin columna DNA**. Centrifugar a **12.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el líquido.
6. 2º Lavado. Añadir **500 µl de Washing solution** en el reservorio de la **Spin columna DNA**. Centrifugar a **14.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el líquido.
7. Centrifugar a máxima velocidad durante **90 segundos para eliminar el etanol residual**.
8. Eliminar el **Collection tube** e insertar la **Spin columna DNA** en un microtubo de 1.5 ml. Añadir **50-200 µl de Hydration Solution** (precalentado a 70°C) en el reservorio de la **Spin columna DNA**. Incubar 2 minutos.
9. Centrifugar a máxima velocidad durante **60 segundos**. El microtubo contiene ahora el ADN genómico.

3.5 Protocolo de extracción de ADN genómico a partir de 10⁹ bacterias

1. Centrifugar 1-1.5 ml de cultivo bacteriano. Eliminar el sobrenadante. Resuspender el pellet en **180 µl de Lysis Solution y luego añadir 20 µl Proteinase K**. Vortex e incubar a 55°C hasta que se complete la lisis. Para aquellas cepas difíciles de lisar, especialmente las Gram+, es necesaria una incubación previa con enzimas líticas. Resuspender el pellet con 200 µl de PBS con 20 mg/ml de lisozima y/o lisostafina (10 mg/ml), incubar 30 minutos a 37°C, luego añadir **20 µl Proteinase K** e incubar a 55°C hasta que se complete la lisis.
2. Añadir **200 µl de Lysis/Binding Solution**. Vortex. Incubar a 70°C durante 10 minutos.
3. Añadir **100 µl de Isopropanol**. Mezclar bien.
4. Pipetear el lisado en el reservorio de la **Spin columna DNA** con su **Collection Tube**. Centrifugar a **8.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el **Collection Tube**.
5. Colocar la **Spin columna DNA** en un nuevo **Collection Tube** e añadir al reservorio **500 µl de Disinhibition Solution (GHCL8M)**. Centrifugar a **12.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el líquido.

10. **Centrifuge at maximum speed for 60 seconds.** The microtube now contains the genomic DNA.

3.4 Protocol for extraction of genomic DNA from 25-50 mg mouse tails

1. Cut 0.2-0.5 cm of mouse tail into several pieces and place in a 1.5 ml microtube. Add **180 µl of Lysis Solution + 20 µl Proteinase K**. Mix well. Incubate at 55°C until lysis is complete, samples can be incubated "overnight". To remove bone or hair residues, centrifuge for 5 minutes at maximum speed and transfer the supernatant to a new microtube.
2. Add **200 µl of Lysis/Binding Solution and 100 µl of Isopropanol**. Mix well by vortexing.
3. Pipette the lysate into the **Spin columna DNA** reservoir with its **Collection Tube**. Centrifuge at **8000 rpm for 60 seconds**. Discard the **Collection Tube**.
4. Place the **Spin columna DNA** in a new **Collection Tube** and add **500 µl of Disinhibition Solution (GHCL8M)** to the reservoir. Centrifuge at **12,000 rpm for 60 seconds**. Discard the liquid.
5. Add **500 µl of Washing solution** to the **Spin columna DNA** reservoir. Centrifuge at **12,000 rpm for 60 seconds**. Remove the liquid.
6. 2nd Wash. Add **500 µl of Washing solution** to the **Spin columna DNA** reservoir. Centrifuge at **14,000 rpm for 60 seconds**. Eliminate the liquid.
7. Centrifuge at maximum speed for **90 seconds to remove residual ethanol**.
8. Remove the **Collection tube** and insert the **Spin columna DNA** into a 1.5 ml microtube. Add **50-200µl of Hydration Solution** (preheated to 70°C) to the **Spin columna DNA** reservoir. Incubate for 2 minutes.
9. Centrifuge at maximum speed for **60 seconds**. The microtube now contains the genomic DNA.

