

REAL MICROBIOME SALIVA DNA KIT

Ref. RBMEGS19: (para 50 EXTRACCIONES)

(for 50 EXTRATION)

1.INTRODUCCIÓN

El **microbioma oral** es uno de los más diversos de cualquier comunidad microbiana asociada al ser humano. El microbioma oral es un factor causante de afecciones como la caries dental, la enfermedad periodontal y la halitosis, y también se ha implicado como reservorio de infecciones en otros lugares del cuerpo y en la patogénesis de enfermedades no orales, como la enfermedad inflamatoria intestinal.

El kit REAL MICROBIOME Saliva DNA ha sido diseñado para una purificación rápida y eficiente del **ADN microbiano** para el análisis del microbioma utilizando:

- Hasta 600-800 µl de muestras de saliva fresca.
- Muestras de saliva conservadas con nuestro kit de recogida de muestras de microbioma de saliva REAL.**



Características:

- Diseñado para la purificación rápida de ADN microbiano de alta pureza para el análisis del microbioma.
- Tecnología de membrana de sílice con columnas MiniSpin.
- Microtubos de microesferas para una lisis eficiente incluidos en combinación de proteinasa K líquida.
- Material de muestra: saliva / muestras de saliva conservadas.
- Rendimiento típico: Aprox. 2-20 µg dependiendo del paciente.
- Tiempo de preparación: 35 min.
- Volumen de elución: 100 µl.

1.INTRODUCTION

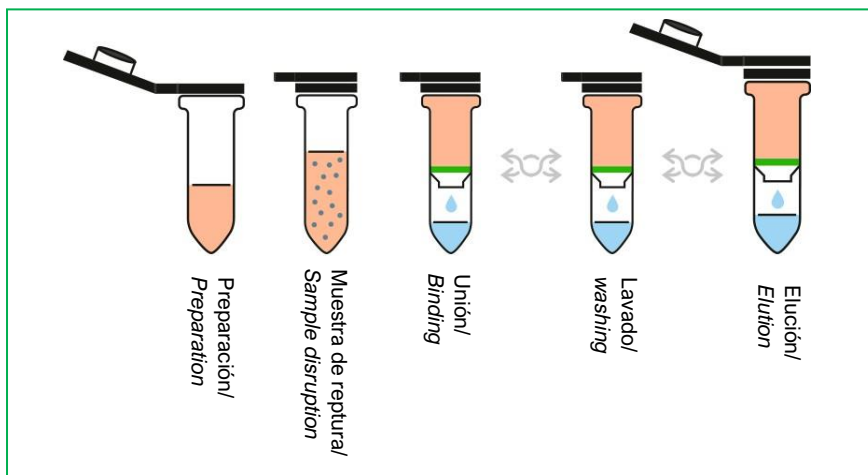
The **oral microbiome** is one of the most diverse of any human-associated microbial community. The oral microbiome is a causative factor in conditions such as dental caries, periodontal disease, and halitosis, and has also been implicated as a reservoir for infection at other body sites and in the pathogenesis of non-oral diseases, such as inflammatory bowel disease.

REAL MICROBIOME Saliva DNA kit has been designed for a fast and efficient purification of **microbial DNA** for microbiome analysis using:

- Up to 600-800 µl of fresh saliva samples.
- Preserved saliva samples with our REAL Saliva Microbiome Sample Collection Kit.**

Features:

- Designed for rapid purification of highly pure microbial DNA for microbiome analysis.
- Silica-membrane technology with MiniSpin columns.
- Bead Microtubes for efficient lysis included in combination liquid Proteinase K.
- Sample material: saliva / preserved saliva samples.
- Typical yield: Approx. 2-20 µg depends on patient.
- Preparation Time: 35 min.
- Elution volume: 100 µl.



