

REAL SPIN BLOOD DNA KIT

Ref. **RBMEGS10:** (para **50 EXTRACCIONES**)
 Ref. **RBMEGS11:** (para **250 EXTRACCIONES**)

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

1.INTRODUCCIÓN

Este kit permite una eficiente extracción de **ADN genómico y mitocondrial a partir de muestras de pequeño tamaño, como diferentes tipos de células y tejidos, muestras microdisseccionadas por láser, pequeñas cantidades de sangre** utilizando un diseño especial de columnas para ello,

El diseño especial de la columna está conectado con un reducido volumen muerto y un pequeño diámetro de la membrana de sílica **que permite una eluir en tan sólo 10 µl.**

MUESTRA	TAMAÑO
Tejidos	< 10 mg
Células en cultivo	< 10 ⁵
Sangre	< 100 µl
Tejidos microdisseccionados por laser	Una muestra
"Buccal Swabs"	1

Características:

- Tecnología de membranas de sílica pero con un diseño especial de MicroSpin columnas.
- Purificación rápida de ADN de elevada calidad a partir de muestras de reducido tamaño.
- No se utilizan extracciones orgánicas o precipitaciones con alcohol.
- Completa eliminación de inhibidores o contaminantes.
- Volumen de elución: 10-30 µl.
- Se obtiene un ADN de elevada calidad que puede ser utilizado directamente en PCR, Southern, clonaje y en cualquier reacción enzimática.

Aplicaciones:

- Extracción de ADN a partir de tejidos (tejido humano o de ratón, tejidos microdisseccionados por láser).
- Extracción de ADN a partir de células (células en cultivo).
- Extracción de ADN a partir de muestras clínicas (muestras de sangre, biopsias).
- Extracción de ADN a partir de muestras forenses ("buccal swabs").

1.INTRODUCTION

This kit allows efficient extraction of **genomic and mitochondrial DNA from small sample sizes such as different cell types and tissues, laser microdissected samples**, small amounts of blood using a special column design,

The special column design is connected with a reduced dead volume and a small diameter of the silica membrane which **allows an elution in only 10 µl.**

SAMPLE	SIZE
Tissues	< 10 mg
Cells in culture	< 10 ⁵
Blood	< 100 µl
Laser microdissected tissues	A sample
"Buccal Swabs"	1

Features:

- Silica membrane technology but with a special design of MicroSpin columns.
- Rapid purification of high quality DNA from small sample sizes.
- No organic extractions or alcohol precipitations are used.
- Complete removal of inhibitors or contaminants.
- Elution volume: 10-30 µl.
- High quality DNA is obtained that can be used directly in PCR, Southern, cloning and any enzymatic reaction.

Applications:

- DNA extraction from tissues (human or mouse tissue, laser microdissected tissues).
- DNA extraction from cells (cells in culture).
- DNA extraction from clinical samples (blood samples, biopsies).
- DNA extraction from forensic samples ("buccal swabs").

2.COMONENTES DEL KIT / KIT COMPONENTS

Componente REAL	Ref.	Envase. (50 Preps)	Envase. (250 Preps)	T°
RBC Lysis Solution	E20T	8 ml	40 ml	RT
Lysis Solution	E21	10 ml	50 ml	RT
Washing solution *	EP08	6 ml	30 ml	RT
Lysis/Binding Solution	REA01	10 ml	50 ml	RT
Proteinase K *	REA02	22 mg	105 mg	-20°C
Disinhibition Solution (GHCL 8M) *	REA03	18 ml	85 ml	RT
Hydration Solution	REA05	2 ml	10 ml	RT
microSpin columns	RSC06	50 unid.	250 unid.	RT
Collection Tubes	R30	100 unid.	500 unid.	RT

* Ver en el apartado de preparaciones preliminares como preparar estas soluciones.

Equipos y reactivos necesarios y no provistos

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

* See the section on preliminary preparations on how to prepare these solutions.

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 Preparaciones preliminares

- 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 (GHCL 8M)** 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 **24 ml** (kit 50 extracciones) y unos **120 ml** (kit 250 extracciones). Mantener el envase bien cerrado para evitar la evaporación del etanol.
- Pre-calentar el **Hydration Solution** a 70°C.

