

REAL SPIN BLOOD DNA KIT

Ref. **RBMEGS08:** (para **50 EXTRACCIONES**)
Ref. **RBMEGS09:** (para **250 EXTRACCIONES**)

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

1.INTRODUCCIÓN

Este kit está designado para una rápida extracción y purificación de **ADN genómico de alta calidad a partir de sangre total, suero, plasma y fluidos biológicos** utilizando Spin columnas con membrana de sílica que une selectivamente el ADN

Este Kit utiliza un nuevo Tampón de Lisis / Unión formulado específicamente para la extracción de ADN a partir de muestras de sangre para la obtención de un alto rendimiento.

Características:

- Para una rápida obtención de ADN de elevada calidad y listo para su uso a partir de sangre.
- Tamaño de muestra: 300 µl de sangre total, plasma, suero y fluidos biológicos.
- No se utilizan extracciones orgánicas o precipitaciones con alcohol.
- Completa eliminación de inhibidores o contaminantes.
- Típico rendimiento: 6- 9 µg ADN genómico.
- Volumen de elución: 50-200 µl.
- Se obtiene un ADN de elevada calidad que puede ser utilizado directamente en PCR, Southern, clonaje y en cualquier reacción enzimática.

Aplicaciones:

- Extracciones de ADN genómico, viral y bacteriano.
- ADN a partir de sangre total (sangre humana o animal, fresca o congelada).
- ADN a partir de sangre tratada con citrato, EDTA, heparina.
- ADN a partir de suero, plasma, plaquetas, "buffy coat", fluidos biológicos y "dried blood spots."

Procedimiento: En el caso muestras de sangre y si se requiere el ADN genómico, la mejor opción es una lisis previa y selectiva de los eritrocitos con el Tampón Lisis RBC para procesar sólo los linfocitos que nos proporcionará mejores resultados en cuanto calidad y rendimiento. Si se está buscando otro tipo de ADN (bacteriano, vírico) la lisis se consigue mediante la incubación de la sangre total en una solución caotrópica en presencia de proteinasa K a 70°C. Se crearán las condiciones apropiadas para que el ADN se una a la membrana de fibra de sílica al añadir etanol al lisado. Los contaminantes son eliminados por 2 diferentes lavados y finalmente el ADN es eluido con un tampón de elución.

1.INTRODUCTION

This kit is designed for rapid extraction and purification of high quality **genomic DNA from whole blood, serum, plasma and biological fluids** using Spin columns with silica membrane that selectively binds DNA.

This Kit utilizes a new Lysis / Binding Buffer specifically formulated for DNA extraction from blood samples for high throughput.

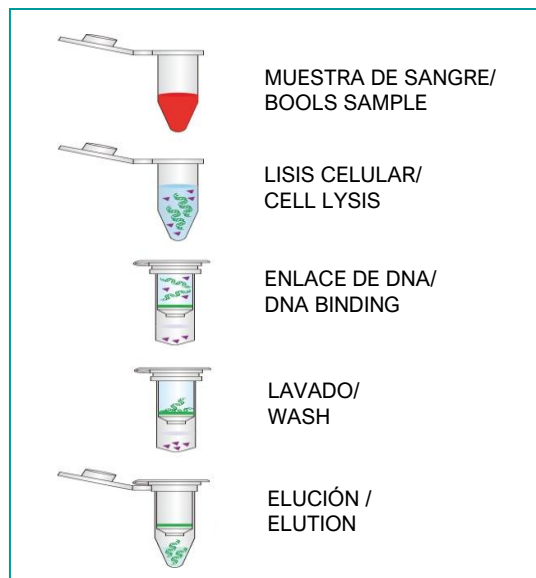
Features:

- For rapid obtaining of high quality, ready-to-use DNA from blood.
- Sample size: 300 µl of whole blood, plasma, serum and biological fluids.
- No organic extractions or alcohol precipitations are used.
- Complete removal of inhibitors or contaminants.
- Typical yield: 6-9 µg genomic DNA.
- Elution volume: 50-200 µl.
- High quality DNA is obtained that can be used directly in PCR, Southern, cloning and any enzymatic reaction.

Applications:

- Genomic, viral and bacterial DNA extractions.
- DNA from whole blood (human or animal blood, fresh or frozen).
- DNA from blood treated with citrate, EDTA, heparin.
- DNA from serum, plasma, platelets, buffy coat, biological fluids and dried blood spots.

