

# REAL SPIN FOOD-STOOL KIT

Ref. **RBMEGS05:** (para **50 EXTRACCIONES**)  
 Ref. **RBMEGS06:** (para **250 EXTRACCIONES**)

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

## 1. INTRODUCCIÓN

Este kit ha sido optimizado para una eficiente y rápida purificación de **ADN a partir de heces frescas o congeladas y de varias muestras de alimentos (materias primas y alimentos procesados)**.

Después de homogenizar las muestras, el ADN puede ser extraído con el Tampón de extracción, la mezcla de lisis es centrifugada para eliminar contaminantes y desechos residuales. El sobrenadante es mezclado con el Tampón de unión + proteinasa K, incubado a 70°C durante 10 minutos y luego isopropanol para crear las condiciones apropiadas para una óptima unión del ADN a la membrana de sílica de la columna. Después 2 lavados con tampones diferentes para una eficiente eliminación de los potenciales inhibidores de la PCR. Finalmente, el ADN es eluido y está listo para ser utilizado en las subsiguientes reacciones.

## SAMPLE TAKING

This kit has been optimized for efficient and rapid **DNA purification from fresh or frozen stool and various food samples (raw materials and processed foods)**.

After homogenizing the samples, the DNA can be extracted with the Extraction Buffer, the lysis mixture is centrifuged to remove contaminants and residual debris. The supernatant is mixed with Binding Buffer + Proteinase K, incubated at 70°C for 10 minutes and then isopropanol to create the appropriate conditions for optimal DNA binding to the silica membrane of the column. Then 2 washes with different buffers for efficient removal of potential PCR inhibitors. Finally, the DNA is eluted and ready to be used in subsequent reactions.

## 2.COMONENTES DEL KIT / KIT COMPONENTS

Componentes/ Components	REF.	Ref.RBMEGS01 (50 Extrac.)	Ref.RBMEGS02 (250 Extrac.)	Tª
Tampón de Extracción CTAB/ CTAB Extraction Buffer	REA01	65 ml	325 ml	RT
Tampón de Unión/ Union Buffer	REA07	15 ml	65 ml	RT
Proteinasa K*/ Proteinase K	REA02	30 mg	2 x 75 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
MicroSipn Columnas/ MicroSipn 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

- \* Etanol 100%.
- \* Microtubos de 1.5 ml.
- \* Microcentrifuga o centrifuga clínica.
- \* Homogenizador eléctrico de mano y/o nitrógeno líquido para procesar las muestras previamente.
- \* Vortex.
- \* Baño para incubar a 80°C.

### Equipment and reagents needed and not provided

- \* 100% ethanol.
- \* 1.5 ml microtubes.
- \* Microcentrifuge or clinical centrifuge.
- \* Hand-held electric homogenizer and/or liquid nitrogen to pre-process the samples.
- \* Vortex.
- \* Bath for incubation at 80°C.

**2.1 Preparaciones preeliminarias**

- Disolver la proteínasa K en **1.3 ml** (50 extracciones) o en **2 x 3.35 ml** (250 extracciones) en agua libre de nucleasas y conservar a  $-20^{\circ}\text{C}$ . **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 calentando a  $37^{\circ}\text{C}$ .
- **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  $70^{\circ}\text{C}$  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  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$ . Para muestras que contenga  $< 1 \mu\text{g}$  ADN, se recomienda una elución en 35-50  $\mu\text{l}$ .**

**2.2 Protocolo de extracción de ADN a partir de 200 mg de heces frescas o secas**

**NOTA:** Se recomienda comenzar con cantidades grandes de heces cuando el ADN no se encuentra distribuido homogéneamente o se encuentra en pequeñas cantidades en la muestra. Se pueden procesar muestras de menor tamaño al indicado sobre todo cuando se requiere eliminar al máximo los posibles inhibidores de la PCR.

