

REAL MICROBIAL DNA KIT

Ref. **RBMEGS17:** (para **50 EXTRACCIONES**)

(for **50 EXTRATION**)

1.INTRODUCCIÓN

REAL Microbial DNA kit está diseñado para una purificación rápida de ADN genómico de alta calidad procedente de microorganismos (bacterias gram negativas, gram positivas, levaduras y hongos).

Las muestras microbianas como las bacterias gram positivo, levaduras y esporas pueden resultar difíciles de lisar debido a la estructura compleja de las paredes celulares. El REAL Microbial DNA kit sustituye la lisis enzimática mediante la utilización de un sistema de disrupción mecánica que debilita las estructuras de la pared celular basado en *beads*. Además, el uso de *beads* puede combinarse con otros dispositivos de disrupción celular.

El protocolo se inicia con un procesado *bead-beating*, las células son lisadas gracias a una combinación de fuerzas mecánicas, calor y detergentes, un vortex con un adaptador horizontal para el Genie 2 Vortex. También pueden utilizarse otros dispositivos comunes de disrupción.

Las condiciones apropiadas para que el ADN se una a las columnas de ADN Microbiano se consiguen mediante la adición de grandes cantidades de sales caotrópicas (**Binding Solution**) al lisado. Los contaminantes son eliminados con dos eficientes pasos de lavado. A continuación, el ADN resultante se sumerge en un tampón tris libre de DNA en el que tendrán lugar las siguientes reacciones.

Características:

- Diseñado para una **purificación rápida de ADN genómico de alta calidad procedente de microorganismos** (bacterias gram negativo, gram positivo, levaduras y hongos).
- Apto para distintos tipos de muestras. **Cultivos celulares y placas de agar.**
- **Lisado eficiente** gracias al uso de *beads* en combinación con *proteinase k* líquida

Aplicaciones:

- a) ADN total para cultivos celulares.
- b) Aplicaciones típicas: PCR, Real-Time PCR, southern blotting, reacciones enzimáticas.

1.INTRODUCTION

REAL Microbial DNA kit is designed for rapid purification of high quality genomic DNA from microorganisms (gram negative bacteria, large positive bacteria, yeasts and fungi).

Microbial samples such as gram positive bacteria, yeasts and spores can be difficult to lyse due to the complex structure of the cell wall. The REAL Microbial DNA kit replaces enzymatic lysis by using a mechanical disruption system that weakens cell wall structures based on beads. In addition, the use of beads can be combined with other cell disruption devices.

The protocol starts with a bead-beating process, the cells are lysed by a combination of mechanical forces, heat and detergents, a vortex with a horizontal adapter for the Genie 2 Vortex. Other common disruption devices can also be used.

The appropriate conditions for DNA to bind to the Microbial DNA columns are achieved by the addition of large amounts of chaotropic salts (**Binding Solution**) to the lysate. Contaminants are removed with two efficient washing steps. The resulting DNA is then immersed in a DNA-free tris buffer in which the following reactions will take place.

Features:

- Designed for **rapid purification of high-quality genomic DNA from microorganisms** (gram-negative bacteria, gram-positive bacteria, yeasts and fungi).
- Suitable for different types of samples. **Cell cultures and agar plates.**
- **Efficient lysing** due to the use of *beads* in combination with liquid *proteinase k*

Applications:

- a) Total DNA for cell culture.
- b) Typical applications: PCR, Real-Time PCR, southern blotting, enzymatic reactions.

2.COMONENTES DEL KIT / KIT COMPONENTS

Componentes REAL	Ref.	Envase	T ^a
Washing Solution*	EP08	10 ml	RT
Bead Microtubes	RBD5	50 unid	RT
Proteinase K*	REA02	30 mg	-20°C
Disinhibition Solution (GHCL 8M)*	REA03	18 ml	RT
Hydration Solution	REA05	10 ml	RT
CTAB Extraction Solution	RES01	45 ml	RT
Binding Solution	RES04	15 ml	RT
Columns Spin DNA	RSC03	50 unid	RT
Collection Tubes	R30	100 unid	RT

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

Equipos y reactivos necesarios y no provistos

- * Etanol 100 %.
- * Microcentrifuga.
- * Microtubos de 1.5 ml y 2.0 ml.
- * Baño de agua, baño seco o bloque con calefacción (70°C).
- * Vortex para la homogenización de los bead microtubos, se recomienda el uso del Vortex Genie 2 o similar con un rack horizontal.
- * Homogenizador tipo "Bead mill" (Opcional).

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

Equipment and reagents needed and not provided

- * Ethanol 100%
- * Microcentrifuge
- * 1.5 ml and 2.0 ml microtubes
- * Water bath, dry bath or heated block (70°C).
- * Vortex for homogenization of the bead microtubes, we recommend the use of the Vortex Genie 2 or similar with a horizontal rack.
- * Bead mill homogenizer (optional).