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 (GHCL 8M)** 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 **24 ml** (kit 50 extractions) and about **120 ml** (kit 250 extractions). Keep the container tightly closed to avoid evaporation of the ethanol.
- Pre-heat the **Hydration Solution** to 70°C.

3.2 Protocolo para extracción de ADN genómico a partir de sangre

1. Pipetear **30 o 50 µl de sangre** en un microtubo de 1.5 ml. Añadir **150 µl de RBC Lysis Solution**. 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. Añadir **180 µl de Lysis Solution + 20 µl Proteinase K**. Mezclar por vortex durante 2-5 segundos.
4. **Incubar a 56°C** durante 10 minutos.
5. Añadir **200 µl de Lysis/Binding Solution**. 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 Columns** con su *Collection Tubes*.
8. **Centrifugar a 8.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el *Collection Tubes*. Si la muestra no ha pasado completamente, repetir el paso de centrifugación.
9. Colocar la *MicroSpin columns* en un nuevo *Collection Tubes* y añadir **500 µl de Desinhibition Solution (GHCL 8M)**. **Centrifugar a 12.000-14.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el líquido.
10. **Añadir 500 µl of Whasing Solution**. **Centrifugar a 14.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el líquido.
11. **Centrifugar a máxima velocidad durante 3 minutos para eliminar el etanol residual**.
12. Colocar la *MicroSpin columns* en un microtubo de 1.5 ml y añadir **10-50 µl de Hydration Solution (10 mM Tris.HCl, pH 8.5)**. *Asegurarse que el Hydration Solution es dispensado directamente en el centro de la membrana para una completa elución del ADN unido. El promedio de volumen de eluido son 10 µl a partir de 12 µl de Hydration Solution utilizado.*
13. **Incubar 1 minuto. Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto**. El microtubo contiene ahora el ADN genómico.

3.3 Protocolo para extracción de ADN genómico a partir de células en cultivo

1. Resuspender hasta **10⁵ células** en un volumen final de **80 µl de Lysis Solution + 10 µl Proteinase K**. Mezclar por vortex durante 2-5 segundos.
2. **Incubar a 56°C durante 10 minutos**.
3. Añadir **80 µl de Lysis/Binding Solution**. Mezclar por vortex. **Incubar a 70°C durante 5 minutos**. *Permitir que el lisado se enfríe a temperatura ambiente.*
4. Añadir **80 µl de Etanol (96-100%) al lisado**. Mezclar por vortex. Brevemente centrifugar para recoger las posibles gotas presentes en el microtubo.
5. **Pasar la muestra a una MicroSpin columns** con su *Collection Tubes*.
6. **Centrifugar a 8.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el *Collection Tubes*. Si la muestra no ha pasado completamente, repetir el paso de centrifugación.
7. Colocar la *MicroSpin columns* en un nuevo tubo de recolección y añadir **80 µl de Disinhibition Solution (GHCL 8M)**.

3.2 Protocol for extraction of genomic DNA from blood

1. Pipette **30 or 50 µl of blood** into a 1.5 ml microtube. Add **150 µl of RBC Lysis Solution**. 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 non-visible cell pellet and leave 10-20 µl of residual liquid. Vortex the microtube to resuspend the pellet.
3. Add **180 µl of Lysis Solution + 20 µl Proteinase K**. Mix by vortexing for 2-5 seconds.
4. **Incubate at 56°C** for 10 minutes.
5. Add **200 µl of Lysis/Binding Solution**. 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 Columns** with its *Collection Tubes*.
8. **Centrifuge at 8,000 rpm for 60 seconds**. Discard the *Collection Tubes*. If the sample has not passed completely, repeat the centrifugation step.
9. Place the *MicroSpin columns* in a new *Collection Tubes* and add **500 µl of Desinhibition Solution (GHCL 8M)**. **Centrifuge at 12,000-14,000 rpm for 60 seconds**. Discard the liquid.
10. **Add 500 µl of Whasing Solution**. **Centrifuge at 14,000 rpm for 60 seconds**. Remove the liquid.
11. **Centrifuge at maximum speed for 3 minutes to remove residual ethanol**.
12. Place the *MicroSpin column* in a 1.5 ml microtube and add **10-50 µl of Hydration Solution (10 mM Tris.HCl, pH 8.5)**. Ensure that the *Hydration Solution* is dispensed directly into the center of the membrane for complete elution of bound DNA. The average eluate volume is 10 µl from 12 µl of *Hydration Solution* used.
13. **Incubate for 1 minute. Centrifuge at maximum speed for 1 minute**. The microtube now contains the genomic DNA.