En general, para resultados óptimos de PCR utilizar la mínima cantidad posible de ADN eluido, el volumen de eluido nunca deberá exceder del 10 % del volumen final de la mezcla de PCR. Se recomienda añadir BSA a una concentración final de  $0.1 \mu\text{g} / \mu\text{l}$  de la mezcla de PCR y utilizar polimerasa HOT Star.

1. Pesar **180-200 mg de heces** en un microtubo de 2.0 ml y añadir **1.20 ml de Tampón de Extracción CTAB**. Vortex vigorosamente durante 1 minuto. Si no se observa una solución homogénea será necesario el uso de un homogenizador eléctrico de mano.  
*Si la muestra es líquida pipetear 200  $\mu\text{l}$  en un microtubo.*
2. **Incubar a  $70^{\circ}\text{C}$  durante 30-60 minutos.** Repetir el vortex varias veces durante la incubación.  
*Para la detección de ADN humano es suficiente incubar a  $70^{\circ}\text{C}$ , para la detección de bacterias o parásitos incubar a  $80^{\circ}\text{C}$  y Para la detección de células difíciles de lisar, como algunas bacterias o parásitos, la temperatura de incubación se puede incrementar a  $95^{\circ}\text{C}$  si fuera necesario.*
3. **Centrifugar a 14.000 rpm durante 10 minutos.** Aparecerá un pellet y en la superficie una capa de grasa, introducir la punta de pipeta atravesando esta capa superficial, intentando recoger sólo **500  $\mu\text{l}$  de sobrenadante** que es el líquido transparente con color (evitar coger pellet y capa superficial) y colocar en un microtubo de 2.0 ml.

**2.1 Preliminary preparations**

- Dissolve Proteinase K in **1.3 ml** (50 extractions) or in **2 x 3.35 ml** (250 extractions) in nuclease-free water and store at  $-20^{\circ}\text{C}$ . **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 by heating to  $37^{\circ}\text{C}$ .
- **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 the 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-heating the Elution Buffer to  $70^{\circ}\text{C}$  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  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  is recommended. For samples containing  $< 1 \mu\text{g}$  DNA, a 35-50  $\mu\text{l}$  elution is recommended.**

**2.2 Protocol for DNA extraction from 200 mg of fresh or dried feces**

**NOTE:** It is recommended to start with large amounts of stool when DNA is not homogeneously distributed or is found in small amounts in the sample. Smaller sample sizes than indicated can be processed especially when maximum removal of potential PCR inhibitors is required.

In general, for optimal PCR results use the minimum amount of eluted DNA possible, the volume of eluate should never exceed 10 % of the final volume of the PCR mixture. It is recommended to add BSA to a final concentration of  $0.1 \mu\text{g} / \mu\text{l}$  of the PCR mixture and use HOT Star polymerase.

1. Weigh **180-200 mg of feces** into a 2.0 ml microtube and add **1.20 ml of CTAB Extraction Buffer**. Vortex vigorously for 1 minute. If a homogeneous solution is not observed it will be necessary to use a hand held electric homogenizer.  
*If the sample is liquid pipette 200  $\mu\text{l}$  into a microtube.*
2. **Incubate at  $70^{\circ}\text{C}$  for 30-60 minutes.** Repeat vortexing several times during incubation.  
*For detection of human DNA it is sufficient to incubate at  $70^{\circ}\text{C}$ , for detection of bacteria or parasites incubate at  $80^{\circ}\text{C}$  and For detection of difficult to lyse cells, such as some bacteria or parasites, the incubation temperature can be increased to  $95^{\circ}\text{C}$  if necessary.*
3. **Centrifuge at 14,000 rpm for 10 minutes.** A pellet will appear and on the surface a layer of fat, introduce the pipette tip through this surface layer, trying to collect only **500  $\mu\text{l}$  of supernatant** which is the transparent liquid with color (avoid catching pellet and surface layer) and place in a 2.0 ml microtube.

