

# REAL MICROBIOME FECAL DNA KIT

Ref. **RBMEGS16:** (para **50 EXTRACCIONES**)(for **50 EXTRATION**)

## 1.INTRODUCCIÓN

El **REAL MICROBIOME FECAL DNA KIT** está diseñado para el aislamiento eficiente de ADN microbiano a partir de:

1. Hasta 250 mg de muestras de heces humanas o animales frescas y congeladas.
2. 250 µl de muestra de heces conservada y estabilizada en el **REAL STOOL SAMPLE COLLECTION MICROBIOME KIT** de recogida de muestras
3. 400 µl muestra de heces conservada y estabilizada en **REAL SWABS SAMPLE COLLECTION MICROBIOME KIT**

Nuestro nuevo **REAL MICROBIOME FECAL DNA KIT** es aún más eficaz que nuestra tecnología original Microbiome Fecal y está diseñado para obtener altos rendimientos de ADN microbiano puro a partir de muestras de heces para análisis microbiómicos y metagenómicos.

El kit cuenta con una nueva **Microbial DNA Column** y una química optimizada para una eliminación más eficiente de los inhibidores de la PCR (como polisacáridos, compuestos hemo y sales biliares) utilizando un nuevo

En este procedimiento, los microorganismos se lisan eficazmente mediante una combinación de calor y disrupción química y mecánica con microesferas especializadas. Las proteínas y los inhibidores se eliminan por precipitación y posteriormente se peletizan por centrifugación junto con las microesferas y el material de muestra no disuelto. El lisado purificado se mezcla con el tampón de unión y a continuación se procesa mediante una columna de ADN microbiano. El ADN unido a la columna se somete a un paso de dos lavados. Tras un paso de secado, el ADN listo para su uso en NGS, PCR y otras aplicaciones posteriores puede eluirse con tampón de elución (5 mM Tris/HCl, pH 8,5).

## 1.INTRODUCTION

The **REAL MICROBIOME FECAL DNA KIT** is designed for the efficient isolation of microbial DNA from:

1. up to 250 mg fresh and frozen human or animal stool samples.
2. 250 µl preserved stool sample stabilized in **REAL SWABS SAMPLE COLLECTION KIT**
3. 400 µl preserved stool sample stabilized in **REAL SWABS SAMPLE COLLECTION MICROBIOME KIT**.

Our New **REAL MICROBIOME FECAL DNA KIT** is even more effective than our original Microbiome Fecal technology and is designed to isolate high yields of pure microbial DNA from stool samples for microbiome and metagenomic analysis.

The kit features a novel **Microbial DNA Column** and optimized chemistry for a more efficient removal of PCR inhibitors (such as polysaccharides, heme compounds and bile salts)

In this procedure, the microorganisms are efficiently lysed by a combination of heat, chemical and mechanical disruption with specialized beads. Proteins and Inhibitors are eliminated by precipitation and subsequently pelleted by centrifugation together with the beads and undissolved sample material. The purified lysate is mixed with the Binding Buffer and then applied to a Microbial DNA column. The DNA that is bound to the column undergoes a two wash step. After a drying step, ready to use DNA for NGS, PCR and other downstream applications can be eluted with Elution Buffer (5 mM Tris/HCl, pH 8.5).

## 2.COMONENTES DEL KIT / KIT COMPONENTS

Componente REAL	Envase. (50 Preps)	T°
Microbiome Lysis Buffer	60 ml	RT
Microbiome Precipitation Buffer	12 ml	4°C
Binding Buffer	45 ml	RT
Desinhibition Buffer	28 ml	RT
Wash Buffer	45 ml	RT
Elution Buffer	12 ml	RT
Bead Microtubes	50 units	RT
Proteinase K *	30 mg	-20°C
Microbial DNA Columns	50 units	RT
Collection Tubes	150 units	RT

(\* ) Esta solución debe prepararse como se indica en la sección Preparativos preliminares del protocolo. / (\* ) *This solution must be prepared as indicated in the Preliminary Preparations section of the protocol.*

### Equipos y reactivos necesarios y no provistos

#### Consumibles y reactivos

- Tubos de microcentrífuga de 1,5 ml
- Puntas de pipeta desechables
- Agua libre de nucleasas

