

REAL SPIN FOOD-STOOL BACTERIA KIT

Ref. **RBMEGS03:** (para **50 EXTRACCIONES**)
 Ref. **RBMEGS04:** (para **250 EXTRACCIONES**)

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

1. INTRODUCCIÓN

SAMPLE TAKING

Este kit está optimizado para una eficiente y rápida extracción de ADN bacteriano (Listeria, Salmonella, E.coli, etc) listo para PCR a partir de medios de pre-enriquecimiento (agua peptonada) o enriquecimiento tal y como se establece en las diferentes normas ISO, de diferentes muestras de alimentos y heces, utilizando para ello MicroSpin columnas con membranas de fibra de vidrio que unen selectivamente el ADN.

El procedimiento incluye una centrifugación de 1 ml de medio de pre-enriquecimiento (agua peptonada) o enriquecimiento para concentrar las células, las células son lisadas durante un periodo de incubación con Lisozima (suministrada con el kit). Después una digestión con Proteinasa K (suministrada con el kit) y limpieza de la mezcla de lisis por centrifugación y unión del ADN a las membranas de fibra de vidrio empaquetadas en MicroSpin columnas. El ADN que se une es purificado mediante varios lavados para eliminar los potenciales inhibidores de la PCR y finalmente es eluido.

This kit is optimized for efficient and rapid extraction of PCR-ready bacterial DNA (Listeria, Salmonella, E.coli, etc.) from pre-enrichment (peptone water) or enrichment media as stated in the different ISO standards, from different food and stool samples, using MicroSpin columns with glass fiber membranes that selectively bind DNA.

The procedure includes a centrifugation of 1 ml of pre-enrichment (peptonized water) or enrichment medium to concentrate the cells, the cells are lysed during an incubation period with Lysozyme (supplied with the kit). This is followed by digestion with Proteinase K (supplied with the kit) and cleaning of the lysis mixture by centrifugation and binding of the DNA to glass fiber membranes packed in MicroSpin columns. The bound DNA is purified by several washes to remove potential PCR inhibitors and finally eluted. 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.

2. COMPONENTES DEL KIT / KIT COMPONENTS

| Componentes/ Components | REF. | Ref.RBMEGS01 (50 Extrac.) | Ref.RBMEGS02 (250 Extrac.) | Tª |
|--|-------|------------------------------|-------------------------------|--------|
| Tampón de Reacción Lisozima/ Lysozyme Reaction Buffer | REA08 | 15 ml | 75 ml | RT |
| Tampón de Lisis /Unión/ Lysis Buffer / Union | REA01 | 15 ml | 75 ml | RT |
| Lisozima*/ Lysozyme | REA07 | 12 mg | 60 mg | -20 °C |
| Proteinasa K*/ Proteinase K | REA02 | 22 mg | 105 mg | -20 °C |
| Tampón de Desinhibición*/ Disinhibition Buffer | REA03 | 16.5 ml | 82.5 ml | RT |
| Tampón de Lavado*/ Wash Buffer | REA04 | 10 ml | 50 ml | RT |
| Tampón de Elución/ Elution Buffer | REA05 | 10 ml | 50 ml | RT |
| MicroSpin Columnas/ MicroSpin Columns | RSC01 | 50 unid | 250 unid | RT |
| Tubos de recogida/ Collection tubes | R30 | 100 unid | 500 unid | RT |

* Ver en el apartado de preparaciones preliminares como preparar estas soluciones. / See the section on preliminary preparations on how to prepare these solutions.

Equipos y reactivos necesarios y no provistos

- * Isopropanol.
- * Etanol 100%.
- * Microtubos de 1.5 ml.
- * Microcentrifuga o centrifuga clínica.

Equipment and reagents needed and not provided

- * Isopropanol.
- * 100% ethanol.
- * Microtubes of 1.5 ml.
- * Microcentrifuge or clinical centrifuge

3. PROTOCOLO GENERAL

- Disolver la proteinasa K en **1.10 ml** de agua libre de nucleasas (kit 50 extracciones) y en **5.25 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.
- Disolver la Lisozima en **1.10 ml** de agua libre de nucleasas (kit 50 extracciones) y en **5.25 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 Tampón de Lisis/ Unión no tiene precipitados debido a las bajas temperaturas. Si es necesario, disolver y calentarlo a 37°C .
- Añadir el Etanol 100 % al Tampón de Desinhibición 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 Tampón de Lavado 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 Tampón de Elución a 70°C .