Comenzando con un protocolo de Bead-beating, las células se lisan mediante una combinación de fuerza mecánica, calor y detergente, se vortexizan utilizando un adaptador horizontal para el Vortex Genie 2 Vortex o utilizando otros dispositivos de disrupción comunes. Las condiciones adecuadas de unión del ADN a las columnas de ADN microbiano se consiguen añadiendo grandes cantidades de sales caotrópicas (*Binding Solution*) al lisado. Los contaminantes se eliminan mediante dos pasos de lavado eficaces. Después, el ADN resultante se recupera en un tampón Tris libre de ADN para utilizarlo en reacciones posteriores.

La composición microbiana de la muestra de saliva conservada a temperatura ambiente permanece inalterada después de dos meses con el Kit MICROBIOME de recogida de muestras REAL SALIVA. Las muestras de saliva se tomaron con nuestro sistema y se conservaron a temperatura ambiente. Se tomaron muestras en los puntos temporales indicados y se procesaron con el REAL MICROBIOME SALIVA DNA Kit. El ADN extraído se sometió a un perfil de composición microbiana mediante secuenciación dirigida del gen 16S rRNA. Las muestras tenían una composición microbiana constante. **Fig.1**

Beginning with a Bead-beating protocol, cells are lysed through a combination of mechanical force, heat and detergent, vortexed using horizontal adapter for the Vortex Genie 2 Vortex or using others common disruption devices.

Appropriate DNA binding conditions to the Microbial DNA Columns are achieved by addition of large amounts of chaotropic salts (*Binding Solution*) to the lysate. Contaminants are removed by two efficient washing steps. Afterwards, the resulting DNA is recovered in a DNA-free Tris buffer to use for subsequent reactions.

Microbial composition of saliva sample preserved at room temperature is unchanged after two months with REAL SALIVA Sample Collection MICROBIOME Kit.

Saliva samples were taken using our system and stored at room temperature. They were sampled at the indicated time points and processed with the REAL MICROBIOME SALIVA DNA Kit. The extrated DNA was the subjected to microbial composition profiling via 16S rRNA gene targeted sequencing. Samples had a constant microbial composition. **Fig.1**

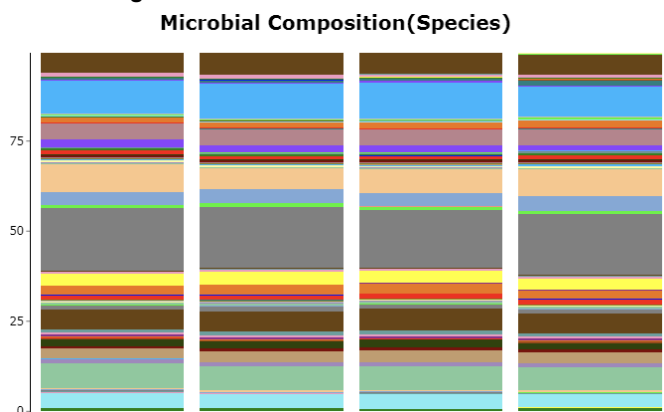


Fig.1 Muestras de saliva con el kit MICROBIOME de recogida de muestras REAL SALIVA -Especies

Fig.1 Saliva Samples with REAL SALIVA Sample Collection MICROBIOME Kit -Specie

2.COMPONENTES DEL KIT / KIT COMPONENTS

| Componente REAL | Ref. | Envase. | T° |
|----------------------------------|-------|-----------|-------|
| Washing solution | EP08 | 10 ml | RT |
| Bead Microtubes | RBD | 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 | RES03 | 45 ml | RT |
| Binding Solution | RES04 | 15 ml | RT |
| Columns Spin DNA | RSC03 | 50 unid. | RT |
| Collection Tubes | R30 | 100 unid. | RT |

(*) Estas soluciones deben prepararse como se indica en la sección Preparaciones preliminares del protocolo.

(*) These solutions must be prepared as indicated in the Preliminary Preparations section of the protocol.

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).