3.3 Protocol for extraction of genomic DNA from cultured cells

1. Resuspend up to **10⁵ cells** in a final volume of **80 µl of Lysis Solution + 10 µl Proteinase K**. Vortex mix for 2-5 seconds.
2. **Incubate at 56°C for 10 minutes**.
3. Add **80 µl Lysis/Binding Solution**. Vortex mix. **Incubate at 70°C for 5 minutes**. Allow the lysate to cool to room temperature.
4. Add **80 µl of Ethanol (96-100%) to the lysate**. Vortex mix. Briefly centrifuge to collect any droplets present in the microtube.
5. **Transfer the sample to a MicroSpin columns** with its *Collection Tubes*.
6. **Centrifuge at 8000 rpm for 60 seconds**. Remove the *Collection Tubes*. If the sample has not passed completely, repeat the centrifugation step.
7. Place the *MicroSpin columns* in a new collection tube and add 80 µl of *Disinhibition Solution (GHCL 8M)*.

8. **Centrifugar a 12.000-14.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el líquido.
9. **Añadir 80 µl de *Washing Solution*.** Centrifugar a **12.000-14.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el líquido.
10. **Centrifugar a máxima velocidad durante 3 minutos para eliminar el etanol residual.**
11. Colocar la ***MicroSpin columns*** en un microtubo de 1.5 ml y añadir **10-50 µl de *Hydration Solution* (10 mM Tris.HCl, pH 8.5).** Asegurarse que el ***Hydration Solution*** es dispensado directamente en el centro de la membrana para una completa elución del ADN unido. El promedio de volumen de eluido son 10 µl a partir de 12 µl de tampón de elución utilizado.
12. **Incubar 1 minuto. Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.** El microtubo contiene ahora el ADN genómico.

3.4 Protocolo para extracción de ADN genómico a partir menos de 10 mg de tejido animal

1. Pasar una muestra de tejido de menos de 10 mg a un microtubo de 1.5 ml.
2. Añadir **180 µl de *Lysis Solution* + 20 µl *Proteinase K*.** Mezclar por vortex durante 2-5 segundos.
3. **Incubar a 56°C** durante 1-4 horas o hasta que la lisis sea completa, las muestras pueden incubarse overnight. Todas las muestras y especialmente las muestras que son difíciles de lisar pueden ser molidas con Ni líquido o pueden ser tratadas directamente con un homogenizador tipo Polytron.
4. Añadir **200 µl de *Lysis/Binding Solution*.** Mezclar por vortex. **Incubar a 70°C durante 10 minutos.** Si se observan partículas insolubles, centrifugar 5 minutos a máxima velocidad y pasar el sobrenadante a un nuevo microtubo.
5. Añadir **200 µl de Etanol (96-100%) al lisado.** Mezclar por vortex. Brevemente centrifugar para recoger las posibles gotas presentes en el microtubo.
6. **Pasar la muestra a una *MicroSpin columns*** con tubo de recolección.
7. **Centrifugar a 8.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el ***Collection Tubes***. Si la muestra no ha pasado completamente, repetir el paso de centrifugación.
8. Colocar la ***MicroSpin columns*** en un nuevo tubo de recolección y añadir **500 µl de *Desinhibition Solution* (GHCL 8M).**
9. **Centrifugar a 12.000-14.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el líquido.
10. **Añadir 500 µl de *Washing Solution*.** Centrifugar a **12.000-14.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el líquido.
11. **Centrifugar a máxima velocidad durante 3 minutos para eliminar el etanol residual.**
12. Colocar la ***MicroSpin columns*** en un microtubo de 1.5 ml y añadir **10-50 µl de *Hydration Solution* (10 mM Tris.HCl, pH 8.5).** Asegurarse que el ***Hydration Solution*** es dispensado directamente en el centro de la membrana para una completa elución del ADN unido. El promedio de volumen de eluido son 10 µl a partir de 12 µl de tampón de elución utilizado.
13. **Incubar 1 minuto. Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.** El microtubo contiene ahora el ADN genómico.

