



DANAGENE MICROBIOME FECAL DNA KIT

Ref. 0620 50 extracciones

1. INTRODUCCIÓN

El DANAGENE MICROBIOME Fecal DNA kit ha sido desarrollado para una rápida y eficiente purificación de **ADN microbiano para el estudio del microbioma** a partir de diferentes muestras fecales:

- a) **Hasta 200 mg de heces humanas o de animales frescas o secas.**
- b) **Muestras de heces (0-5-1.0 gr) homogenizadas y estabilizadas en 8 ml DANASTOOL Sample Collection Kit.**

El procedimiento incluye una eficiente lisis de los microorganismos presentes en las muestras fecales por una combinación de calor y una rotura química-mecánica con específicas "beads" desarrolladas para ello. Los inhibidores son eliminados por precipitación mediante el uso de un tampón especialmente desarrollado para ello. La muestra luego es pasada por la MicroSpin Columna, el ADN se une a la membrana y es lavado y eluido finalmente.

Características:

- **Designado para una rápida y eficiente purificación de ADN microbiano a partir de diferentes muestras fecales.**
- **Optimizado método de lisis con una combinación de calor, lisis química y mecánica utilizando específicas "beads" para la homogenización de la muestra que permite el aislamiento del ADN de levaduras, hongos, bacterias Gram-negativas y Gram-positivas.**
- **Procedimiento simple y rápido utilizando MicroSpin columnas..**
- **Completa eliminación de contaminantes e inhibidores.**
- **No se utiliza fenol/ cloroformo para la extracción ni tampoco precipitación con etanol.**

Aplicaciones:

- **Análisis del Microbioma.**
- **PCR y qPCR.**
- **Análisis de RFLP.**
- **Análisis de mutaciones.**
- **Identificación de patógenos.**

2. COMPONENTES KIT

	50 extracciones	Almacenamiento
Tampón de Extracción CTAB	50 ml	Temperatura ambiente
Tampón EC	10 ml	Temperatura ambiente
Tampón de Unión	15 ml	Temperatura ambiente
Tampón de Desinhibición*	18 ml	Temperatura ambiente
Tampón de Lavado *	10 ml	Temperatura ambiente
Tampón de Elución	10 ml	Temperatura ambiente
Bead Microtubos	50 unidades	Temperatura ambiente
Proteinasa K*	30 mg	-20°C
MicroSpin columnas	50 unidades	Temperatura ambiente
Tubos de Recogida	100 unidades	Temperatura ambiente

(*) **Estas soluciones deben ser preparadas como se indica en la secciones de Preparaciones Preliminares del protocolo.**

2.1 Equipos y reactivos necesarios y no provistos

- Microcentrifuga.
- Microtubos de 1.5 ml y 2.0 ml.
- Etanol 100%.
- 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).

2.2 Almacenamiento y estabilidad

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

3. PROTOCOLO

3.1 Preparaciones Preliminares

- Disolver la proteinasa 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 el Etanol 100 % al Tampón de Desinhibición** indicado en la etiqueta, unos **10 ml**. Mantener el envase bien cerrado para evitar la evaporación del etanol.
- **Añadir el Etanol 100 % al Tampón de Lavado** indicado en la etiqueta, unos **40 ml**. Mantener el envase bien cerrado para evitar la evaporación del etanol.

3.2 Importantes recomendaciones generales

Tamaño muestra

Dependiendo del tamaño de la muestra de heces, mezclar la muestra completamente para generar una muestra homogénea antes de pesar y transferir una muestra (200 mg) al microtubo con las beads.

El kit está optimizado para el procesamiento de 200 mg de heces humanas, Para muestras de animales se recomienda la reducción de la cantidad de muestra (80-100 mg), esto puede llevar a obtener mejores resultados.

Las muestras muy secas (ratón, conejo, etc) pueden absorber el Tampón de Extracción CTAB, produciendo un cantidad insuficiente de muestra después del primer paso de centrifugación. En estos casos , se recomienda reducir el tamaño de la muestra (60-80 mg) y aumentar el volumen del Tampón de Extracción CTAB.