4. Añadir **25 µl Proteínasa K** a los 500 µl de sobrenadante. Mezclar bien. **Incubar a 70°C durante 10 minutos.**
5. Añadir **250 µl del Tampón de Unión** a los 500 µl de sobrenadante. Mezclar bien por vortex.
6. Añadir en el reservorio de la Spin microcolumna con su tubo de recogida. **Centrifugar a 10.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el tubo de recogida.
7. Colocar la MicroSpin columna en un nuevo tubo de recogida y añadir al reservorio **500 µl de Tampón de Desinhibición.** **Centrifugar a 12.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el líquido.
8. **Añadir 700 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 3 minutos para eliminar el etanol residual.**
10. Eliminar el tubo de recogida y insertar la spin microcolumna en un microtubo de 1.5 ml. **Añadir 50-200 µl de Tampón de elución** (precalentado a 70°C) en el reservorio de la spin microcolumna. Incubar 2 minutos.
11. **Centrifugar a máxima velocidad durante 60 segundos.** El microtubo contiene ahora el ADN.bacteriano.

### **2.3 Protocolo de extracción de ADN a partir de muestras de alimentos**

Dada la gran variedad de muestras que abarcan los alimentos, origen vegetal, origen animal, alimentos procesados, materias primas, etc, se hace difícil presentar un protocolo universal para todas las muestras. Es por esto que el Departamento Técnico de DURVIZ puede estudiar y ponerle a punto su protocolo específico para su determinado tipo de muestra.

1. Pesar **100-200 mg** de la muestra en un microtubo de 2.0 ml y añadir **1.2 ml de Tampón CTAB + 25 µl Proteínasa K** Vortex vigorosamente.

***El principal y más importante paso para obtener buenos rendimientos es una buena rotura y homogenización de la muestra. En todos los casos y para una mayor efectividad se debería utilizar nitrógeno líquido para pulverizar la muestra.***

*Como norma general en muestras sólida (salchichas, embutidos, etc), preparar varios fragmentos y homogenizar con un homogenizador eléctrico de mano; En muestras sólidas en polvo (harinas, etc.) homogenizar con un homogenizador eléctrico de mano; En muestras sólidas de gran tamaño (copos de maíz, chocolate, galletas, etc) utilizar un molinillo de café para pulverizar una muestra grande y luego pesar la cantidad requerida de polvo; En muestras líquidas utilizar directamente 200 µl. Se pueden utilizar también los diferentes rotores + partículas que existen en el mercado.*

4. Add **25 µl Proteínasa K** to the 500 µl supernatant. Mix well. **Incubate at 70°C for 10 minutes.**
5. Add **250 µl of Binding Buffer** to the 500 µl of supernatant I. Mix well by vortexing.
6. Add to the Spin microcolumn reservoir with its collection tube. **Centrifuge at 10,000 rpm for 60 seconds.** Discard the collection tube.
7. Place the MicroSpin column in a new collection tube and add **500 µl of Deinhhibition Buffer to the reservoir.** **Centrifuge at 12,000 rpm for 60 seconds.** Discard the liquid.
8. **Add 700 µl of Wash Buffer** to the Spin microcolumn reservoir. **Centrifuge at 14,000 rpm for 60 seconds.** Discard the liquid.
9. **Centrifuge at maximum speed for 3 minutes to remove residual ethanol.**
10. Remove the collection tube and insert the spin microcolumn into a 1.5 ml microtube. **Add 50-200 µl of Elution Buffer** (preheated to 70°C) to the spin microcolumn reservoir. Incubate for 2 minutes.
11. **Centrifuge at maximum speed for 60 seconds.** The microtube now contains the bacterial DNA.

### **2.3 Protocol for DNA extraction from food samples.**

Given the wide variety of samples that include food, plant origin, animal origin, processed food, raw materials, etc., it is difficult to present a universal protocol for all samples. This is why DURVIZ Technical Department can study and fine-tune your specific protocol for your particular type of sample.