#### Equipo

- Pipeteadores manuales (50-1000 µl)
- Bloque térmico, baño seco o baño de agua (70°C)
- Centrifugadora para tubos de microcentrífuga
- Equipo para la disrupción y homogeneización de la muestra (véase la sección 3.2). Vortex-Genie® 2
- Equipo de protección personal (por ejemplo, bata de laboratorio, guantes, gafas)

### Equipment and reagents needed and not provided

#### Consumables and reagents

- 1.5 mL microcentrifuge tubes
- Disposable pipette tips
- Nuclease-free water

#### Equipment

- Manual pipettors (50–1000 µl)
- Heat block, dry bath, or water bath (70°C)
- Centrifuge for microcentrifuge tubes
- Equipment for sample disruption and homogenization (see section 3.2). Vortex-Genie® 2
- Personal protection equipment (e.g., lab coat, gloves, goggles)

## 3.PROTOCOLO GENERAL

## 3. GENERAL PROCEDURE

### 3.1 Preparaciones preliminares

- Disolver la **Proteinase K** en **1,3 ml de Agua libre de nucleasa** y almacenar a -20°C. Se recomienda hacer varias alícuotas para evitar muchos ciclos de descongelación/congelación. A esta temperatura es estable durante 1 año.
- **Precalentar el Elution Buffer a 70°C.**

### 3.1 Preliminary preparations

- Dissolve the **Proteinase K** in **1.3 ml of Nuclease-free water** and store at -20°C. It is recommended to do several aliquots to avoid many thaw/freeze cycles. At this temperature it is stable for 1 year.
- **Pre-heat the Elution Buffer at 70°C.**

### 3.2 Consideraciones generales

#### Cantidad de material de partida

**REAL MICROBIOME FECAL DNA KIT** está optimizado para procesar 180-220 mg de heces humanas. El material muy seco puede absorber grandes volúmenes de lisis. En este caso, reduzca la cantidad de material de muestra o añada **Lysis Buffer** adicional.

El kit contiene suficiente **Microbiome Lysis Buffer** del microbioma para 50 muestras utilizando hasta 1200 µl por muestra.

No obstante, llene el tubo de microesferas (incluidas las microesferas) para garantizar un espacio libre suficiente para una disrupción mecánica eficaz.

En el caso de muestras de heces de animales, si se reduce la cantidad de muestra se pueden obtener mejores resultados. Las muestras de heces muy secas, como las de conejo o ratón, pueden absorber el **Microbiome Lysis Buffer** dando lugar a un volumen de muestra insuficiente tras el primer paso de centrifugación. En estos casos, se recomienda reducir la cantidad de material fecal a, por ejemplo, 60 - 80 mg y aumentar el volumen total de lisis a 1 - 1,2 ml.

Para muestras de heces difíciles, como heces ricas en lípidos, polisacáridos o proteínas, una reducción del material de partida también podría mejorar la eficacia de la lisis y la pureza del ADN. En estos casos se recomienda comenzar la extracción con 60 - 80 mg de material de muestra.

Las muestras de heces humanas también pueden contener materia alimenticia no digerida (por ejemplo, cáscaras de cultivos o frutas, semillas no digeridas). Estas partículas no deben transferirse a los tubos de microesferas.

#### Homogeneización de la muestra

El procedimiento se optimiza utilizando "**Bead**" en un vórtex con agitación horizontal (Vortex Genie 2 o similar). Asegúrese de que el adaptador de vórtex permite la agitación horizontal; se trata de un método rentable para la recuperación de ADN microbiano de alta calidad.

Los adaptadores con una orientación vertical del tubo pueden no agitar correctamente.

El tiempo de procesamiento variará en función de la entrada de la muestra y del mezclador de microesferas. Los tiempos pueden ser tan cortos como 5 minutos cuando se utilizan disruptores celulares de alta velocidad (FastPrep) o tan largos como 10-20 minutos cuando se utilizan velocidades más bajas (Vortex-Genie® 2).