Cuando no se trabajó con muestras de heces estándar se recomienda evaluar la cantidad inicial de muestra necesaria, así como de Tampón de Extracción CTAB que se ha de utilizar para obtener 600 μl de lisado en el primer paso de centrifugación (paso 4 del protocolo).

Las muestras de heces humanas pueden contener material alimentario no digerido, estas partículas no deberían ser transferidos al microtubo con las beads.

Lisis de la muestra

El procedimiento está optimizado mediante el uso de "beads" en un **vortex con una agitación horizontal (Vortex Genie 2 o similar)**. Asegúrese que el adaptador del vortex permite la agitación horizontal; los adaptadores con una orientación de tubo vertical pueden no agitar adecuadamente.

Se puede utilizar homogenizadores "Bead mil" como FastPrep, Precellys y otros pero siguiendo las instrucciones del fabricante para optimizar la lisis de la muestra. **IMPORTANTE:** Este tipo de homogenizadores puede causar la rotura de los microtubos con las beads por lo que es responsabilidad del usuario realizar comprobaciones iniciales de estabilidad para asegurar la estabilidad de los beads microtubos durante la configuración inicial.

3.3 Protocolo de extracción de ADN a partir de 200 mg de heces frescas o secas

NOTA: En general, para resultados óptimos de PCR utilizar la mínima cantidad posible de ADN eluido, el volumen de eluido nunca deberá exceder del 10 % del volumen final de la mezcla de PCR. Se recomienda añadir BSA a una concentración final de 0.1 mg / ml de la mezcla de PCR y utilizar polimerasa HOT Star.

1. Pesar **50-200 mg de heces** en un **bead microtubo** de 2.0 ml y añadir **1.0 ml de Tampón de Extracción CTAB**.
2. Resuspender la muestra con simple agitación del microtubo o con micropipeta. No vortex. **Incubar a 70°C durante 10 minutos**.
3. Homogenizar la muestra durante 10 minutos a máxima velocidad en un **Vortex Genie 2 o similar** utilizando un **adaptador horizontal**.
4. **Centrifugar a 14.000 rpm durante 5 minutos**. Recoger sólo **600 µl de sobrenadante** que es el líquido transparente con color (evitar coger pellet y capa superficial si la hubiera) y colocar en un microtubo de 1.5 ml.
5. Añadir **200 µl Tampón EC (eliminación contaminantes)**. Vortex. Incubar a 4°C durante 5 minutos.
6. **Centrifugar a 14.000 rpm durante 5 minutos**. Recoger sólo **500 µl de sobrenadante** en un nuevo microtubo de 1.5 ml. Evitar coger la posible capa superficial y/o pellet que se puede formar.
7. **Añadir 25 µl Proteinasa K. Incubar a 70°C durante 10 minutos**.
8. Añadir **250 µl del Tampón de Unión** a los 500 µl de sobrenadante. Mezclar bien por vortex.
9. Añadir en el reservorio de la MicroSpin columna con su tubo de recogida. **Centrifugar a 10.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el tubo de recogida.
10. Colocar la MicroSpin columna en un nuevo tubo de recogida y añadir al reservorio **500 µl de Tampón de Desinhibición. Centrifugar a 12.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el líquido.
11. **Añadir 700 µl de Tampón de Lavado** en el reservorio de la MicroSpin columna. **Centrifugar a 14.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el líquido.
12. **Centrifugar a máxima velocidad durante 3 minutos para eliminar el etanol residual**.
13. Eliminar el tubo de recogida e insertar la MicroSpin columna en un microtubo de 1.5 ml **Añadir 100-200 µl de Tampón de elución** (precalentado a 70°C) en el reservorio de la spin microcolumna. Incubar 2 minutos.
14. **Centrifugar a máxima velocidad durante 60 segundos**. El microtubo contiene ahora el ADN.