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. GENERAL PROCEDURE

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 10 ml de Etanol 100 % al *Disinhibition Solution (GHCL 8M)*. Mantener el recipiente cerrado para evitar la evaporación del etanol.
- Añadir 40 ml de Etanol 100 % al *Washing Solution*. Mantener el recipiente cerrado para evitar la evaporación del etanol.
- Precalear el *Hydration Solution* 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.
- **Add 10 ml of Ethanol 100 %** to the *Disinhibition Solution (GHCL 8M)*. Keep the container closed to avoid the ethanol evaporation.
- **Add 40 ml of Ethanol 100 %** to the *Washing Solution*. Keep the container closed to avoid the ethanol evaporation.
- Pre-heat the *Hydration Solution* at 70°C.

3.2 Consideraciones generales

- Las muestras de saliva deben ser muestras de saliva fresca o conservada con nuestro Kit MICROBIOME de recogida de muestras REAL.
- 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;
- Los adaptadores con orientación vertical del tubo no agitan correctamente.
- Puede 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 tubo de microesferas y de su contenido (microesferas, volumen de líquido, tipo de muestra), una frecuencia de agitación especialmente alta y/o la duración prolongada de la agitación 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 tampón de lisis 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.
- Además del método estándar, son posibles varias modificaciones para aumentar el rendimiento, la concentración y la comodidad.

3.2 General considerations

- Saliva samples must be fresh or preserved saliva samples with our REAL Sample Collection MICROBIOME Kit.
- The procedure is optimized by using "Beads" in a vortex with horizontal agitation (Vortex Genie 2 or similar). Make sure that the vortex adapter allows horizontal agitation;
- Adapters with a vertical tube orientation may not agitate properly.
- 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 tube 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 tubes! **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 lysis buffer and moderate machine setting (low frequency, short time) in order to avoid spillage of chaotropic lysis buffer in case of tube breakage.
- In addition to the standard method, several modifications are possible to increase yield, concentration, and convenience.

Convenient elution (standard elution): For convenience, elution can be performed by one time addition of 100 µL *Hydration Solution* onto the column.

High yield: Two serial elutions of 100 µL each for total elution volume of 200 µL.

High concentration: Use initial 100 µL eluate for second elution – 100 µL total elution volume, 2 elutions.

3.3 Protocolo de aislamiento del ADN microbiano a partir de muestras de saliva

- a) **Muestras de saliva***: Centrifugar **600-800 µl de muestra de saliva** durante 90 segundos. Retirar el sobrenadante utilizando una pipeta y evitando dañar el pellet blanco visible de células.
- b) Muestras de saliva conservadas en el REAL SALIVA Sample Collection Kit*:

1b) En el REALSALIVA Sample Collection MICROBIOME Kit se apreciará un pellet blanco conteniendo las células bucales. Agitar el tubo que contiene 1 ml de la saliva recogida. **Es importante observar una solución homogénea antes de tomar 1,2 ml de muestra.**

2b) Centrifugar **1,2 ml (saliva + solución de conservación de saliva)** durante 90 segundos a 13.000-16.000 x g. Retirar el sobrenadante utilizando una pipeta y evitando dañar el pellet blanco visible de células. Volver a centrifugar (spin pulse) y eliminar el líquido total.

* Si el pellet celular es muy pequeño se puede añadir otra muestra de saliva para obtener un pellet más grande con el fin de obtener mayor rendimiento de ADN y repetir el paso de centrifugación.

