

REAL MICROBIOME VAGINAL DNA KIT

Ref. **RBMEGS20:** (para **50 EXTRACCIONES**)

(for **50 EXTRATION**)

1. INTRODUCCIÓN

El **microbioma vaginal** es una parte específica del microbioma humano. Las condiciones únicas de la vagina dan lugar al crecimiento de diversas especies de microorganismos, normalmente lactobacilos.

El microbioma vaginal alberga diversas comunidades de microorganismos, que forman la flora vaginal, la cual tiene un importante impacto en la salud tanto de la mujer como de sus futuros hijos.

El ecosistema cervicovaginal está formado por diversos microorganismos que coexisten en un balance dinámico estableciendo complejas conexiones tanto entre las diferentes colonias como con el hospedador. En mujeres en edad reproductiva, en el microbioma vaginal, generalmente predomina la presencia de *Lactobacillus genus*, y en muchas mujeres destaca también la prevalencia de *L. crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii* y *L. gasseri*. Los lactobacilos colaboran con el mantenimiento de la homeostasis vaginal y previenen de la colonización y crecimiento de otros microorganismos indeseados, como pueden ser aquellos que causan infecciones de transmisión sexual (STI).

La composición de la microbiota vaginal depende de la edad, etapa del ciclo menstrual, fluctuaciones hormonales, comportamientos sexuales, o incluso del uso de diversos fármacos como probióticos o antibióticos, los cuales podrían un desequilibrio en la microbiota. Como parte del Proyecto del microbioma humano, el estudio del microbioma vaginal ha mostrado la relación existente entre las bacterias presentes en la vagina y diversas enfermedades.

REAL ha desarrollado un sistema completo para el estudio del **MICROBIOMA VAGINAL**:

1. VAGINAL SELF-COLLECTION SWAB para la recolección y estabilización del DNA microbiano de la vagina para un análisis del microbioma.

2. REAL MICROBIOME VAGINAL DNA Kit ha sido diseñado para una purificación rápida y eficiente del DNA microbiano para muestras vaginales.

Características:

VAGINAL SELF-COLLECTION SWAB

La nueva solución para una toma de muestra en casa, fácil de realizar, transportar y procesar en el laboratorio.

El hisopo vaginal para auto-recogida es un novedoso método de recolección que ofrece diversas ventajas en comparación con otros métodos tradicionales:

- Minimiza el tiempo requerido
- Absoluta privacidad
- Máxima comodidad
- Reduce la ansiedad

1. INTRODUCTION

The **vaginal microbiome** is a specific part of the human microbiome. The unique conditions of the vagina give rise to the growth of diverse species of microorganisms, usually lactobacilli.

The vaginal microbiome harbors diverse communities of microorganisms, which form the vaginal flora, which has an important impact on the health of both the woman and her future children.

The cervicovaginal ecosystem is made up of diverse microorganisms that coexist in a dynamic balance establishing complex connections both between the different colonies and with the host. In women of reproductive age, the vaginal microbiome is generally dominated by the presence of *Lactobacillus genus*, and many women also have a prevalence of *L. crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii* and *L. gasseri*¹. Lactobacilli contribute to the maintenance of vaginal homeostasis and prevent the colonization and growth of other undesirable microorganisms, such as those that cause sexually transmitted infections (STI).

The composition of the vaginal microbiota depends on age, stage of the menstrual cycle, hormonal fluctuations, sexual behaviors, or even the use of various drugs such as probiotics or antibiotics, which may cause an imbalance in the microbiota. As part of the Human Microbiome Project, the study of the vaginal microbiome has shown the relationship between the bacteria present in the vagina and various diseases.

REAL has developed a complete system for the study of the **VAGINAL MICROBIOME**:

1. VAGINAL SELF-COLLECTION SWAB for the collection and stabilization of microbial DNA from the vagina for a microbiome analysis.