3.PROTOCOLO GENERAL

3.1 Preparaciones preliminares

- Disolver la **Proteinase K** en 1.3 ml 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.
- **Añadir 10 ml de Etanol 100 % al Disinhibition Solution (GHCL 8M)** indicado en la etiqueta. Mantener el envase bien cerrado para evitar la evaporación del etanol.
- **Añadir 40 ml de Etanol 100 % al Washing Solution** indicado en la etiqueta. Mantener el envase bien cerrado para evitar la evaporación del etanol.
- Precalentar el **Hydration Solution** a 70°C.

3.2 Consideraciones Generales

- Las células deben ser recolectadas de cultivos microbianos frescos mediante sedimentación vía centrifugación. El sobrenadante debe ser eliminado mediante aspiración. Los pellets de células microbianas pueden ser utilizados en fresco o almacenados a -20°C o -80°C antes de empezar con la extracción de ADN.

3. GENERAL PROCEDURE

3.1 Preliminary preparations

- Dissolve **Proteinase K** in 1.3 ml in nuclease-free water 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.
- **Add 10 ml of 100% Ethanol to the Disinhibition Solution (GHCL 8M)** indicated on the label. Keep the container tightly closed to prevent evaporation of the ethanol.
- **Add 40 ml of 100 % Ethanol to the Washing Solution** indicated on the label. Keep the container tightly closed to avoid evaporation of the ethanol.
- Preheat the **Hydration Solution** to 70°C

3.2 General Considerations

- Cells should be collected from fresh microbial cultures by sedimentation via centrifugation. The supernatant should be removed by aspiration. Microbial cell pellets can be used fresh or stored at -20°C or -80°C before starting DNA extraction.

- El procedimiento está optimizado gracias a la utilización de **beads** en combinación con un vortex con agitación horizontal (Vortex Genie 2 o similar). La agitación horizontal es imprescindible, por lo que se requiere un adaptador que permita esta orientación.
- Los adaptadores con una orientación vertical no van a permitir una agitación apropiada.
- Es posible utilizar un molino de **beads** para homogeneizar como el Fast Prep, Precellys y otros, pero siempre siguiendo las instrucciones del fabricante para optimizar la lisis de la muestra.

IMPORTANTE: muchos dispositivos de disrupción modernos pueden aplicar demasiada energía. Dependiendo del tipo del tubo y del contenido (**beads**, volumen de líquido, tipo de muestra), especialmente con altas frecuencias de agitación y/o tiempos demasiado largos de agitación pueden causar roturas de los tubos. **Es responsabilidad del usuario testar inicialmente los tubos que se van a utilizar para asegurar la estabilidad y resistencia de los mismos ante las condiciones de la agitación.** Este test inicial puede realizarse con agua en lugar de **Lysis Solution** y con los parámetros del equipo bajos (baja frecuencia, poco tiempo) con la finalidad de evitar derrames de reactivos en caso de roturas.

- Aparte del método estándar, es posible modificar el protocolo para ampliar la cantidad, concentración y comodidad.

Elución estándar: Por comodidad, la elución puede tener lugar en un solo paso, añadiendo 100 µL de tampón de elución a la columna.

Alta cantidad: dos eluciones seriadas de 100 µL cada una para un volumen de eluido igual a 200 µL.

Alta concentración: utilizar los 100 µL del eluido inicial para una segunda elución. 100 µL de volumen eluido total, dos eluciones.

3.3 Protocolo para aislamiento de AND microbiano procedente de cultivos celulares o placas de agar

- a) **Cultivos celulares:** Recoger células de cultivo mediante centrifugación en un tubo de microcentrifuga (no proporcionado). Desechar el sobrenadante. Añadir **800 µl de CTAB Extraction Solution**. Resuspender el pellet utilizando una micropipeta. Sin Vortex. Transferir al microtubo de 2ml que contiene las partículas o **beads**. Se pueden utilizar hasta aproximadamente 50 mg de muestra húmeda de cultivo celular.
 - b) **Placas de agar:** Utilizando un asa de siembra transferir aproximadamente 50 mg de colonias directamente en el microtubo con **beads** al que previamente se la han añadido **800 µl de CTAB Extraction Solution**. Con cuidado de no coger nada de agar. Resuspender el pellet con la ayuda de una micropipeta. No vortex.
1. **Añadir 25 µl de Proteinase K. Incubar a 70°C por 10 minutos.**
 2. **Homogenizar** mediante **Beads** durante 10 minutos a máxima velocidad con el Vortex Genie 2 o similar, siempre con un **adaptador horizontal**.
 3. **Centrifugar a 14.000 rpm durante 5 minutos.**
 4. Transferir 500 µL del sobrenadante a un tubo de microcentrifuga limpio.
IMPORTANTE: Una capa de debris puede aparecer en la superficie del pellet. Evitar arrastrar estos restos con el sobrenadante.
 5. Añadir **250 µl del Binding Solution** y vortex brevemente

- The procedure is optimized by using **beads** in combination with a horizontally shaking vortex (Vortex Genie 2 or similar). Horizontal agitation is essential, so an adapter that allows this orientation is required.
- Adapters with a vertical orientation will not allow proper agitation.
- It is possible to use a **beads** mill for homogenization such as Fast Prep, Precellys and others, but always follow the manufacturer's instructions to optimize sample lysis.