Procedure: In the case of blood samples and if genomic DNA is required, the best option is a previous and selective lysis of erythrocytes with RBC Lysis Buffer to process only lymphocytes which will provide better results in terms of quality and yield. If we are looking for other types of DNA (bacterial, viral) lysis is achieved by incubating the whole blood in a chaotropic solution in the presence of proteinase K at 70°C. The appropriate conditions for DNA to bind to the silica fiber membrane will be created by adding ethanol to the lysate. Contaminants are removed by 2 different washes and finally the DNA is eluted with elution buffer.



2.COMONENTES DEL KIT / KIT COMPONENTS

Componentes/ Components	REF.	Ref. RBMEGS08 (50 Extrac.)	Ref. RBMEGS09 (250 Extrac.)	T ^a
Tampón de Lisis RBC/ RBC Lysis Buffer		50 ml	250 ml	RT
Tampón Lisis de Tejidos/ Tissue Lysis Buffer		10 ml	50 ml	RT
Tampón Lisis /Unión / Lysis Buffer / Binding		15 ml	75 ml	RT
Proteinasa K / Proteinase K		30 mg	2 x 75 mg	-20°C
Tampón de Desinhibición / Disinhibition Buffer		18 ml	90 ml	RT
Tampón de Lavado / Wash Buffer		10 ml	50 ml	RT
Tampón de Elución / Elution Buffer		10 ml	50 ml	RT
Spin Columnas / Spin Columns		50 unid	250 unid	RT
Tubos de Recogida / Collection Tubes		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.

Equipment and reagents needed and not provided

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

3.PROTOCOLO GENERAL

3. GENERAL PROCEDURE

3.1 Recolección y almacenamiento de muestras

Muestras de sangre total debería ser conservadas a 4°C inmediatamente después de su recolección. Son estables durante semanas a 4°C. También pueden ser enviadas en contenedores refrigerados.

3.1 Specimen collection and storage

Whole blood samples should be stored at 4°C immediately after collection. They are stable for weeks at 4°C. They can also be shipped in refrigerated containers.

Muestras de plasma y suero, deberían ser enfriadas y centrifugadas inmediatamente en la hora siguiente a su obtención. Para la preparación de suero sanguíneo centrifugar a 3.000 rpm durante 10 minutos y para muestras de plasma centrifugar a 3500 rpm durante 15 minutos.

Las muestras de plasma deberían ser separadas de las células y pasadas a un nuevo microtubo de 1.5 ml, la capa intermedia que incluye las células blancas, plaquetas no debe ser transferida con el plasma.

Las muestras de suero, son generalmente obtenidas con tubos de vidrio normal sin anticoagulantes que permite la formación de coágulos de sangre después de que el suero es recolectado y pasado a un nuevo microtubo para su transporte.

Si no es posible realizar la extracción en los tres días siguientes a su obtención, el plasma y el suero deberían ser congelados preferiblemente a -80°C o al menos a -20°C.

Buffy coat es una fracción enriquecida en leucocitos a partir de sangre total. Preparar esta fracción a partir de sangre total es simple y tiene un rendimiento aproximadamente de 5-10 veces más de ADN que un volumen equivalente de sangre total. Su preparación se realiza por centrifugación de la sangre a 2500 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de la centrifugación, se observan 3 fracciones. La fracción superior es el plasma; la intermedia es el byffy coat que contiene los leucocitos concentrados; y la fracción de abajo contiene los eritrocitos.

3.2 Preparaciones preliminares

- Disolver la proteinasa 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°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 tienen precipitados debido a las bajas temperaturas. Si es necesario, disolver calentando 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.

3.3 Protocolo para la extracción de ADN genómico a partir de sangre (leucocitos)

Este protocolo es para la purificación del ADN genómico a partir de los leucocitos realizando para ello una lisis selectiva de los eritrocitos con el Tampón de Lisis RBC. Si se requiere sólo el ADN genómico o mitocondrial este es método ideal ya que produce unos mejores resultados en cuanto a calidad y rendimiento.

Plasma and serum samples should be cooled and centrifuged immediately within one hour of collection. For blood serum preparation centrifuge at 3000 rpm for 10 minutes and for plasma samples centrifuge at 3500 rpm for 15 minutes.

The plasma samples should be separated from the cells and transferred to a new 1.5 ml microtube, the intermediate layer that includes the white cells and platelets should not be transferred with the plasma.

Serum samples are usually obtained with plain glass tubes without anticoagulants that allow blood clots to form after the serum is collected and transferred to a new microtube for transport.