2. REAL MICROBIOME VAGINAL DNA Kit has been designed for rapid and efficient purification of microbial DNA for vaginal samples.

Features:

VAGINAL SELF-COLLECTION SWAB

The new solution for at-home sampling, easy to perform, transport and process in the laboratory.

The vaginal self-collection swab is a novel collection method that offers several advantages compared to other traditional methods:

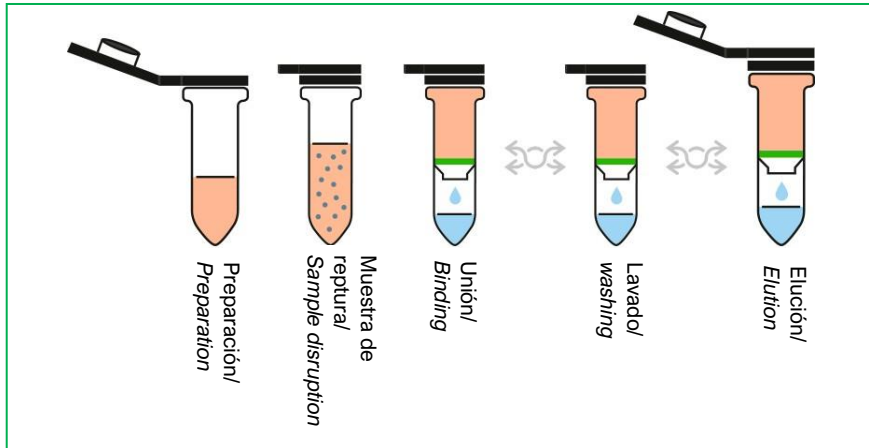
- Minimizes the time required
- Absolute privacy
- Maximum convenience
- Reduces anxiety

REAL MICROBIOME VAGINAL DNA Kit

- Diseñado para una rápida purificación de DNA microbiano para el análisis del microbioma. • Tecnología basada en una membrana de sílice con *Columns Spin DNA*
- Para una lisis eficiente el kit incluye Bead Microtubos en combinación con Proteinasa K líquida.
- Material de muestreo: hisopos vaginales.
- Rendimiento típico: depende del paciente.
- Tiempo de preparación: 35 min.
- Volumen de elución: 100 µl.

REAL MICROBIOME VAGINAL DNA Kit

- Designed for rapid purification of microbial DNA for microbiome analysis. - Silica membrane based technology with *Columns Spin DNA*
- For efficient lysis the kit includes Bead Microtubes in combination with Proteinase K liquid.
- Sampling material: vaginal swabs.
- Typical yield: depends on the patient.
- Preparation time: 35 min.
- Elution volume: 100 µl.



Empezando con un protocolo de Bead-beating, las lisis celular se produce por una combinación de fuerzas mecánicas, calor y detergentes. Tras una agitación utilizando un adaptador horizontal para el Vortex Genie 2 Vortex (recomendado) u otros dispositivos de ruptura se consigue una lisis celular eficiente.

Gracias a la adición al lisado de una serie de sales caotrópicas contenidas en el *Binding Solution*, se consigue una apropiada unión del DNA a la matriz de las columnas. Las sustancias contaminantes son eliminadas gracias a dos eficientes etapas de lavado. A continuación, el DNA resultante es recuperado con un tampón Tris libre de DNA, para poder ser utilizado posteriormente.