3.5 Protocol for the extraction of genomic DNA from 10⁹ bacteria

1. Centrifuge 1-1.5 ml of bacterial culture. Discard the supernatant. Resuspend the pellet in **180 µl of Lysis Solution and then add 20 µl Proteinase K**. Vortex and incubate at 55°C until lysis is complete. For those strains that are difficult to lyse, especially Gram+ strains, prior incubation with lytic enzymes is necessary. Resuspend the pellet with 200 µl of PBS with 20 mg/ml lysozyme and/or lysostaphin (10 mg/ml), incubate 30 minutes at 37°C, then add **20 µl Proteinase K** and incubate at 55°C until lysis is complete.
2. Add **200 µl of Lysis/Binding Solution**. Vortex. Incubate at 70°C for 10 minutes.
3. Add **100 µl of Isopropanol**. Mix well.
4. Pipette the lysate into the **Spin columna DNA** reservoir with its **Collection Tube**. Centrifuge at **8,000 rpm for 60 seconds**. Discard the **Collection Tube**.
5. Place the **Spin columna DNA** in a new **Collection Tube** and add **500 µl of Disinhibition Solution (GHCL8M)** to the reservoir. Centrifuge at **12,000 rpm for 60 seconds**. Discard the liquid.

6. **Añadir 500 µl de Washing Solution** en el reservorio de la **Spin columnna DNA**. **Centrifugar a 12.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el líquido.
7. 2º Lavado. **Añadir 500 µl de Washing Solution** en el reservorio de la **Spin columnna DNA**. **Centrifugar a 14.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el líquido.
8. **Centrifugar a máxima velocidad durante 90 segundos para eliminar el etanol residual**.
9. Eliminar el **Collection Tube** y insertar la **Spin columnna DNA** en un microtubo de 1.5 ml. **Añadir 50-200 µl de Hydration Solution** (precalentado a 70°C) en el reservorio de la **Spin columnna DNA**. Incubar 2 minutos.
10. **Centrifugar a máxima velocidad durante 60 segundos**. El microtubo contiene ahora el ADN genómico.

3.6 Protocolo de extracción de ADN genómico a partir de 10⁸ levaduras

1. Centrifugar 13000-16000 x g durante 2 minutos 1.5-3 ml de cultivo de levadura. Eliminar el sobrenadante. **Resuspender el pellet en 293 µl de EDTA 50 mM y 7.5 µl de Lyticasa** (75 unidades/ µl) SIGMA ref. L2524. **Incubar a 37°C durante 30-60 minutos**. Centrifugar a máxima velocidad y eliminar el sobrenadante. Resuspender el pellet con **180 µl de Lysis Solution y luego añadir 20 µl Proteinase K**. Vortex. Incubar a 55°C hasta que la lisis se complete.
2. **Añadir 200 µl de Lysis/Binding Solution**. Vortex. Incubar a 70°C durante 10 minutos.
3. **Añadir 100 µl de Isopropanol**. Mezclar bien.
4. Pipetear el lisado en el reservorio de la **Spin columnna DNA** con su **Collection Tube**. **Centrifugar a 8.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el **Collection Tube**.
5. Colocar la **Spin columnna DNA** en un nuevo **Collection Tube** y añadir al reservorio **500 µl de Disinhibition Solution (GHCL8M)**. **Centrifugar a 12.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el líquido.
6. **Añadir 500 µl de Washing Solution** en el reservorio de la **Spin columnna DNA**. **Centrifugar a 12.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el líquido.
7. 2º Lavado. **Añadir 500 µl de Washing Solution** en el reservorio de la **Spin columnna DNA**. **Centrifugar a 14.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el líquido.
8. **Centrifugar a máxima velocidad durante 90 segundos para eliminar el etanol residual**.
9. Eliminar el **Collection Tube** y insertar la **Spin columnna DNA** en un microtubo de 1.5 ml. **Añadir 50-200µl de Hydration Solution** (precalentado a 70°C) en el reservorio de la **Spin columnna DNA**. Incubar 2 minutos.
10. **Centrifugar a máxima velocidad durante 60 segundos**. El microtubo contiene ahora el ADN genómico.