El **REAL MICROBIOME FECAL DNA KIT** no requiere homogeneización utilizando un batidor de microesferas de alta velocidad. Sin embargo, si el microorganismo de interés requiere una homogeneización más fuerte que la proporcionada por un vortex, o si se desea utilizar un bead beater se pueden utilizar homogeneizadores "Bead mil" como FastPrep, Precellys y otros pero siguiendo las instrucciones del fabricante para optimizar la lisis de la muestra. **IMPORTANTE:** Muchos dispositivos de disrupción modernos pueden provocar un aporte de energía muy elevado en los tubos de microesferas. Dependiendo del tipo de **bead microtube** y de su contenido (microesferas, volumen de líquido, tipo de muestra), una frecuencia de agitación especialmente alta y/o una duración de agitación prolongada pueden provocar la rotura de los **bead microtube**. Es responsabilidad del usuario realizar la prueba inicial de estabilidad de los tubos de microesferas utilizados en las condiciones empleadas. Realice la prueba inicial con agua en lugar de **Microbiome Lysis Buffer** y un ajuste moderado de la máquina (baja frecuencia, corta duración) para evitar el derrame de tampón de lisis caotrópico en caso de rotura del tubo.

### 3.2 General Remarks

#### Amount of starting material

**REAL MICROBIOME FECAL DNA KIT** is optimized for processing 180–220 mg of human stool. Very dry material can soak up large volumes of lysis. In this case, either reduce the amount of sample material or add additional **Lysis Buffer**.

The kit contains sufficient **Microbiome Lysis Buffer** for 50 samples using up to 1200 µl per sample.

However, fill the Bead Tube (including the beads) to ensure sufficient head space for an efficient mechanical disruption.

For stool samples from animals, lowering the sample amount may lead to better results. Very dry stool samples like rabbit or mouse feces may absorb **Microbiome Lysis Buffer** resulting in an insufficient sample volume after the first centrifugation step. In these cases, it is recommended to reduce the amount of stool material to e.g., 60 – 80 mg and to increase the total lysis volume to 1 -1.2 ml.

For difficult stool samples like lipid, polysaccharide, or protein rich stool, a reduction of starting material might also improve the lysis efficiency and the purity of the DNA. It is recommended in such cases to start the extraction with 60 – 80 mg sample material.

Human stool samples may also contain undigested food matter (e.g., crop or fruit husks, undigested seeds). These particles should not be transferred to the Bead Tubes.

#### Sample Homogenization

The procedure is optimized by using "**Bead**" in a vortex with horizontal agitation (Vortex Genie 2 or similar). Make sure that the vortex adapter allows horizontal agitation; This is a cost-effective method for recovery of high-quality microbial DNA.

Adapters with a vertical tube orientation may not agitate properly.

Processing time will vary based on sample input and bead beater. Times may be as little as 5 minutes when using high-speed cell disrupters (FastPrep) or as long 10-20 minutes when using lower speeds (Vortex-Genie® 2).

The **REAL MICROBIOME FECAL DNA KIT** does not require homogenization using a high-velocity bead beater. However, if the microorganism of interest requires stronger homogenization than provided by a vortex, or if using a bead beater is desired you can use "Bead mil" homogenizers such as FastPrep, Precellys and others but following the manufacturer's instructions to optimize the lysis of the sample. **IMPORTANT:** Many modern disruption devices can cause very high energy input in bead tubes. Depending on **bead microtube** type and content (beads, liquid volume, sample type), especially high frequency of shaking and / or long shaking duration can cause breaking up of the **bead microtube**! It is the responsibility of the user to perform initial stability test for the used bead tubes under the conditions used! Perform initial test with water instead of **Microbiome Lysis Buffer** and moderate machine setting (low frequency, short time) in order to avoid spillage of chaotropic lysis buffer in case of tube breakage.

### 3.3 Protocolo para la extracción de ADN microbiano a partir de muestras de heces frescas o congeladas

1. Añadir **180-220 mg de muestra de heces humanas** en un **bead microtube** de 2,0 ml y añadir **850 µL de Microbiome Lysis Buffer**. Agitar brevemente para mezclar. Dependiendo de la naturaleza de las heces, puede ser necesario aumentar proporcionalmente el **Microbiome Lysis Buffer** con el objetivo de recuperar **500-600 µl de sobrenadante en el punto 4** (muestras secas).

El kit contiene suficiente **Microbiome Lysis Buffer** para 50 muestras utilizando 1200 µl por muestra.