If collection is not possible within three days of collection, the plasma and serum should preferably be frozen at -80°C or at least -20°C.

Buffy coat is a leukocyte-enriched fraction from whole blood. Preparing this fraction from whole blood is simple and has a yield of approximately 5-10 times more DNA than an equivalent volume of whole blood. It is prepared by centrifugation of the blood at 2500 x g for 10 minutes at room temperature. After centrifugation, 3 fractions are observed. The top fraction is the plasma; the middle fraction is the byffy coat containing the concentrated leukocytes; and the bottom fraction contains the erythrocytes.

3.2 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°C. Several aliquots are recommended 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°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-heat the Elution Buffer to 70°C.

3.3 Protocol for genomic DNA extraction from blood (leukocytes)

This protocol is for the purification of genomic DNA from leukocytes by selective lysis of erythrocytes with RBC Lysis Buffer. If only genomic or mitochondrial DNA is required this is the ideal method as it produces better results in terms of quality and yield.

1. Pipetear **300 µl de sangre** en un microtubo de 1.5 ml. Añadir **900 µl de Tampón Lisis RBC**. Vortex e incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
2. Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto. Eliminar el sobrenadante por decantación mejor que con micropipeta que puede aspirar el pequeño pellet celular no visible y dejar 10-20 µl de líquido residual. Vortex el microtubo para resuspender el pellet.
3. Add **180 µl de Tampón de lisis de Tejidos + 25 µl Proteínasa K**. Resuspender el pellet de células con micropipeta.
4. **Incubar a 56°C** durante 15 minutos.
5. Añadir **200 µl de Tampón de Lisis / Unión**. Mezclar por vortex. **Incubar a 70°C durante 10 minutos**.
6. Añadir **200 µl de Etanol (96-100%) al lisado**. Mezclar por vortex.
7. **Pasar la muestra a una MicroSpin column** con su tubo de recolección.
8. **Centrifugar a 8.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el tubo de recolección. Si la muestra no ha pasado completamente, repetir el paso de centrifugación.
9. Colocar la MicroSpin column en un nuevo tubo de recolección y añadir **500 µl de Tampón de Desinhibición**. **Centrifugar a 12.000-14.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el líquido.
10. **Añadir 700 µl de Tampón de Lavado** en el reservorio de la Spin column. **Centrifugar a 12.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el líquido.
11. **Centrifugar a máxima velocidad durante 2 minutos para eliminar el etanol residual**.
12. Eliminar el tubo de recogida y insertar la spin column 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 1 minuto**.
13. **Centrifugar a máxima velocidad durante 60 segundos**. El microtubo contiene ahora el ADN genómico.

3.4 Protocolo para la extracción de ADN a partir de sangre total, buffy coat y fluidos biológicos

Este protocolo es para la purificación del ADN total (genómico, mitocondrial, bacteriano y viral) a partir de sangre total, buffy coat y fluidos biológicos.

1. **Pipetear 25 µl proteinase K** en un microtubo de 1.5 ml.
2. **Añadir 300 µl de muestra** al microtubo. Utilizar hasta 300 µl de sangre total, plasma, suero, buffy coat o fluido biológico. Para muestras menores de 300 µl, añadir PBS para ajustar el volumen a 300 µl. Si purificamos ADN vírico, recomendamos empezar con 200 µl de suero o plasma.
3. **Añadir 300 µl del Tampón de Lisis/ Unión**. Vortex la mezcla vigorosamente (10–20 s). **Incubar a 70°C durante 15 minutos**. *El lisado se volverá marrón durante la incubación. Incrementar el periodo de incubación con proteínasa K hasta 30 minutos y vortex vigorosamente más veces durante el proceso de incubación si se procesa sangre vieja o coagulada.*
4. **Añadir 300 µL etanol (96–100 %)** a cada muestra y vortex.
5. Pipetear la mitad del lisado en en el reservorio de la Spin column con su tubo de recogida. **Centrifugar a 10.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el tubo de recogida.
6. Repetir el punto 5 con la otra mitad del lisado.

