

# REAL MICROBIOME SOIL DNA KIT

Ref. **RBMEGS18:** (para **50 EXTRACCIONES**)(for **50 EXTRATION**)

## 1.INTRODUCCIÓN

El kit DANAGENE MICROBIOME Soil DNA ha sido diseñado para una purificación rápida y eficaz del **ADN microbiano a partir de muestras medioambientales como muestras de suelo.**

En este procedimiento, los microorganismos se lisan eficazmente mediante una combinación de calor, disrupción química y mecánica con microesferas especializadas. Los inhibidores se eliminan por precipitación utilizando un tampón de limpieza patentado. A continuación, la muestra se aplica a una *Columns Spin DNA* y el ADN unido a la columna se somete a un único paso de lavado antes de la elución.

### Características:

- Diseñado para una purificación sencilla y rápida de ADN microbiano procedente de distintos tipos de muestras de suelo.
- Procedimiento de lisis optimizado mediante una combinación de calor, química y *Beads*, permite la purificación de ADN desde levaduras, hongos, bacterias Gram negativas o Gram positivas.
- Elimina sustancias inhibitoras como derivados del ácido húmico y otros inhibidores.
- No es necesaria la extracción con fenol/cloroformas utilizados en las extracciones por precipitación.

### Aplicaciones:

- Análisis de Microbioma
- Aplicaciones PCR
- Análisis RFLP
- Identificación de patógenos
- Análisis de mutaciones

## 1.INTRODUCTION

The DANAGENE MICROBIOME Soil DNA kit is designed for rapid and efficient purification of **microbial DNA from environmental samples such as soil samples.**

In this protocol, microorganisms are efficiently lysed by a combination of heat, chemical reactions and mechanical disruption using beads. Inhibitors are removed by precipitation using a unique wash buffer. Samples are transferred to a *Columns Spin DNA* where DNA is bound, thus requiring only one wash step prior to elution.

### Features:

- Designed for simple and fast purification of microbial DNA from different types of soil samples.
- Optimized lysis procedure using a combination of heat, chemistry and *Beads*, allows purification of DNA from yeast, fungi, Gram-negative or Gram-positive bacteria.
- Removes inhibitory substances such as humic acid derivatives and other inhibitors.
- Avoids the use of phenol/chloroforms used in precipitation extractions.

### Applications:

- Microbiome analysis
- PCR Applications
- RFLP analysis
- Pathogen identification
- Mutation analysis.

## 2.COMPONENTES DEL KIT / KIT COMPONENTS

Componente REAL	Ref.	Envase	T°
Washing solution	EP08	10 ml	RT
Proteinase K	REA02	30 mg	-20°C
Bead Microtubes	RBD	50 unid.	RT
Hydration Solution	REA05	10 ml	RT
EC Solution	RES05	8 ml	RT
Soil lysis solution	RES06	30 ml	RT
Enhancer solution	RES07	5 ml	RT
Soil binding solution	RES08	50 ml	RT
Columns Spin DNA	RSC03	50 unid.	RT
Collection Tubes	R30	100 unid.	RT

\* *Estas soluciones requieren un tratamiento previo como se indica en la sección Preparativos preliminares de este protocolo.*

**PRECAUCIONES:** La *Soil lysis solution* y el tampón de desinhibición contiene sales de guanidina y deben ser manipulados con cuidado. Las sales de guanidina forman compuestos altamente reactivos si se combinan con cloro

\* *These solutions require pretreatment as indicated in the Preliminary Preparations section of this protocol.*

**CAUTIONS:** Soil lysis solution and Disinhibition buffer contain guanidine salts and should be handled with care. Guanidine salts form highly reactive compounds if combined with chlorine

### 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 (65°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).

### 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 (65°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 de agua libre de nucleasas 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.
- Añadir 40 ml de Etanol 100 % al *Washing Solution*. Mantener el recipiente cerrado para evitar la evaporación del etanol.
- Precalentar el *Hydration Solution* a 70°C.

### 3.2 Consideraciones generales

#### Cantidad de material de partida

Por lo general, una reducción del material de partida también ayuda a mejorar la eficacia de la lisis y a aumentar la pureza del ADN.

El material muy seco puede absorber grandes volúmenes de *Lysis Solution* y *Enhancer Solution*. En este caso, reduzca la cantidad de material de muestra o añada más *Lysis Solution* y *Enhancer Solution*.

Si es posible, elimine el material extraño, como hojas, piedras o ramas (por ejemplo, tamizándolo), así como el exceso de agua (por ejemplo, desechando el sobrenadante después de centrifugar las muestras de sedimento).