6. **Add 500 µl of Washing Solution** to the **Spin columnna DNA** reservoir. **Centrifuge at 12,000 rpm for 60 seconds**. Eliminate the liquid.
7. 2º Wash. **Add 500 µl of Washing Solution** to the **Spin columnna DNA** reservoir. **Centrifuge at 14,000 rpm for 60 seconds**. Eliminate the liquid.
8. **Centrifuge at maximum speed for 90 seconds to remove residual ethanol**.
9. Remove the **Collection Tube** and insert the **Spin columnna DNA** into a 1.5 ml microtube. **Add 50-200 µl of Hydration Solution** (preheated to 70°C) to the **Spin columnna DNA** reservoir. Incubate for 2 minutes.
10. **Centrifuge at maximum speed for 60 seconds**. The microtube now contains the genomic DNA.

3.6 Protocol for extraction of genomic DNA from 10⁸ yeast cultures

1. Centrifuge 13000-16000 x g for 2 minutes 1.5-3 ml of yeast culture. Remove the supernatant. **Resuspend the pellet in 293 µl of 50 mM EDTA and 7.5 µl of Lyticase** (75 units/ µl) SIGMA ref. L2524. **Incubate at 37°C for 30-60 minutes**. Centrifuge at maximum speed and remove the supernatant. Resuspend the pellet with **180 µl of Lysis Solution and then add 20 µl Proteinase K**. Vortex. Incubate at 55°C until lysis is complete.
2. **Add 200 µl of Lysis/Binding Solution**. Vortex. Incubate at 70°C for 10 minutes.
3. **Add 100 µl of Isopropanol**. Mix well.
4. Pipette the lysate into the **Spin columnna DNA** reservoir with its **Collection Tube**. **Centrifuge at 8000 rpm for 60 seconds**. Discard the **Collection Tube**.
5. Place the **Spin columnna DNA** in a new **Collection Tube** and add **500 µl of Disinhibition Solution (GHCL8M)** to the reservoir. **Centrifuge at 12,000 rpm for 60 seconds**. Discard the liquid.
6. **Add 500 µl of Washing Solution** to the **Spin columnna DNA** reservoir. **Centrifuge at 12,000 rpm for 60 seconds**. Remove the liquid.
7. 2º Wash. **Add 500 µl of Washing Solution** to the **Spin columnna DNA** reservoir. **Centrifuge at 14,000 rpm for 60 seconds**. Eliminate the liquid.
8. **Centrifuge at maximum speed for 90 seconds to remove residual ethanol**.
9. Remove the **Collection Tube** and insert the **Spin columnna DNA** into a 1.5 ml microtube. **Add 50-200µl of Hydration Solution** (preheated to 70°C) to the **Spin columnna DNA** reservoir. Incubate for 2 minutes.
10. **Centrifuge at maximum speed for 60 seconds**. The microtube now contains the genomic DNA.

4. ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD / STORAGE AND STABILITY

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

ATENCIÓN: El *Lysis/Binding Solution* y el *Disinhibition Solution (GHCL8M)* contiene guanidine hydrochloride que es irritante, utilizar guantes y gafas.

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

CAUTION: *Lysis/Binding Solution* and *Disinhibition Solution (GHCL8M)* contain guanidine hydrochloride which is irritant, wear gloves and goggles.

5. 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>		Fabricante / <i>Manufacturer</i>
	Limitación de temperatura / <i>Temperature limitation</i>		Uso exclusivo en investigación / <i>Research use only</i>
	Fecha de caducidad / <i>Expiration date</i>		Irritante, sensibilizante y nocivo / <i>Irritant, sensitizing and harmful</i>
	Lote / <i>Lot</i>		Peligro para la salud / <i>Health hazard</i>
	Contiene suficiente para n pruebas / <i>Contains enough for n tests</i>		

B65699985