8. **Centrifuge at 12,000-14,000 rpm for 60 seconds.** Eliminate the liquid.
9. **Add 80 µl of *Washing Solution*.** Centrifuge at **12,000-14,000 rpm for 60 seconds.** Remove the liquid.
10. **Centrifuge at maximum speed for 3 minutes to remove residual ethanol.**
11. Place the ***MicroSpin column*** in a 1.5 ml microtube and add **10-50 µl of *Hydration Solution* (10 mM Tris.HCl, pH 8.5).** Ensure that the ***Hydration Solution*** is dispensed directly into the center of the membrane for complete elution of bound DNA. The average eluate volume is 10 l from 12 l of elution buffer used.
12. **Incubate for 1 minute. Centrifuge at maximum speed for 1 minute.** The microtube now contains the genomic DNA.

3.4 Protocol for extraction of genomic DNA from less than 10 mg of animal tissue

1. Transfer a tissue sample of less than 10 mg to a 1.5 ml microtube.
2. Add **180 µl of *Lysis Solution* + 20 µl *Proteinase K*.** Vortex mix for 2-5 seconds.
3. **Incubate at 56°C** for 1-4 hours or until lysis is complete, samples can be incubated overnight. All samples and especially samples that are difficult to lyse can be ground with liquid Ni or can be treated directly with a Polytron type homogenizer.
4. Add **200 µl of *Lysis/Binding Solution*.** Mix by vortexing. **Incubate at 70°C for 10 minutes.** If insoluble particles are observed, centrifuge 5 minutes at maximum speed and transfer the supernatant to a new microtube.
5. Add **200 µl of Ethanol (96-100%) to the lysate.** Mix by vortexing. Briefly centrifuge to collect any droplets present in the microtube.
6. **Transfer the sample to a *MicroSpin column*** with collection tube.
7. **Centrifuge at 8,000 rpm for 60 seconds.** Discard the ***Collection Tubes***. If the sample has not passed completely, repeat the centrifugation step.
8. Place the ***MicroSpin column*** in a new collection tube and add **500 µl of *Desinhibition Solution* (GHCL 8M)..**
9. **Centrifuge at 12,000-14,000 rpm for 60 seconds.** Remove the liquid.
10. **Add 500 µl of *Washing Solution*.** Centrifuge at **12,000-14,000 rpm for 60 seconds.** Remove the liquid.
11. **Centrifuge at maximum speed for 3 minutes to remove residual ethanol.**
12. Place the ***MicroSpin columns*** in a 1.5 ml microtube and add **10-50 µl of *Hydration Solution* (10 mM Tris.HCl, pH 8.5).** Ensure that the ***Hydration Solution*** is dispensed directly into the center of the membrane for complete elution of bound DNA. The average eluate volume is 10 µl from 12 µl of elution buffer used.
13. **Incubate for 1 minute. Centrifuge at maximum speed for 1 minute.** The microtube now contains the genomic DNA.

3.5 Protocolo para extracción de ADN genómico a partir de tejido microdisecionado por láser

NOTA: Este protocolo de extracción de ADN genómico a partir de tejidos microdisecionados por láser es bastante difícil, la muestra es muy pequeña y la calidad del ADN puede verse adversamente afectada por la fijación y procesos de tinción, y puede ser necesario tanto modificar los protocolos de fijación o utilizar crio-secciones para minimizar este problema