IMPORTANT: many modern disruption devices can apply too much energy. Depending on the tube type and content (**beads**, liquid volume, sample type), especially with high shaking frequencies and/or too long shaking times can cause tube breakage. It is the responsibility of the user to initially test the tubes to be used to ensure their stability and resistance to shaking conditions. This initial test can be performed with water instead of **Lysis Solution** and with low equipment parameters (low frequency, short time) in order to avoid reagent spillage in case of breakage.

- Apart from the standard method, it is possible to modify the protocol to extend the amount, concentration and convenience.

Standard elution: For convenience, the elution can take place in one step by adding 100 µL of elution buffer to the column.

High quantity: two serial elutions of 100 µL each for an eluate volume equal to 200 µL.

High concentration: use the 100 µL of the initial eluate for a second elution. 100 µL total eluate volume, two elutions.

3.3 Protocol for isolation of microbial DNA from cell culture or agar plates

- a) Cell cultures: Collect culture cells by centrifugation in a microcentrifuge tube (not provided). Discard the supernatant. Add 800 µl of **CTAB Extraction Solution**. Resuspend the pellet using a micropipette. No Vortexing. Transfer to the 2ml microtube containing the particles or **beads**. Up to approximately 50 mg of wet cell culture sample can be used.
 - b) Agar plates: Using a seeding loop transfer approximately 50 mg of colonies directly into the microtube with **beads** to which **800 µl of CTAB Extraction Solution** has been added. Be careful not to pick up any agar. Resuspend the pellet with the aid of a micropipette. Do not vortex.
1. **Add 25 µl of Proteinase K. Incubate at 70°C for 10 minutes.**
 2. **Homogenize** by **Beads** for 10 minutes at maximum speed with the Vortex Genie 2 or similar, always with a **horizontal adapter**.
 3. **Centrifuge at 14,000 rpm for 5 minutes.**
 4. Transfer 500 µL of the supernatant to a clean microcentrifuge tube.
IMPORTANT: A layer of debris may appear on the surface of the pellet. Avoid dragging this debris with the supernatant.
 5. Add **250 µl of Binding Solution** and vortex briefly.

6. Cargar la mezcla con la muestra en una **Columns Spin DNA** previamente ensamblada con un **Collection Tubes**. Desechar el líquido. Observar la columna y asegurar que la muestra completa ha pasado al tubo de recolección. Si la muestra permanece en la columna centrifugar de nuevo a 14.000 rpm durante un minuto.
 7. Ensamblar la **Columns Spin DNA** a un nuevo **Collection Tubes**, añadir **500 µl de Disinhibition Solution (GHCL 8M)**. Centrifugar a **14.000 rpm durante un minuto**. Desechar el líquido.
 8. Añadir **700 µl de Washing Solution**. Centrifugar a **14.000 rpm durante 1 minuto**. Desechar el líquido.
 9. **Secar la membrana de sílice**. Centrifugar a 14.000 rpm durante 3 minutos.
 10. Colocar la **Columns Spin DNA** en un tubo de 1,5ml libre de nucleasas (no proporcionado) y añadir **100 µL de Binding Solution precalentado** a 70°C. Incubar a **temperatura ambiente por 2 minutos**.
 11. **Centrifugar** la columna con el tubo ensamblado a **14.000 rpm durante 1 minuto**, a continuación, desechar la columna. El AND purificado se encuentra en el tubo.
6. Load the mixture with the sample onto a **Columns Spin DNA** previously assembled **with a Collection Tubes**. Discard the liquid. Observe the column and ensure that the entire sample has passed into the collection tube. If the sample remains in the column, centrifuge again at 14,000 rpm for one minute.
 7. Assemble the **Columns Spin DNA** to a new **Collection Tubes**, add **500 µl of (GHCL 8M)**. Centrifuge at **14,000 rpm for one minute**. Discard the liquid.
 8. Add **700 µl of Washing Solution**. Centrifuge at **14,000 rpm for 1 minute**. Discard the liquid.
 9. **Dry the silica membrane**. Centrifuge at 14,000 rpm for 3 minutes.
 10. Place the **Columns Spin DNA** in a 1.5ml nuclease-free tube (not provided) and add **100 µL of Binding Solution pre-warmed to 70°C**. Incubate at **room temperature for 2 minutes**.
 11. **Centrifuge** the column with the assembled tube at **14,000 rpm for 1 minute**, then discard the column. The purified DNA is in the tube.

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

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

B65699985