2.2 Protocolo de extracción de ADN bacteriano a partir de 1-1.5 ml de medio de pre-enriquecimiento o enriquecimiento

1. Transferir 1-1.5 ml de medio de pre-enriquecimiento o enriquecimiento a un microtubo de 1.5 ml y **centrifugar 5 minutos a 12.000-14.000 rpm. Eliminar el sobrenadante.**
2. Añadir **280 μl del Tampón de Reacción Lisozima + 20 μl Lisozima.** Mezclar bien con micropipeta para resuspender el pellet bacteriano. Incubar a 37°C durante 30 minutos.
3. Añadir **300 μl del Tampón de Lisis/ Unión + 20 μl Proteinasa K.** Mezclar bien. Incubar a 70°C durante 10 minutos.
4. Añadir **150 μl de Isopropanol.** Mezclar bien y centrifugar 60 segundos a 14.000 rpm.
5. Añadir el sobrenadante en el reservorio de la Spin microcolumna con su tubo de recogida. **Centrifugar a 8.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el tubo de recogida.
6. Colocar la MicroSpin columna en un nuevo tubo de recogida y añadir al reservorio **500 μl de Tampón de Desinhibición. Centrifugar a 8.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el líquido.
7. **Añadir 500 μl de Tampón de Lavado** en el reservorio de la Spin microcolumna. **Centrifugar a 12.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el líquido.
8. 2º Lavado. **Añadir 500 μl de Tampón de Lavado** en el reservorio de la Spin microcolumna. **Centrifugar a 14.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el líquido.
9. **Centrifugar a máxima velocidad durante 2 minutos para eliminar el etanol residual.**
10. Eliminar el tubo de recogida e insertar la spin microcolumna en un microtubo de 1.5 ml. **Añadir 100 μl de Tampón de elución** (precalentado a 70°C) en el reservorio de la spin microcolumna. Incubar 1 minuto.

3. GENERAL PROCEDURE

11. **Centrifugar a máxima velocidad durante 60 segundos.** El microtubo contiene ahora el ADN bacteriano.
 - Dissolve Proteinase K in **1.10 ml** of nuclease-free water (kit 50 extractions) and in **5.25 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.
 - Dissolve Lysozyme in **1.10 ml** of nuclease-free water (kit 50 extractions) and in **5.25 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/Binding Buffer does not have precipitates due to the low temperatures. If necessary, dissolve and heat to 37°C .
 - Add 100 % Ethanol to the Disinhibition Buffer 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 Wash Buffer 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-heat the Elution Buffer to 70°C .

2.2 Protocol for extraction of bacterial DNA from 1-1.5 ml of pre-enrichment or enrichment media

1. Transfer 1-1.5 ml of pre-enrichment or enrichment medium to a 1.5 ml microtube and **centrifuge for 5 minutes at 12,000-14,000 rpm. Discard the supernatant.**
2. Add **280 μl of Lysozyme Reaction Buffer + 20 μl Lysozyme.** Mix well with micropipette to resuspend the bacterial pellet. Incubate at 37°C for 30 minutes.
3. Add **300 μl Lysis/ Binding Buffer + 20 μl Proteinase K.** Mix well. Incubate at 70°C for 10 minutes.
4. Add **150 μl Isopropanol.** Mix well and centrifuge 60 seconds at 14,000 rpm.
5. Add the supernatant to the Spin microcolumn reservoir with the collection tube. **Centrifuge at 8,000 rpm for 60 seconds.** Discard the collection tube.
6. Place the MicroSpin column in a new collection tube and add **500 μl of Deinhibition Buffer to the reservoir. Centrifuge at 8,000 rpm for 60 seconds.** Discard the liquid.
7. Add **500 μl of Wash Buffer** to the Spin microcolumn reservoir. **Centrifuge at 12,000 rpm for 60 seconds.** Remove the liquid.
8. 2º Wash. Add **500 μl of Wash Buffer** to the Spin microcolumn reservoir. **Centrifuge at 14,000 rpm for 60 seconds.** Remove the liquid.
9. **Centrifuge at maximum speed for 2 minutes to remove residual ethanol.**
10. Remove the collection tube and insert the spin microcolumn into a 1.5 ml microtube. **Add 100 μl of Elution Buffer** (pre-warmed to 70°C) to the spin microcolumn reservoir. Incubate for 1 minute.



11. **Centrifuge at maximum speed for 60 seconds.** The microtube now contains the bacterial DNA. 104- 106 cells in culture

4. ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD /

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

ATENCION: El Tampón de Lisis/Unión y el Tampón de Desinhibición contiene guanidine hydrochloride que es irritante, utilizar guantes y gafas.

STORAGE AND STABILITY

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

CAUTION: Lysis/Union Buffer and Disinhibition Buffer contain guanidine hydrochloride which is irritating, use 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> |
| | Limitación de temperatura / <i>Temperature limitation</i> |
| | Fecha de caducidad / <i>Expiration date</i> |
| | Lote / <i>Lot</i> |
| | Contiene suficiente para n pruebas / <i>Contains enough for n tests</i> |
| | Fabricante / <i>Manufacturer</i> |
| | Uso exclusivo en investigación / <i>Research use only</i> |



B65699985