#### Lisado de la muestra

El tiempo de procesamiento variará en función de la entrada de la muestra y de la velocidad del disruptor. Los tiempos pueden ser de tan sólo 5 minutos cuando se utilizan disruptores celulares de alta velocidad (*FastPrep*) o de 10-20 minutos cuando se utilizan velocidades más bajas (*Disruptor Genie*).

El procedimiento se optimiza utilizando "Beads" 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 orientación vertical del tubo no agitan correctamente.

Puede utilizar homogeneizadores "Bead mill" como *FastPrep*, *Precellys* y otros, pero siguiendo las instrucciones del fabricante para optimizar la lisis de la muestra. IMPORTANTE: Muchos dispositivos de ruptura modernos pueden provocar un aporte de energía muy elevado en los tubos de microesferas. Dependiendo del tipo de tubo de microesferas 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 tubos de microesferas. 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 *Lysis Solution* y un ajuste moderado de la máquina (baja frecuencia, corta duración) para evitar el derrame de solución de lisis caotrópico en caso de rotura del tubo.

## 3. GENERAL PROCEDURE

### 3.1 Preliminary preparations

- Dissolve *Proteinase K* in 1.3 ml of nuclease-free water and store at -20°C. It is recommended to make several aliquots to avoid many thawing/freezing cycles. At this temperature it is stable for 1 year.
- Add 40 ml of 100% Ethanol to the *Washing Solution*. Keep the container closed to avoid evaporation of the ethanol.
- Preheat the *Hydration Solution* to 70°C.

### 3.2 General considerations

#### Amount of starting material

Generally, a reduction of starting material also helps to improve lysis efficiency and increase DNA purity.

Very dry material can absorb large volumes of *Lysis Solution* and *Enhancer Solution*. In this case, reduce the amount of sample material or add more *Lysis Solution* and *Enhancer Solution*.

If possible, remove foreign material such as leaves, stones or twigs (e.g. by sieving) as well as excess water (e.g. by discarding the supernatant after centrifuging sediment samples).

#### Sample lysing

Processing time will vary depending on sample input and disruptor speed. Times can be as little as 5 minutes when using high speed cell disrupters (*FastPrep*) or 10-20 minutes when using lower speeds (*Disruptor Genie*).

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

Adapters with vertical tube orientation do not shake properly.

You can use "Bead mill" homogenizers such as *FastPrep*, *Precellys* and others, but follow the manufacturer's instructions to optimize sample lysis. IMPORTANT: Many modern disruption devices can cause very high energy input into the bead tubes. Depending on the type of bead tube and its contents (beads, liquid volume, sample type), a particularly high shaking frequency and/or prolonged shaking duration may cause the bead tubes to rupture. It is the responsibility of the user to perform the initial stability test of the bead tubes used under the conditions employed. Perform the initial test with water instead of *Lysis Solution* and a moderate machine setting (low frequency, short duration) to avoid spillage of chaotropic lysis buffer in case of tube breakage.

### Muestree a mano

Recoja las muestras de acuerdo con las directrices de su laboratorio y las necesidades experimentales.

Asegúrese de que las muestras se mezclan bien con la *Lysis Solution* y *Enhancer Solution* para crear una muestra homogénea.

Una forma de asegurar una mezcla completa es agitar el tubo con la tapa hacia abajo.

