



REAL MICROBIOME FECAL DNA KIT

Kat.č. RBMEGS16 50 testů

1. ÚVOD

Real MICROBIOME Fecal DNA kit byl navržen pro rychlé a účinné čištění mikrobiální DNA z:

- a) až 200 mg čerstvých a zmrazených vzorků stolice lidské nebo zvířecí.**
- b) Homogenát stolice od 0,50 do 1,0 g stolice a stabilizovaný v 8 ml Real STOOL Sample Collection Kit**

Při tomto postupu jsou mikroorganismy účinně lyzovány kombinací tepla, chemického a mechanického narušení se specializovanými kuličkami. Inhibitory jsou eliminovány srážením pomocí propietárního čistícího pufru. Vzorek se pak aplikuje na mikrospínovou kolonku a DNA, která je vázána na kolonku, prochází před elucí jedním promýváním.

Vlastnosti:

- Navrženo pro rychlé a snadné čištění mikrobiální DNA z různých typů vzorků stolice.
- Metoda optimalizované lýzy - Kombinace tepelné, chemické a mechanické lýzy prostřednictvím homogenizace na bázi perliček umožňuje izolaci DNA z kvasinek, hub, gramnegativních a grampozitivních bakterií.
- Eliminuje inhibiční látky, včetně lipidů, polysacharidů a hemu.
- Není nutná extrakce fenol/chloroformem ani srážení ethanolem.

Aplikace:

- Analýza mikrobiomu
- PCR aplikace
- Analýza RFLP
- Typizace patogenů
- Analýza mutací

2. SLOŽKY SOUPRAVY

	50 stanovení	Skladování
CTAB extrakční pufr	50 ml	Pokožová teplota
EC pufr	10 ml	Pokožová teplota
Binding Buffer	15 ml	Pokožová teplota
Deinhibiční pufr*	18 ml	Pokožová teplota
Promývací pufr *	10 ml	Pokožová teplota
Eluční pufr	10 ml	Pokožová teplota
Perličky - mikrozkušavky	50 jednotek	-20°C
Proteináza K*	30 mg	Pokožová teplota
Mikrobiální DNA Kolony	50 jednotek	Pokožová teplota
Sběrné zkušavky	100 jednotek	Pokožová teplota

(*) Tyto roztoky musí být připraveny tak, jak je uvedeno v části „Předběžná příprava protokolu“.

POTŘEBNÉ VYBAVENÍ A DALŠÍ ČINIDLA

- Mikrocentrifuga.
- Mikrocentrifugační zkušavky, bez DNázy, 1,5 ml a 2,0 ml
- Ethanol 100%.
- Tepelný blok, suchá lázeň nebo vodní lázeň (70 °C).
- Pro homogenizaci perliček: hands-free adaptér pro vortex, s horizontální orientací zkušavek, doporučujeme Vortex Genie 2.
- (Volitelně) alternativa k homogenizaci perliček vortexem: Bead mill pro homogenizaci perliček.

3. PROTOKOL

3.1 Předběžné přípravy

- Rozpusťte proteinázu K v **1,3 ml vody bez nukleáz** a skladujte při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Doporučuje se připravit několik alikvotů abyste se vyhnuli více cyklům tání/zmrazení. Při této teplotě je stabilní po dobu 1 roku.
- Do deinhibičního pufru se **přidá 10 ml 100 % ethanolu** . Uchovávejte nádobu uzavřenou, aby se zabránilo odpařování ethanolu.
- Do promývacího pufru **se přidá 40 ml 100 % ethanolu**. Uchovávejte nádobu uzavřenou, aby se zabránilo odpařování ethanolu.
- Eluční pufr se předeheje na $70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2 Obecné poznámky

Velikost vzorku

V závislosti na velikosti vzorku stolice se vzorek zcela promíchá, aby se vytvořil homogenní vzorek před vážením a přenosem vzorku (200 mg) do mikrozkušavky s perličkami.

Souprava je optimalizována pro zpracování 200 mg lidských výkalů. Pro vzorky zvířat se doporučuje se snížit množství vzorku (80-100 mg), což může vést k lepším výsledkům.

Velmi suché vzorky (myš, králík atd.) mohou absorbovat CTAB extrakční pufr, tak, že po první centrifugaci se vytvoří nedostatečné množství vzorku. V těchto případy, se doporučuje zmenšit velikost vzorku (60-80 mg) a zvýšit objem CTAB extrakčního pufru.

Pokud nepracujete se standardními vzorky stolice, doporučuje se vyhodnotit počáteční množství potřebného vzorku, jakož i extrakční pufr CTAB, který má být použit tak, aby bylo možné získat 600 μl lyzátu v prvním kroku odstředování (krok 4 protokolu).

Vzorky lidské stolice mohou obsahovat nestrávený potravinový materiál, tyto částice by neměly být přenášeny do mikrozkušavky s kuličkami.