1. Pasar una muestra de tejido microdisecionado por láser a un microtubo.
2. Añadir **80 µl de Lysis Solution + 10 µl Proteinase K**. Mezclar por vortex durante 2-5 segundos.
3. **Incubar a 56°C** durante 1-4 horas o hasta que la lisis sea completa, las muestras pueden incubarse overnight.
4. Añadir **80 µl de Lysis / Binding Solution**. Mezclar por vortex. **Incubar a 70°C durante 5 minutos**. *Permitir que el lisado se enfríe a temperatura ambiente.*
5. Añadir **80 µl de Etanol (96-100%) al lisado**. Mezclar por vortex. Brevemente centrifugar para recoger las posibles gotas presentes en el microtubo.
6. **Pasar la muestra a una MicroSpin columns** con su tubo de recolección.
7. **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.
8. Colocar la **MicroSpin columns** en un nuevo tubo de recolección y añadir **80 µl de Disinhibition Solution (GHCL 8M)**.
9. **Centrifugar a 12.000-14.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el líquido.
10. **Añadir 80 µl de Washing Solution**. **Centrifugar a 12.000-14.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el líquido.
11. **Centrifugar a máxima velocidad durante 3 minutos para eliminar el etanol residual**.
12. Colocar la **MicroSpin columns** en un microtubo de 1.5 ml y añadir **10-30 µl de Hydration Solution (10 mM Tris.HCl, pH 8.5)**. *Asegurarse que el Hydration Solution es dispensado directamente en el centro de la membrana para una completa elución del ADN unido. El promedio de volumen de eluido son 10 µl a partir de 12 µl de Hydration Solution utilizado.*
13. **Incubar 1 minuto**. **Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto**. El microtubo contiene ahora el ADN genómico.

3.5 Protocol for extraction of genomic DNA from laser microdissected tissue

NOTE: This protocol for extraction of genomic DNA from laser microdissected tissue is quite difficult, the sample is very small and DNA quality may be adversely affected by the fixation and staining processes, and it may be necessary to either modify fixation protocols or use cryosections to minimize this problem.

1. Transfer a laser microdissected tissue sample to a microtube.
2. Add **80 µl of Lysis Solution + 10 µl Proteinase K**. Vortex mix for 2-5 seconds.
3. **Incubate at 56°C** for 1-4 hours or until lysis is complete, samples can be incubated overnight.
4. Add **80 µl of Lysis / Binding Solution**. Mix by vortexing. **Incubate at 70°C for 5 minutes**. Allow the lysate to cool to room temperature.
5. Add **80 µl of Ethanol (96-100%) to the lysate**. Vortex mix. Briefly centrifuge to collect any droplets present in the microtube.
6. **Transfer the sample to a MicroSpin columns** with its collection tube.
7. **Centrifuge at 8000 rpm for 60 seconds**. Discard the collection tube. If the sample has not passed completely, repeat the centrifugation step.
8. Place the **MicroSpin columns** in a new collection tube and add **80 µl of Disinhibition Solution (GHCL 8M)**.
9. **Centrifuge at 12,000-14,000 rpm for 60 seconds**. Remove the liquid.
10. **Add 80 µl of Washing Solution**. **Centrifuge at 12,000-14,000 rpm for 60 seconds**. Remove the liquid.
11. **Centrifuge at maximum speed for 3 minutes to remove residual ethanol**.
12. Place the **MicroSpin columns** in a 1.5 ml microtube and add **10-30 µl of Hydration Solution (10 mM Tris.HCl, pH 8.5)**. Ensure that the **Hydration Solution** is dispensed directly into the center of the membrane for complete elution of bound DNA. The average eluate volume is 10 µl from 12 µl of **Hydration Solution** used.
13. **Incubate for 1 minute**. **Centrifuge at maximum speed for 1 minute**. The microtube now contains the genomic DNA.