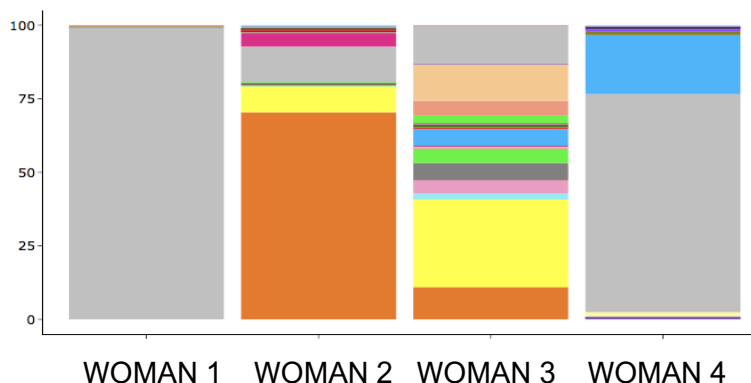
Composición microbiana de muestras vaginales preservadas a temperatura ambiente de 4 mujeres diferentes obtenidas mediante el VAGINAL SELF-COLLECTION SWAB. Las muestras vaginales fueron tomadas usando nuestro sistema y almacenadas a temperatura ambiente. Fueron procesadas con el REAL MICROBIOME VAGINAL DNA Kit. El DNA extraído se sometió a un perfil de composición microbiana mediante secuenciación dirigida al gen 16s rRNA. Fig.1

Starting with a Bead-beating protocol, cell lysis is produced by a combination of mechanical forces, heat and detergents. After agitation using a horizontal adapter for the Vortex Genie 2 Vortex (recommended) or other rupture devices, efficient cell lysis is achieved.

Due to the addition to the lysate of a series of chaotropic salts contained in the *Binding Solution*, proper DNA binding to the column matrix is achieved. Contaminants are removed by two efficient washing steps. The resulting DNA is then recovered with a DNA-free Tris buffer for further use.

Microbial composition of room temperature preserved vaginal samples from 4 different women obtained using the VAGINAL SELF-COLLECTION SWAB. Vaginal samples were collected using our system and stored at room temperature. They were processed with the REAL MICROBIOME VAGINAL DNA Kit. The extracted DNA was subjected to microbial composition profiling by targeted sequencing of the 16s rRNA gene. Fig.1

Microbial Composition(Species)



2.COMONENTES DEL KIT / KIT COMPONENTS

Componente REAL	Ref.	Envases.	T°
Washing solution	EP08	10 ml	RT
Bead Microtubes	RBD1	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	50 ml	RT
Bonding Solution	RES04	15 ml	RT
Columns Spin DNA	RSC03	50 unid.	RT
Collection Tubes	R30	100 unid.	RT
Swabs	REGS20	50 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 dividir la disolución en varias alícuotas para evitar excesivos ciclos de descongelación/congelación. A esta temperatura es estable por un año.
- **Añadir 10 ml de Etanol 100%** al *Disinhibition Solution (GHCL 8M)*. Mantener el frasco bien cerrado para evitar la evaporación del etanol.
- **Añadir 40 ml de Etanol 100%** al *Washing Solution*. Mantener el frasco bien cerrado para evitar la evaporación del etanol
- Precalentar el *Hydration Solution* a 70°C.

3.2 Consideraciones generales

- INSTRUCCIONES PARA LA RECOGIDA DE MUESTRA:

Abrir el *Swabs* solo cuando se vaya a utilizar con cuidado de no tocar superficies con la punta del *Swabs*. No utilizar si está embarazada o en los tres meses siguientes al parto. Lavarse las manos. Ponerse en una posición cómoda y tomar la muestra. La muestra recogida puede conservarse en el tubo a temperatura ambiente. Restituya el *Swabs* según las instrucciones proporcionadas por separado. NOTAS: Si durante la autotoma se produjeran eventos inesperados no descritos en las instrucciones, póngase en contacto con el médico.

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 General considerations

- INSTRUCTIONS FOR SAMPLE COLLECTION:

Open the *Swabs* only when it is to be used taking care not to touch surfaces with the tip of the *Swabs*. Do not use if pregnant or within three months of delivery. Wash your hands. Get into a comfortable position and collect the sample. The collected specimen can be stored in the tube at room temperature. Return the *Swabs* according to the instructions provided separately. NOTES: If unexpected events not described in the instructions occur during the self-test, contact the physician.