3.4 Protocolo de extracción de ADN a partir de heces conservadas en el DANASTOOL Sample Collection Kit

TOMA DE MUESTRA:

1. Utilizando la cuchara unida a la tapa coja muestra de heces de 2-3 sitios diferentes y transfiera las muestras al líquido conservador. Aproximadamente media cuchara por toma es suficiente. El líquido permite estabilizar 0.5-1.0 gr de muestra.
2. Cerrar bien el envase y agitar para conseguir la homogenización de la materia fecal con el líquido conservador. Esto se conseguirá más rápidamente dependiendo de la consistencia de la materia fecal, para consistencias duras esto se puede conseguir ayudándose con la cuchara, o bien, ir agitando los tubos cada día hasta el día de la extracción.
3. Etiquete el tubo de heces con su nombre completo y fecha de recolección.
4. Envíe la muestra al laboratorio, enviándola a temperatura ambiente. La muestra es estable varios meses a temperatura ambiente (15-25°C) e indefinidamente a -20 o -80°C.
5. Para la extracción se pueden utilizar varios métodos diferentes, **se recomienda el uso de nuestro DANAGENE MICROBIOME FECAL DNA Kit.**

EXTRACCIÓN ADN MICROBIANO:

1. Transferir **1.0 ml de muestra estabilizadas de heces** a un **bead microtubo** de 2.0 ml que contiene partículas.

*Antes de transferir la muestra, asegurarse bien **que la muestra está homogenizada completamente**, para la transferencia se recomienda cortar una punta de 1000 µl para hacer la boca más ancha y coger 2 x 500 µl, mezclando bien la muestra con la micropipeta.*

2. Resuspender la muestra con simple agitación del microtubo o vortex breve. **Incubar a 70°C durante 10 minutos.**
3. Homogenizar la muestra durante 10 minutos a máxima velocidad en un **Vortex Genie 2 o similar** utilizando un **adaptador horizontal.**
4. **Centrifugar a 14.000 rpm durante 5 minutos.** Recoger sólo **600 µl de sobrenadante** que es el líquido transparente con color, evitar coger pellet y capa superficial de grasa que suele presentarse y colocar en un microtubo de 1.5 ml.
5. Añadir **200 µl Tampón EC (eliminación contaminantes).** Vortex. Incubar a 4°C durante 5 minutos.
6. **Centrifugar a 14.000 rpm durante 5 minutos.** Recoger sólo **500 µl de sobrenadante** en un nuevo microtubo de 1.5 ml. Evitar coger la posible capa superficial y/o pellet que se puede formar.
7. **Añadir 25 µl Proteinasa K. Incubar a 70°C durante 10 minutos.**
8. Añadir **250 µl del Tampón de Unión** a los 500 µl de sobrenadante. Mezclar bien.

9. Añadir en el reservorio de la MicroSpin columna con su tubo de recogida. **Centrifugar a 10.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el tubo de recogida.
10. Colocar la MicroSpin columna en un nuevo tubo de recogida y añadir al reservorio **500 µl de Tampón de Desinhibición. Centrifugar a 12.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el líquido.
11. **Añadir 700 µl de Tampón de Lavado** en el reservorio de la MicroSpin columna. **Centrifugar a 14.000 rpm durante 60 segundos.** Eliminar el líquido.
- 12. Centrifugar a máxima velocidad durante 3 minutos para eliminar el etanol residual.**
13. Eliminar el tubo de recogida y insertar la spin microcolumna en un microtubo de 1.5 ml . **Añadir 200 µl de Tampón de elución** (precalentado a 70°C) en el reservorio de la spin microcolumna. Incubar 2 minutos.
14. **Centrifugar a máxima velocidad durante 60 segundos.** El microtubo contiene ahora el ADN .

4. GUIA DE PROBLEMAS Y SOLUCIONES

Para cualquier duda o consulta adicional sobre el protocolo pónganse en contacto con el servicio técnico de DANAGEN-BIOTED S.L info@danagen.es