3.6 Protocolo para extracción de ADN genómico a partir de frotis bucales

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 escobillón. Frotar el escobillón en el interior de la mejilla (pared bucal) y encías con una firme presión unas 20 veces por cada lado de la cara y cada lado del escobillón.
3. Utilizar inmediatamente para la extracción. Si se ha de transportar la muestra, dejar secar el cepillo a temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego introducir el cepillo en el receptáculo que se provee para el envío. En este tubo contenedor la muestra puede permanecer 1 semana a 22-37°C antes de realizarse la extracción. Para almacenamientos largos conservar la muestra en el contenedor a -20°C hasta 6 meses.
4. Añadir **250 µl de RBC Lysis Solution + 20 µl de Proteinase K (20 mg/ml)** en un microtubo de 1.5 ml. Cortar la cabeza del cepillo con un poco de mango y introducirla en el microtubo. Vortex vigorosamente para liberar las células del cepillo. Asegurarse de que la muestra queda completamente cubierta con el tampón durante la incubación.
5. **Incubar a 56°C durante 30-60 minutos.** Centrifugar brevemente. Retirar la cabeza del cepillo de la solución de lisis, frotándolo contra las paredes para recoger la máxima cantidad de líquido. **Medir la cantidad de lisado.**
6. Añadir **1 volumen de Lysis/Binding Solution** equivalente a la cantidad de lisado. Mezclar por vortex. **Incubar a 70°C durante 10 minutos.**
7. Añadir **1 volumen de Etanol 96-100%** equivalente a la cantidad de lisado. Vortex.
8. **Pasar la muestra a una MicroSpin columns** con su **Collection Tubes.**
9. **Centrifugar a 8.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el **Collection Tubes.** Si la muestra no ha pasado completamente, repetir el paso de centrifugación.
10. Colocar la **MicroSpin columns** en un nuevo **Collection Tubes** y añadir **200 µl de Disinhibition Solution .**
11. **Centrifugar a 12.000-14.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el líquido.
12. **Añadir 200 µl de Washing Solution. Centrifugar a 12.000-14.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el líquido.
13. **Centrifugar a máxima velocidad durante 3 minutos para eliminar el etanol residual.**
14. Colocar la **MicroSpin columns** en un microtubo de 1.5 ml y añadir **10-30 µl de Hydration Solution (10 mM Tris.HCl, pH 8.5).** Asegurarse que el **Hydration Solution** es dispensado directamente en el centro de la membrana para una completa elución del ADN unido. El promedio de volumen de eluido son 10 µl a partir de 12 µl de **Hydration Solution** utilizado.
15. **Incubar 1 minuto. Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.** El microtubo contiene ahora el ADN genómico

3.6 Protocol for extraction of genomic DNA from buccal swabs

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 swab. Rub the swab on the inside of the cheek (buccal wall) and gums with firm pressure about 20 times on each side of the face and each side of the swab.
3. Use immediately for extraction. If the specimen is to be transported, allow the brush to dry at room temperature for 30 minutes. Then insert the brush into the receptacle provided for shipping. The sample can remain in this container tube for 1 week at 22-37°C before extraction. For long term storage keep the sample in the container at -20°C for up to 6 months.
4. Add **250 µl of RBC Lysis Solution + 20 µl of Proteinase K (20 mg/ml)** into a 1.5 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. Ensure that the sample is completely covered with buffer during incubation.
5. **Incubate at 56°C for 30-60 minutes.** Centrifuge briefly. Remove the brush head from the lysis solution, rubbing it against the walls to collect the maximum amount of liquid. **Measure the amount of lysate.**
6. Add **1 volume of Lysis/Binding Solution** equal to the amount of lysate. Mix by vortexing. **Incubate at 70°C for 10 minutes.**
7. Add **1 volume of 96-100% Ethanol** equivalent to the amount of lysate. Vortex.
8. **Transfer the sample to a MicroSpin columns** with its **Collection Tubes.**
9. **Centrifuge at 8,000 rpm for 60 seconds.** Discard the **Collection Tubes.** If the sample has not passed completely, repeat centrifugation step.
10. Place the **MicroSpin columns** in a new **Collection Tubes** and add **200 µl of Disinhibition Solution.**
11. **Centrifuge at 12,000-14,000 rpm for 60 seconds.** Discard the liquid.
12. **Add 200 µl of Washing Solution. Centrifuge at 12,000-14,000 rpm for 60 seconds.** Remove the liquid.
13. **Centrifuge at full speed for 3 minutes to remove residual ethanol.**
14. Place the **MicroSpin columns** in a 1.5 ml microtube and add **10-30 l of Hydration Solution (10 mM Tris.HCl, pH 8.5).** Ensure that the **Hydration Solution** is dispensed directly into the center of the membrane for complete elution of bound DNA. The average eluate volume is 10 l from 12 l of **Hydration Solution** used.
15. **Incubate for 1 minute. Centrifuge at maximum speed for 1 minute.** 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 Tampón de Lisis/Unión y el Tampón de Desinhibición 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/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>		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