- Las muestras vaginales deben ser tomadas con. Los *Swabs* tienen la capacidad de **estabilizar ácidos nucleicos a temperatura ambiente hasta 4 semanas**.
- El procedimiento está optimizado mediante el uso de “Beads” que deben ser agitados con un Vortex que permita una agitación horizontal (Vortex Genie 2 o similar). Es importante que esta agitación sea horizontal.
- Los adaptadores con una orientación vertical pueden no agitar la muestra adecuadamente.
- Se pueden usar homogeneizadores de bolas como el FasPrep, Precellys y otros, pero siguiendo las instrucciones del fabricante para optimizar el lisado de la muestra. **IMPORTANTE:** Muchos dispositivos de disrupción modernos pueden aplicar una entrada de energía demasiado alta en los tubos con Beads. Dependiendo del tipo de tubo y su contenido (Beads, volumen de líquido, tipo de muestra, etc.), especialmente con altas frecuencias de vibración o una duración excesiva de la agitación, pueden romper los tubos. **Es responsabilidad del usuario testar previamente la estabilidad de los tubos bajo las condiciones que se vayan a utilizar.** Se debe realizar un test inicial sustituyendo el tampón de lisis por agua y ajustando la máquina para que trabaje en condiciones moderadas (baja frecuencia, poco tiempo) con la finalidad de evitar derramar el tampón de lisis en caso de rotura del tubo.
- Diversas modificaciones se pueden aplicar adicionalmente al método estándar para aumentar el rendimiento, la concentración y a conveniencia del usuario.
Elución conveniente (elución estándar): Por conveniencia, la elución puede ser llevada a cabo mediante la adición única de 100 µL de tampón de elución a la columna.
Alto rendimiento: Dos eluciones en serie de 100 µL cada una para un volumen total de elución de 200 µL.
Alta concentración: Usar inicialmente 100 µL de eluato para una segunda elución – volumen total eluato: 100 µL, 2 eluciones.

3.3 Protocolo para el aislamiento del DNA microbiano de muestras vaginales

- Añadir **900 µl de CTAB Extraction Solution** a un microtubo de 2.0 ml.

Cortar la cabeza del *Swabs* junto con una parte del mango e introducir en el microtubo, de forma que el microtubo puede quedar bien cerrado. Pasar por el vortex de forma vigorosa para liberar las células de las fibras del hisopo.

- Añadir 25 µl de Proteinase K. Incubar a 70°C por 10 minutos.**
- Retirar el fragmento de *Swabs* de la solución de lisis, presionando con las paredes para recuperar el máximo volumen de líquido posible. **Transferir 900 µl del lisado a un microtubo con “Beads”.**
- Homogenizar** por 10 minutos a máxima velocidad en un Vortex Genie 2 or similar utilizando un **adaptador horizontal**.
- Centrifuga at 14.000 rpm por 5 minutos.**
- Transferir 500 µL del supernadante a un tubo de microcentrifuga limpio.

- Vaginal swabs should be taken with. The *Swabs* have the ability to **stabilize nucleic acids at room temperature for up to 4 weeks**.
- The procedure is optimized by using Beads that should be agitated with a Vortex that allows horizontal agitation (Vortex Genie 2 or similar). It is important that this agitation is horizontal.
- Adapters with a vertical orientation may not agitate the sample adequately.
- Ball homogenizers such as FasPrep, Precellys and others can be used, but follow the manufacturer's instructions to optimize sample lysing. **IMPORTANT:** Many modern disruption devices can apply too high an energy input to Bead tubes. Depending on the type of tube and its contents (Beads, liquid volume, sample type, etc.), especially with high vibration frequencies or excessive shaking duration, the tubes may rupture **It is the user's responsibility to test the stability of the tubes under the conditions to be used.** An initial test should be performed by replacing the lysis buffer with water and adjusting the machine to operate under moderate conditions (low frequency, short time) in order to avoid spilling the lysis buffer in case of tube breakage.
- Various modifications can be applied in addition to the standard method to increase yield, concentration and at the user's convenience.
Convenient elution (standard elution): For convenience, elution can be carried out by the single addition of 100 µL of elution buffer to the column.
High yield: Two serial elutions of 100 µL each for a total elution volume of 200 µL.
High concentration: initially use 100 µL of eluate for a second elution - total eluate volume: 100 µL, 2 elutions.