1. Pipette **300 µl of blood** into a 1.5 ml microtube. Add **900 µl of RBC Lysis Buffer**. Vortex and incubate at room temperature for 10 minutes.
2. Centrifuge at maximum speed for 1 minute. Remove the supernatant by decanting better than with micropipette which can aspirate the small cell pellet not visible and leave 10-20 µl of residual liquid. Vortex the microtube to resuspend the pellet.
3. Add **180 µl of Tissue Lysis Buffer + 25 µl Proteinase K**. Resuspend the cell pellet with micropipette.
4. **Incubate at 56°C** for 15 minutes.
5. Add **200 µl of Lysis / Binding Buffer**. Mix by vortexing. **Incubate at 70°C for 10 minutes**.
6. Add **200 µl of Ethanol (96-100%) to the lysate**. Mix by vortex.
7. **Transfer the sample to a MicroSpin column** with its collection tube.
8. **Centrifuge at 8,000 rpm for 60 seconds**. Discard the collection tube. If the sample has not passed completely, repeat the centrifugation step.
9. Place the MicroSpin column in a new collection tube and add **500 µl of Deinhibition Buffer**. **Centrifuge at 12,000-14,000 rpm for 60 seconds**. Discard the liquid.
10. **Add 700 µl of Wash Buffer** to the Spin column reservoir. **Centrifuge at 12,000 rpm for 60 seconds**. Discard the liquid.
11. **Centrifuge at maximum speed for 2 minutes to remove residual ethanol**.
12. Remove the collection tube and insert the spin column into a 1.5 ml microtube. **Add 50-200 µl of Elution Buffer** (pre-warmed to 70°C) to the spin microcolumn reservoir. **Incubate for 1 minute**.
13. **Centrifuge at maximum speed for 60 seconds**. The microtube now contains the genomic DNA.

3.4 Protocol for DNA extraction from whole blood, buffy coat and biological fluids

This protocol is for the purification of total DNA (genomic, mitochondrial, bacterial and viral) from whole blood, buffy coat and biological fluids.

1. **Pipette 25 µl proteinase K** into a 1.5 ml microtube.
2. **Add 300 µl of sample** to the microtube. Use up to 300 µl of whole blood, plasma, serum, buffy coat or biological fluid. For samples smaller than 300 µl, add PBS to adjust the volume to 300 µl. If purifying viral DNA, we recommend starting with 200 µl of serum or plasma.
3. **Add 300 µl of Lysis/Binding Buffer**. Vortex the mixture vigorously (10-20 s). **Incubate at 70°C for 15 minutes**. The lysate will turn brown during incubation. Increase the incubation period with proteinase K to 30 minutes and vortex vigorously more times during the incubation process if processing old or clotted blood.
4. **Add 300 µL ethanol (96-100 %)** to each sample and vortex.
5. Pipette half of the lysate into the Spin column reservoir with its collection tube. **Centrifuge at 10,000 rpm for 60 seconds**. Discard the collection tube.
6. Repeat step 5 with the other half of the lysate.

7. Colocar la Spin 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 columna. **Centrifugar a 12.000 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 y insertar la spin columna 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 1 minuto**.
11. **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 "dried blood spots"

Paso obtención muestra

Colocar 3 círculos obtenidos de perforar un "dried blood spot" en un microtubo de 1.5 ml.

Paso de pre-tratamiento

Añadir 200 µl de PBS y vortex vigorosamente. Incubar a 85°C durante 10 minutos. Brevemente centrifugar para eliminar las gotas del tapón.

1. **Pipetear 25 µl proteinase K** en la muestra.
2. **Add 200 µl del Tampón de Lisis/ Unión**. Vortex la mezcla vigorosamente (10–20 s).
3. **Incubar a 70°C durante 1 hora**.
4. **Añadir 200 µl de etanol (96–100 %)** a cada muestra y vortex. Continuar en el punto 5 del protocolo 3.4.

7. Place the Spin 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 column reservoir. **Centrifuge at 12,000 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 column into a 1.5 ml microtube. **Add 50-200 µl of Elution Buffer** (pre-warmed to 70°C) to the reservoir of the spin microcolumn. **Incubate for 1 minute**.
11. **Centrifuge at maximum speed for 60 seconds**. The microtube now contains the genomic DNA.

3.5 Protocol for extraction of genomic DNA from dried blood spots

Step Sample collection

Place 3 circles obtained from puncturing a dried blood spot in a 1.5 ml microtube.

Pre-treatment step

Add 200 µl of PBS and vortex vigorously. Incubate at 85°C for 10 minutes. Briefly centrifuge to remove droplets from the stopper.

1. **Pipette 25 µl proteinase K** into the sample.
2. **Add 200 µl of Lysis/Binding Buffer**. Vortex the mixture vigorously (10-20 s).
3. **Incubate at 70°C for 1 hr**.
4. **Add 200 µl of ethanol (96-100 %)** to each sample and vortex. Continue at point 5 of protocol 3.4.

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 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