### 3.3 Protocolo para una extracción de 250 mg de ADN a partir de muestras ambientales

1. Pesar **250 mg de muestra de suelo** en un *Beads Microtubes* de 2,0 mL y añadir **600 µL de Soil lysis solution**. Agitar en vórtex.  
Dependiendo de la naturaleza del suelo puede ser necesario aumentar proporcionalmente el *Soil lysis solution* y el *Enhancer Solution* con el objetivo de recuperar 400 µl de sobrenadante en el punto 5. Puede solicitar tampones adicionales.
2. Añadir **100 µL de Enhancer Solution**. Mezclar bien agitando suavemente el microtubo.
3. Añadir **25µ de Proteinase K**. Incubar a **65°C durante 10 minutos**.
4. **Homogeneizar** junto con las *Beads Microtubes* 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 y minimizar la liberación de ácidos húmicos. Sin embargo, dependiendo de la muestra, puede ser ventajoso aumentar el tiempo de lisis a 10, 20 o 30 min.
5. **Centrifugar a 14.000 rpm durante 5 minutos**. Transferir hasta **400 µL del sobrenadante** a un tubo de microcentrífuga limpio.  
**IMPORTANTE:** Puede haber una capa de restos encima del precipitado de microesferas. Evitar transferir estos restos con el sobrenadante.
6. **Añadir 150 µl del EC Solution**. Agitar mediante vórtex. Incubar a 0-4°C durante 5 minutos.
7. **Centrifugar a 14.000 rpm durante 3 minutos**. Transferir hasta **500 µl de sobrenadante** en un nuevo microtubo de 1,5 ml evitando tocar el pellet.
8. Añadir **900 µl de Soil Binding solution** y agitar brevemente en vórtex.
9. Cargar **700 µl de muestra** de mezcla en el depósito de un conjunto combinado de *Collection tubes* y *Columns Spin DNA* microbiano. **Centrifugar a 8.000 rpm durante 30 segundos**. Retirar el tubo de recogida.
10. Desechar el flujo y repetir el paso 9 con el resto de la mezcla de muestras.  
Asegúrese de que toda la mezcla de muestra ha pasado al *Collection tubes* inspeccionando la *Columns Spin DNA*. Si queda muestra en la columna, centrifugar de nuevo a 14.000 rpm durante 1 minuto.
11. Añadir **700 µl de Washing Solution**. **Centrifugar a 14.000 rpm durante 1 minuto**. Desechar el flujo.
12. **Secar la membrana de sílice**. Centrifugar a 14.000 rpm durante 3 minutos.
13. Colocar la *Columns Spin DNA* Microbiano en un tubo de 1,5 mL libre de nucleasas (no suministrado) y añadir **50-100 µL de Hydration solution precalentado a 70°C**. Incubar a temperatura ambiente durante **2 minutos**.
14. **Centrifugar** el conjunto de columna-tubo de centrifugación a **14.000 rpm durante 1 minuto** y desechar la columna. El ADN purificado se encuentra en el tubo.

### Sample by hand

Collect samples according to your laboratory guidelines and experimental needs.

Ensure that the samples are thoroughly mixed with the *Lysis Solution* and *Enhancer Solution* to create a homogeneous sample.

One way to ensure thorough mixing is to shake the tube with the cap down.

### 3.3 Protocol for an extraction of 250 mg of DNA from environmental samples

1. Weigh **250 mg of soil sample** into a 2.0 mL *Beads Microtubes* and add **600 µL of soil lysis solution**. Vortex.  
Depending on the nature of the soil it may be necessary to increase the *Soil Lysis Solution* and *Enhancer Solution* proportionally with the goal of recovering 400 µL of supernatant at point 5. Additional buffers may be requested.
2. Add **100 µL of Enhancer Solution**. Mix well by gently shaking the microtube.
3. Add **25µ of Proteinase K**. **Incubate at 65°C for 10 minutes**.
4. **Homogenize** together with the *Beads Microtubes* for **10 minutes** at maximum speed in the **Vortex Genie 2 or similar using a horizontal adapter**.  
The lysis time should be as short as necessary to avoid DNA shearing and minimize the release of humic acids. However, depending on the sample, it may be advantageous to increase the lysis time to 10, 20 or 30 min. **Centrifuge at 14,000 rpm for 5 minutes**.
5. Transfer up to **400 µL of the supernatant** to a clean microcentrifuge tube.  
**IMPORTANT:** There may be a layer of debris on top of the bead pellet. Avoid transferring this debris with the supernatant.
6. **Add 150 µl of EC Solution**. **Vortex**. Incubate at 0-4°C for 5 minutes.
7. **Centrifuge at 14,000 rpm for 3 minutes**. Transfer up to **500 µl of supernatant** into a new 1.5 ml microtube, avoiding touching the pellet.
8. Add **900 µl of Soil Binding Solution** and vortex briefly.
9. Load **700 µl of sample** mix into the reservoir of a combined *Collection tubes* and *Columns Spin DNA* assembly. **Centrifuge at 8,000 rpm for 30 seconds**. Remove the collection tube.
10. Discard the flow-through and repeat step 9 with the remainder of the sample mixture.  
Ensure that all sample mixture has passed into the *Collection tubes* by inspecting the *Columns Spin DNA*. If sample remains in the column, centrifuge again at 14,000 rpm for 1 minute.
11. Add **700 µl Washing Solution**. **Centrifuge at 14,000 rpm for 1 minute**. Discard the flow.
12. **Dry the silica membrane**. Centrifuge at 14,000 rpm for 3 minutes.
13. Place the *Microbial Columns Spin DNA* in a 1.5 mL nuclease-free tube (not supplied) and add **50-100 µL of Hydration solution pre-warmed to 70°C**. Incubate at room temperature for **2 minutes**.
14. **Centrifuge** the column-spin tube assembly at **14,000 rpm for 1 minute** and 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](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>		Corrosivo / <i>Corrosive</i>
	Contiene suficiente para n pruebas / <i>Contains enough for n tests</i>		Peligro para la salud / <i>Health hazard</i>



B65699985