\*Para muestras de heces de animales, disminuir la cantidad de muestra puede conducir a mejores resultados. Las muestras de heces muy secas, como las de conejo o ratón, pueden absorber el **Microbiome Lysis Buffer**, dando lugar a un volumen de muestra insuficiente tras el primer paso de centrifugación. En estos casos, se recomienda reducir la cantidad de material fecal a, por ejemplo, 60 - 80 mg y aumentar el volumen total de lisis a 1 -1,2 ml.

MUESTRA	FRESCO O CONGELADO	CONSERVADO EN REALSTOOL	CONSERVADO EN REALSWAB
CANTIDAD MATERIAL DE PARTIDA	180-220 mg*	250 µl	400µl

2. Añadir **25 µl de Proteinase K**. Incubar a **70°C durante 10 minutos**.
3. Homogeneizar bien las muestras utilizando uno de los métodos explicados.  
**Homogeneizar** por batido durante **10 minutos** a velocidad máxima en el Vortex Genie 2 o similar utilizando un adaptador horizontal.  
*El tiempo de lisis debe ser tan corto como sea necesario para evitar el cizallamiento del ADN. Sin embargo, dependiendo de la muestra, puede ser ventajoso aumentar el tiempo de lisis a 10, 20 o 30 min.*
4. **Centrifugar a 16.500 x g durante 2 minutos**. Transfiera **600 µl de sobrenadante** a un tubo de microcentrifuga limpio de 1,5 ml.  
**IMPORTANTE:** Se preve 500-600 µl de sobrenadante. Puede haber una capa de residuos sobre el sedimento de microesferas. Evite transferir estos restos con el sobrenadante.
5. Añadir **200 µl Microbiome Precipitation Buffer**. Agitar en vórtex.
6. **Centrifugar a 16.500 x g durante 2 minutos**. Transferir **600 µl de sobrenadante** en un nuevo microtubo de 1,5 ml evitando tocar el pellet.
7. Añadir **900 µl de Binding Solution** y agitar brevemente en vórtex.
8. Cargar **750 µl** de muestra de mezcla en el depósito de un conjunto combinado de **Microbial columns DNA** y **Collection tube**. **Centrifugar a 15.000 x g durante 1 Microbial DNA Columns** en el mismo **Collection tube** de 2 ml; repita el paso 8 con el resto de la mezcla de muestras.
9. Asegúrese de que toda la mezcla de muestra ha pasado al **Collection tube** inspeccionando la columna. Si queda muestra en la **Microbial columns DNA** de nuevo a 15.000 x g durante 1 minuto.
10. Coloque con cuidado la **Microbial DNA Column** en un **Collection tube** limpio de 2 ml (suministrado).
11. Añadir **500 µl de Desinhibition Buffer** y **Centrifugar a 15.000 x g durante 1 minuto**. Retirar el **Collection tube**.

### 3.3 Protocol for microbial DNA extraction from fresh or frozen stool samples

1. Add **180-220 mg of human stool sample** in a 2.0 ml **bead microtube** and add **850 µL of Microbiome Lysis Buffer**. Vortex briefly to mix. Depending on the nature of the stool, it may be necessary to increase the **Microbiome Lysis Buffer** proportionally with the aim of recovering **500-600 µl of supernatant in point 4** (dry samples).

The kit contains sufficient **Microbiome Lysis Buffer** for 50 samples using 1200 µl per sample.

\*For stool samples from animals, lowering the sample amount may lead to better results. Very dry stool samples like rabbit or mouse feces may absorb **Microbiome Lysis Buffer**, resulting in an insufficient sample volume after the first centrifugation step. In these cases, it is recommended to reduce the amount of stool material to e.g., 60 - 80 mg and to increase the total lysis volume to 1 -1.2 ml.