1. Weigh **100-200 mg** of the sample in a 2.0 ml microtube and add **1.2 ml of CTAB Buffer + 25 µl Proteínasa K** Vortex vigorously.

**The main and most important step to obtain good yields is a good sample breakage and homogenization which will be specific for each type of sample. In all cases and for greater effectiveness, liquid nitrogen should be used to pulverize the sample.**

As a general rule for solid samples (sausages, sausages, etc.), prepare several fragments and homogenize with a hand-held electric homogenizer; For solid powder samples (flours, etc.) homogenize with a hand-held electric homogenizer; For large solid samples (corn flakes, chocolate, cookies, etc.) use a coffee grinder to pulverize a large sample and then weigh the required amount of powder; For liquid samples use 200 µl directly. You can also use the different rotors + particles available on the market.

1. **Incubar a 65°C durante 30 minutos.** Repetir el vortex varias veces durante la incubación.
2. **Centrifugar a 14.000 rpm durante 5-10 minutos.** Aparecerá un pellet y en la superficie una capa de grasa, introducir la punta de pipeta atravesando esta capa superficial, intentando recoger sólo **500 µl de sobrenadante** que es el líquido transparente con color (evitar coger pellet y capa superficial) y colocar en un microtubo de 1.5 ml nuevo.
3. Añadir **250 µl del Tampón de Unión a los 500 µl** de sobrenadante. Mezclar bien por vortex.
4. Añadir en el reservorio de la Spin microcolumna con su tubo de recogida. **Centrifugar a 10.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el tubo de recogida.
5. Colocar la MicroSpin columna en un nuevo tubo de recogida y añadir al reservorio **500 µl de Tampón de Desinhibición. Centrifugar a 12.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el líquido.
6. **Añadir 700 µl de Tampón de Lavado** en el reservorio de la Spin microcolumna. **Centrifugar a 14.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el líquido.
7. **Centrifugar a máxima velocidad durante 3 minutos para eliminar el etanol residual.**
8. Eliminar el tubo de recogida y insertar la spin microcolumna en un microtubo de 1.5 ml. **Añadir 50-200 µl de Tampón de elución** (precalentado a 70°C) en el reservorio de la spin microcolumna. Incubar 2 minutos.
9. **Centrifugar a máxima velocidad durante 60 segundos.** El microtubo contiene ahora el ADN.

1. **Incubate at 65°C for 30 minutes.** Repeat vortexing several times during incubation.
2. **Centrifuge at 14,000 rpm for 5-10 minutes.** A pellet will appear and a fatty layer will appear on the surface, introduce the pipette tip through this surface layer, trying to collect only **500 µl of supernatant** which is the clear colored liquid (avoid catching pellet and surface layer) and place in a new 1.5 ml microtube.
3. Add **250 µl of Binding Buffer** to the 500 µl of supernatant. Mix well by vortexing.
4. Add to the Spin microcolumn reservoir with its collection tube. **Centrifuge at 10,000 rpm for 60 seconds.** Discard the collection tube.
5. Place the MicroSpin column in a new collection tube and add **500 µl of Deinhibition Buffer to the reservoir. Centrifuge at 12,000 rpm for 60 seconds.** Discard the liquid.
6. **Add 700 µl of Wash Buffer** to the Spin microcolumn reservoir. **Centrifuge at 14,000 rpm for 60 seconds.** Discard the liquid.
7. **Centrifuge at maximum speed for 3 minutes to remove residual ethanol.**
8. Remove the collection tube and insert the spin microcolumn into a 1.5 ml microtube. **Add 50-200 µl of Elution Buffer** (preheated to 70°C) to the spin microcolumn reservoir. Incubate for 2 minutes.
9. **Centrifuge at maximum speed for 60 seconds.** The microtube now contains the DNA.

#### 4. ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD /

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

**ATENCIÓN:** 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 Deinhibition 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](mailto:durviz@durviz.com).

For any further questions or doubts about the protocol, please contact DURVIZ s.l. technical service at [durviz@durviz.com](mailto: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>