Lýza vzorku

Postup je optimalizován použitím "perliček" ve vortexu s horizontálním mícháním (Vortex Genie 2 nebo podobný). Ujistěte se, že adaptér vortexu umožňuje horizontální míchání.

Adaptéry s vertikální orientací zkumavek nemíchají správně.

Můžete použít homogenizátory "Bead mil", jako jsou FastPrep, Precellys a další, ale podle pokynů výrobce pro optimalizaci lýzy vzorku.

DŮLEŽITÉ: Mnoho moderních disruptčních zařízení může mít příliš velkou energii pro zkumavky s perličkami. V závislosti na typu zkumavky a obsahu částic (perličky, objem kapaliny, typ vzorku), zvláště vysoká frekvence třesení a / nebo dlouhá doba třepání může způsobit rozbití zkumavek s perličkami! **Je odpovědností uživatele provést počáteční test stability používaných zkumavek s perličkami za daných podmínek!** Proveďte počáteční test s vodou místo lyzačního pufru a mírným nastavením stroje (nízká frekvence, krátká doba), aby se zabránilo rozlítí lyzačního pufru v případě prasknutí zkumavky.



3.3 Protokol pro extrakci DNA z 200 mg čerstvé nebo suché stolice

POZNÁMKA: Doporučuje se začít s velkým množstvím vzorků stolice, pokud DNA není rozložena homogenně nebo je ve vzorku v malých množstvích. Vzorky menších rozměrů mohou být zpracovány celé, pokud je nutné maximálně eliminovat možné inhibitory PCR.

Obecně platí, že pro dobré výsledky PCR při použití minimálního možného množství DNA objem nikdy nepřesáhne 10% konečného objemu směsi PCR. Doporučuje se přidat BSA do výsledné koncentrace 0,1 g / l směsi PCR a použít polymerázu HOT Star.

1. **50-200 mg vzorku stolice** vložte do **2,0 ml mikrozkušavky s perličkami**. Přidejte **1,0 ml CTAB extrakčního pufru**.
2. Vzorek znovu promíchejte jednoduchým protřepáním mikrozkušavky nebo mikropipety. Nevortexujte. **Inkubuje se při 70 ° C po dobu 10 minut.**
3. **Homogenizujte** mixováním perliček po dobu 10 minut při maximální rychlosti na **Vortex Genie 2 nebo podobném** zařízení pomocí **horizontálního adaptéru**.
4. **Odstřed'ujte při 14 000 ot / min po dobu 5 minut.** Přeneste **až 600 µl supernatantu** do čisté mikrocentrifugační zkumavky.
DŮLEŽITÉ: Na horní straně pletel z perliček může být přítomna vrstva nečistot. Zabraňte přenosu těchto úlomků se supernatantem.
5. Přidejte **250 ml EC pufru**. Vortexujte. Inkubuje se 5 minut při 4 °C
6. **Odstřed'ujte při 14 000 ot./min po dobu 5 minut.** Objeví se peleta a na povrchu vrstva tuku. Zaveďte špičku pipety tak, aby pronikla povrchovou vrstvou tuku, a zachyťte **500 µl supernatantu**. To je průhledná zabarvená kapalina (zamezte zachycení pelety a povrchové vrstvy) a přeneste do mikrozkušavky 1,5 ml.
7. Přidejte se **25 µl proteinázy K**. Inkubujte **při 70 °C po dobu 10 minut.**
8. Přidejte **250 µl Binding Buffer** a krátce vortexujte.
9. Přidejte lyzát do zásobníku kombinované sestavy Mikrobial DNA kolonky a sběrné zkumavky. **Odstřed'ujte při 10 000 ot./min po dobu 60 sekund.** Odstraňte sběrnou zkumavku.
10. Umístěte Microbial DNA kolonku do čisté sběrné zkumavky, přidejte **500 µl desinhibičního pufru**. **Odstřed'ujte při 12 000 otáčkách za minutu po dobu 1 minuty.** Proteklou kapalinu zlikvidujte.
11. Přidejte **700 µl promývacího pufru**. **Odstřed'ujte při 14 000 ot./min po dobu 1 minuty.** Proteklou kapalinu zlikvidujte.
12. **Usušte silica- membránu**. **Odstřed'ujte při 14 000 ot./min po dobu 3 minut.**
13. Vložte Microbial DNA kolonku do zkumavky o objemu 1,5 ml bez nukleázy (není součástí soupravy) a přidejte **100–200 µl elučního pufru předehřátého na 70 °C**. Inkubujte **při pokojové teplotě po dobu 2 minut.**
14. **Odstřed'ujte** sestavu centrifugační kolonka-zkumavka při **14 000 otáčkách za minutu po dobu 1 minuty** a poté kolonku vyhod'te. **Vyčištěná DNA je ve zkumavce.**

3.4 Protokol pro extrakci DNA ze stolice vzorky STABILIZOVÁNY do Real STOOL Sample Collection Kit

ODBĚR VZORKŮ:

1. Pomocí lopatky připojené k víčku odeberte vzorek stolice ze 2-3 různých míst a přeneste vzorky do konzervační tekutiny. Přibližně půl lopatky na jeden odběr stačí. Kapalina umožňuje stabilizovat 0,5-1,0 g vzorku. **Doporučuje se** : V závislosti na velikosti a vlastnostech vzorku stolice je možné vzorek zcela promíchat, aby se vytvořil homogenní vzorek tímto způsobem. Pak není nutné odebírat vzorek ze 3 různých míst.
2. Nádobu dobře uzavřete a protřepejte, abyste dosáhli homogenizace fekální hmoty konzervační kapalinou. V závislosti na konzistenci fekální hmoty toho bude dosaženo rychleji pro tvrdé konzistence homogenizací pomocí lopatky nebo mícháním nádoby každý den až do dne extrakce.
3. Označte nádobku se vzorkem stolice celým jménem a datem odběru.
4. Zašlete vzorek do laboratoře a odešlete jej při pokojové teplotě. Vzorek je stabilní po dobu několika měsíců při pokojové teplotě (15–25 °C) a neomezeně dlouho při teplotě -20 °C –80 °C.
5. Pro extrakci lze použít několik různých metod, doporučuje se použití **naší sady Real MICROBIOME FECAL DNA Kit**.

EXTRAKCE MIKROBIÁLNÍ DNA:

1. Přeneste **1,0 ml stabilizovaného vzorku stolice do 2,0 ml mikrozkušavky s perličkami**
Před přenesením vzorku se ujistěte, že vzorek je zcela homogenní. Vzorek se znovu promíchá jednoduchým protřepáním mikrozkušavky nebo mikropipety. Pro přenesení se doporučuje ustříhnout 1000µl špičku, aby se vytvořilo širší ústí a přenést 2x500 µl při současném promíchávání mikropipetou.
Žádný vortex. Inkubuje se při 70 °C po dobu 10 minut.
2. Resuspendujte vzorek jednoduchým protřepáváním mikrozkušavky nebo mikropipetou. Nevortexujte. **Inkubujte při 70 °C po dobu 10 minut.**
3. **Homogenizujte** mixováním perliček po dobu 10 minut při maximální rychlosti na **Vortex Genie 2 nebo podobném** zařízení pomocí **horizontálního adaptéru** .
4. **Odstřed'ujte při 14 000 ot / min po dobu 5 minut.** Přeneste až **600 µl supernatantu** do čisté mikrocentrifugační zkumavky.
DŮLEŽITÉ: Na horní straně pelletu z perliček může být přítomna vrstva nečistot. Zabraňte přenosu těchto úlomků se supernatantem.
5. Přidejte **250 µl EC pufru**. Vortexujte. Inkubujte 5 minut při 4 °C
6. **Odstřed'ujte při 14 000 ot./min po dobu 5 minut.** Objeví se peleta a na povrchu vrstva tuku. Zaveďte špičku pipety tak, aby pronikla povrchovou vrstvou tuku a zachyťte **500 µl supernatantu**. To je průhledná zbarvená kapalina (zamezte zachycení pelety a povrchové vrstvy) a přeneste ji do mikrozkušavky 1,5 ml.
7. Přidejte **25 µl proteinázy K**. Inkubujte **při 70 °C po dobu 10 minut**.
8. Přidejte **250 µl Binding Buffer** a krátce vortexujte.
9. Přidejte lyzát do zásobníku kombinované sestavy Mikrobial DNA kolonky a sběrné zkumavky. **Odstřed'ujte při 10 000 ot./min po dobu 60 sekund**. Odstraňte sběrnou zkumavku.
10. Umístěte Microbial DNA kolonku do čisté sběrné zkumavky, přidejte **500 µl desinhibičního pufru**. **Odstřed'ujte při 12 000 otáčkách za minutu po dobu 1 minuty**. Proteklou kapalinu zlikvidujte.
11. Přidejte **700 µl promývacího pufru**. **Odstřed'ujte při 14 000 ot./min po dobu 1 minuty**. Proteklou kapalinu zlikvidujte.
12. **Usušte silica membránu. Odstřed'ujte při 14 000 ot./min po dobu 3 minut.**



13. Vložte Mikrobial DNA kolonku do zkumavky o objemu 1,5 ml bez nukleázy (není součástí soupravy) a přidejte **100–200 µl elučního pufru předehřátého na 70 °C**. Inkubujte **při pokojové teplotě po dobu 2 minut**.
14. **Odstřed'ujte** sestavu centrifugační kolonka-zkumavka při **14 000 otáčkách za minutu po dobu 1 minuty** a poté kolonku vyhod'te. **Vyčištěná DNA je ve zkumavce.**

4. PRŮVODCE PROBLÉMY A MOŽNÁ ODPOVĚĎ

V případě jakýchkoli pochybností nebo dodatečných otázek týkajících se protokolu se obraťte na technickou službu společnosti Durviz S.L. durviz@durviz.com.