- Añadir **800 µl de CTAB Extraction Solution** al pellet blanco visible de células. Resuspender el pellet utilizando una micropipeta. No agitar.
- Añadir 25 µl de *Proteinase K*. Incubar a 70°C durante 10 minutos.
- Homogeneizar** por batido durante 10 minutos a máxima velocidad en el Vortex Genie 2 o similar utilizando un **adaptador horizontal**.
- Centrifugar a 14.000 rpm durante 5 minutos.
- Transferir hasta 500 µL del sobrenadante a un tubo de microcentrifuga limpio. **IMPORTANTE:** Puede haber una capa de restos encima del precipitado de microesferas. Evitar transferir estos restos con el sobrenadante.
- Añadir **250 µl de Binding Solution** y agitar brevemente.
- Cargar la mezcla de la muestra en un **conjunto de Columns Spin DNA** y desechar el flujo. Asegúrese de que toda la mezcla de la muestra ha pasado al *Collection Tube* inspeccionando la columna. Si la muestra permanece en la columna, centrifugar de nuevo a 14.000 rpm durante 1 minuto.
- Colocar la **Columns Spin DNA** microbiano en un tubo de recogida limpio, añadir **500 µl de Desinhibition Solution (GHCL 8M)** y centrifugar a **14.000 rpm durante 1 minuto**. Desechar el flujo.
- Añadir 700 µl de *Washing Solution*. Centrifugar a 14.000 rpm durante 1 minuto. Desechar el flujo.
- Secar la membrana de sílice**. Centrifugar a 14.000 rpm durante 3 minutos.
- Colocar la **Columns Spin DNA** Microbiano en un tubo de 1,5 mL libre de nucleasas (no suministrado) y añadir **100 µl de Hydration Solution precalentado** a 70°C. Incubar a **temperatura ambiente durante 2 minutos**.
- Centrifugar** el conjunto columna-tubo de centrifugación a **14.000 rpm durante 1 minuto** y desechar la columna. El ADN purificado se encuentra en el tubo.

3.3 Protocol for microbial DNA isolation from saliva samples

- a) **Saliva samples***: Centrifuge **600-800 µl saliva sample** for 90 seconds. Remove the supernatant using a pipette and avoiding damaging the cell visible white pellet.
- b) Preserved saliva samples in REAL SALIVA Sample Collection Kit*:

1b). In the REALSALIVA Sample Collection MICROBIOME Kit it will be appreciated a white pellet containing the buccal cells. Shake the tube containing 1 ml of the collected saliva. **It is important to observe a homogeneous solution before to take 1.2 ml of sample.**

2b) Centrifuge **1.2 ml (saliva + saliva preservation solution)** for 90 seconds at 13.000-16.000 x g. Remove the supernatant using a pipette and avoiding damaging the cell visible white pellet. Re-centrifuge (spin pulse) and eliminate the total liquid.

** If the cell pellet is very small you can add another saliva sample to obtain a pellet more big in order to obtain more DNA yield and repeat the centrifugation step.*

- Add **800 µl of CTAB Extraction Solution** to the cell visible white pellet. Resuspend the pellet using a micropipette. No vortex.
- Add 25 µl of *Proteinase K*. Incubate at 70°C for 10 minutes.
- Homogenize** by bead beating for 10 minutes at maximum speed on the Vortex Genie 2 or similar using a **horizontal adapter**.
- Centrifuge at 14.000 rpm for 5 minutes.
- Transfer up to 500 µL of the supernatant to a clean microcentrifuge tube. **IMPORTANT:** A layer of debris may be present on top of the bead pellet. Avoid transfer of this debris with the supernatant.
- Add **250 µl of Binding Solution** and vortex briefly.
- Load the sample mixture onto a **Microbial DNA Columns Spin DNA assembly**, and Discard the flow-through. Ensure that the entire sample mixture has passed into the *Collection Tube* by inspecting the column. If sample remains in the column, centrifuge again at 14.000 rpm for 1 minute.
- Place the Microbial **Columns Spin DNA** in a clean collection tube, add **500 µl of Desinhibition Solution (GHCL 8M)**. **Centrifuge at 14.000 rpm for 1 minute**. Discard the flow-through.
- Add 700 µl of *Washing Solution*. Centrifuge at 14.000 rpm for 1 minute. Discard the flow-through.
- Dry silica membrane**. Centrifuge at 14.000 rpm for 3 minutes.
- Place the Microbial **Columns Spin DNA** into a 1.5 mL nuclease-free tube (not provided) and add **100 µl Pre-heat the Hydration Solution** at 70°C. Incubate **at room temperature for 2 minutes**.
- Centrifuge** the spin column-tube assembly 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