SAMPLE	FRESH OR FROZEN	PRESERVED IN DANASTOOL	PRESERVED IN DANASWAB
AMOUNT STARTING MATERIAL	180-220 mg*	250 µl	400µl

2. Add **25 µl of Proteinase K**. Incubate at **70°C for 10 minutes**.
3. Homogenize samples thoroughly using one of the explained methods.  
**Homogenize** by bead beating for **10 minutes** at maximum speed on the Vortex Genie 2 or similar using a horizontal adapter.  
*The lysis time should be as short as necessary to avoid shearing of DNA. Depending on the sample, however, it might be advantageous to increase the lysis time to 10, 20, or 30 min.*
4. **Centrifuge at 16.500 x g for 2 minutes**. Transfer **600 µl supernatant** to a clean 1.5 ml microcentrifuge tube.  
**IMPORTANT:** Expect 500-600 µl of supernatant. A layer of debris may be present on top of the bead pellet. Avoid transfer of this debris with the supernatant.
5. Add **200 µl Microbiome Precipitation Buffer** Vortex.
6. **Centrifuge at 16.500 x g for 2 minutes**. Transfer **600 µl of supernatant** in a new 1.5 ml microtube avoiding touching the pellet.
7. Add **900 µl of Binding Solution** and vortex briefly.
8. Load **750 µl** mixture sample into reservoir of a combined **Microbial DNA Column – Collection tube** assembly. **Centrifuge at 15.000 x g for 1 minute**. Discard the flow-through and place the **Microbial DNA Column** back into the same 2 ml **Collection tube**, repeat step 8 with the remaining sample mixture.
9. Ensure that the entire sample mixture has passed into the **Collection tube** by inspecting the column. If sample remains in the **Microbial DNA Column** again at 15.000 x g for 1 minute.
10. Carefully place the **Microbial DNA Column** into a clean 2 ml **Collection tube** (provided). Avoid splashing any flow-through onto the Spin Column.
11. Add **500 µl of Desinhibition Buffer** **Centrifuge at 15.000 x g for 1 minute**. Remove the **Collection tube**.

12. Añadir **700 µl de Tampón de lavado**. Centrifugar a **16.000 x g durante 1 minuto**. Retirar el **Collection tube**.
13. Colocar con cuidado la **Microbial DNA Column** en un **Collection tube** limpio de 2 ml (suministrado). Evite salpicar la **Microbial DNA Column** con el flujo.
14. **Seque la membrana de sílice**. Centrifugar a 16.500 x g durante **2 minutos**.
15. Colocar la **Microbial DNA Column** en un tubo de 1,5 mL libre de nucleasas (no suministrado) y añadir **100-200 µL de Elution Buffer precalentado** a 70°C o el centro de la membrana de filtro blanco. Incubar a temperatura ambiente durante 2 minutos.
16. **Centrifugar** el conjunto columna-tubo a **15.000 x g durante 1 minuto** y desechar la **Microbial DNA Column** ya está listo para las aplicaciones posteriores.

12. Add **700 µl of Wash Buffer**. Centrifuge at **16.000 x g for 1 minute**. Remove the **Collection tube**.
13. Carefully place the **Microbial DNA Column** into a clean 2 ml **Collection tube** (provided). Avoid splashing any flow-through onto the **Spin Column**.
14. **Dry silica membrane**. Centrifuge at 16.500 x g for **2 minutes**.
15. Place the **Microbial DNA Column** into a 1.5 mL nuclease-free tube (not provided) and add **100-200 µL Pre-heat the Elution Buffer** at 70°C o the centre of the white filter membrane. Incubate **at room temperature for 2 minutes**.
16. **Centrifuge** the spin column-tube assembly at **15.000 x g for 1 minute**, then discard the **Microbial DNA Column** is now ready for downstream applications.

#### 4. ALMACENAMIENTO, ESTABILIDAD Y PRECAUCIONES

**PRECAUCIONES:** Los tampones Microbiome Lysis Buffer, Binding Buffer y Desinhibition Buffer contienen sales de guanidinio y deben manipularse con cuidado. Las sales de guanidinio forman compuestos muy reactivos cuando se combinan con lejía.

##### Uso previsto

Este producto REAL está destinado a aplicaciones de biología molecular. Este producto no está destinado al diagnóstico, prevención o tratamiento de una enfermedad.

#### STORAGE, STABILITY AND PRECAUTION

**PRECAUTIONS:** The Microbiome Lysis Buffer, Binding Buffer and Desinhibition Buffer contains guanidium salts, and should be handled with care. Guanidinium salts form highly reactive compounds when combined bleach.

##### Intended Use











This REAL product is intended for molecular biology applications. This product is not intended for the diagnosis, prevention or treatment of disease.

#### 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>		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>		Nocivo para el medio ambiente / <i>Harmful to the environment</i>



B65699985