3.3 Protocol for isolation of microbial DNA from vaginal samples

- Add 900 µl of **CTAB Extraction Solution** to a 2.0 ml microtube.

Cut off the *Swabs* head together with part of the handle and insert into the microtube so that the microtube can be tightly closed. Vortex vigorously to release the cells from the swab fibers.

- Add 25 µl of Proteinase K. Incubate at 70°C for 10 minutes.**
- Remove the *Swabs* fragment from the lysis solution, pressing with the walls to recover as much liquid as possible. **Transfer 900 µl of the lysate to a microtube with Beads.**
- Homogenize** for 10 minutes at maximum speed in a Vortex Genie 2 or similar using a **horizontal adapter**.
- Centrifuge at 14,000 rpm for 5 minutes.**
- Transfer 500 µL of the supernatant to a clean microcentrifuge tube.

7. Añadir **250 µl** de **Binding Solution** y agitar con vortex brevemente
8. Cargar la mezcla que contiene la muestra en una **Columns Spin DNA** previamente ensamblada con un **Collection Tube** y desechar el flujo obtenido. Inspeccionar la **Columns Spin DNA** para asegurar que toda la muestra ha pasado al **Collection Tube**. Si queda algo de muestra en la **Columns Spin DNA**, centrifugar a 14.000rpm por 1 minuto.
9. Ensamblar la **Columns Spin DNA** a un nuevo **Collection Tube** limpio y añadir **500 µl** de **Disinhibition Solution (GHCL 8M)**. Centrifuga a **14.000 rpm por 1 minute**. Desechar el flujo obtenido.
10. Añadir **700 µl** de **Washing Solution**. Centrifugar a **14.000 rpm por 1 minuto**.
11. **Secar la membrana de sílice**. Centrifugar a 14.000 rpm por 3 minutos.
12. Colocar la **Columns Spin DNA** en un tubo libre de nucleasas de 1,5 ml (no incluido) y añadir **100 µL** de **Hydration Solution** precalentado a 70°C. Incubar a temperatura ambiente por 2 minutos.
13. **Centrifugar** la **Columns Spin DNA** ensamblada con el tubo a **14.000 rpm por un 1 minute**. El DNA purificado se encuentra en el microtubo.

7. Add **250 µL** of **Binding Solution** and vortex briefly.
8. Load the sample-containing mixture onto a **previously assembled Columns Spin DNA** with a **Collection Tube** and discard the obtained flow-through. Inspect the **Columns Spin DNA** to ensure that all the sample has passed into the **Collection Tube**. If any sample remains in the **Columns Spin DNA**, centrifuge at 14,000rpm for 1 minute.
9. Assemble the **Columns Spin DNA** to a new clean **Collection Tube** and add **500 µl** of **Disinhibition Solution (GHCL 8M)**. Centrifuge at **14,000 rpm for 1 minute**. Discard the obtained flow.
10. Add **700 µl** of **Washing Solution**. Centrifuge at **14,000 rpm for 1 minute**.
11. **Dry the silica membrane**. Centrifuge at 14,000 rpm for 3 minutes.
12. Place the **Columns Spin DNA** in a 1.5 ml nuclease-free tube (not included) and add **100 µL** of **Hydration Solution** preheated to 70°C. Incubate at room temperature for 2 minutes.
13. **Centrifuge** the assembled **Columns Spin DNA** with the tube at **14,000 rpm for 1 minute**. The purified DNA is in the microtube.

4. ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD /

- Todos los componentes son estables durante 12 meses desde la fecha de la compra siendo almacenados como se indica.

STORAGE AND STABILITY

- 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