

Набор для выделения растительной и бактериальной ДНК

Описание

Комплект реактивов для выделения ДНК СТАВ-методом. Предназначен для широкого спектра образцов, позволяет выделять ДНК из тканей растений, грибов, позвоночных животных, из бактериальных культур и из смесевых образцов сложного состава.

Принцип метода

Набор основан на СТАВ-методе (Tamari et al., 2013, Doyle et al., 1987) с дополнениями. СТАВ-метод представляет собой один из наиболее универсальных методов выделения ДНК, позволяя работать с огромным спектром различных образцов, включая ткани растений, животных, мицелий и плодовые тела грибов, бактериальные культуры, образцы сложного состава (тесто, мясные полуфабрикаты и т.п.).

Состав

1. Буфер для экстракции
2. Поливинилпирролидон
4. Раствор ПАВ (СТАВ)
5. Спирт изопропиловый
6. ТЕ-буфер 10x

Не поставляются с набором (по причине наличия ограничений по продаже):

1. Хлороформ
2. Спирт этиловый 80%

Условия хранения компонентов

Состав компонентов набора для выделения растительной и бактериальной ДНК.

Название компонента	Условия хранения	Расход компонента на одно выделение
Буфер для экстракции	При комнатной температуре	500 мкл
Раствор ПАВ	При комнатной температуре. При температурах ниже 20 °C может выпадать осадок, в этом	500 мкл

	случае перед использованием необходимо нагреть раствор до полного растворения	
Спирт изопропиловый	При комнатной температуре.	600 мкл
Поливинилполипирролидон	При комнатной температуре.	0,05г
TE-буфер 10x	При комнатной температуре. Перед использованием разводится до 1x TE-буфера (также хранится при комнатной температуре)	10-20 мкл (0,1 – 0,2 мл 1x-TE)

Протокол.

Выделение ДНК из фрагментов растений производится следующим образом:

1. Из подготовленного образца вырезают фрагмент объемом около 50мм³
2. Тщательно удаляют кору, побуревшие участки и ополаскивают дистиллированной водой. В качестве образцов растительной ткани желательно (при наличии возможности) использовать самые молодые листья, в этом случае этап 2 не нужен.
3. Добавляют 500мкл буфера для экстракции и 0,05 г сухого поливинилполипирролидона. Если гомогенизация будет производиться вручную, также добавляют 500мкл раствора ПАВ.
4. Производят гомогенизацию.
5. Если гомогенизация осуществлялась автоматизированным способом (гомогенизатором) или другим высокоинтенсивным способом, 500мкл раствора ПАВ добавляют сразу после завершения гомогенизации. Перерыв между этапами гомогенизации и добавлением ПАВ желательно сократить до возможного минимума
6. Помещают пробирки с образцами в термостат и инкубируют при 65°C в течение 45 минут – 1 часа.
7. Добавляют к содержимому пробирок равный объем хлороформа. В случае, если применялась гомогенизация в гомогенизаторе с помощью металлических шаров и/или абразивных частиц прямо в пробирках, необходимо перенести жидкость в новые пробирки
8. Содержимое пробирок инкубируют при комнатной температуре с перемешиванием на ротационном перемешивателе в течение 45 мин.

9. Производят центрифугирование (10000g 15мин), гомогенизирующие шарики (если они применялись) перед этим этапом должны быть удалены из пробирок.
10. Верхнюю водную фазу аккуратно, не допуская подмешивания интерфазы, переносят в новую пробирку.
11. Добавляют равный объем изопропилового спирта.
12. Содержимое пробирок инкубируют при +4°C в течение получаса.
13. Производят центрифугирование (10000g 15мин).
14. Супернатант тщательно сливают.
15. Осадок промывают 80% этиловым спиртом (400мкл на образец)
16. Производят кратковременное центрифугирование (10000g 5-10 сек). При этом капли изопропилового спирта сбрасываются со стенок в раствор этанола.
17. Этиловый спирт тщательно сливают.
18. Осадок сушат путем инкубирования пробирок с открытыми крышками в твердотельном термостате при +40°C
19. Высушенный осадок ресуспендируют в 100мкл 1xTE буфера.
20. Раствор ДНК замораживают на -20 °C для длительного хранения.

Методика наиболее эффективна при работе на молодых свежесобранных листьях. Возможны проблемы при работе на тканях растений с высоким содержанием кислых полисахаридов, полифенолов (для таких растений характерно побурение срезов листьев, стеблей, с образцами длительного хранения (например гербарным материалом, особенно неправильно собранным).

В случае работы с материалом, подверженным побурению (полифенолоксидазная реакция), рекомендуется до минимума сократить этап хранения материала (в идеальном случае – до работы прямо на свежем материале). По возможности желательно ингибировать полифенолоксидазную реакцию (например обработкой собранных фрагментов растений 1% аскорбиновой кислотой), так как именно в этот момент активно происходит необратимая порча ДНК в образце. Если реакция всё-таки была допущена, необходимо по возможности удалить побуревшие участки. Использование поливинилполипирролидона при работе с такими образцами обязательно. При проведении ПЦР желательно использовать добавку ПИР-1.

Частой проблемой является необходимость выделения ДНК из материала, загрязненного мицелием грибов (больные растения, неправильно засушенные гербарии и т.п.). В этом случае набор как правило позволяет выделить пригодную для ПЦР ДНК,

однако она непригодна для видоидентификации с помощью секвенирования последовательностей ITS, так как происходит амплификация аналогичных, но более коротких последовательностей грибов. В этом случае рекомендуется использовать другие, более специфичные маркеры, а при невозможности смены маркеров разделить растительные и грибные продукты ПЦР с помощью препаративного электрофореза.

Выделение ДНК из бактерий:

1. Бактериальную массу (размером со спичечную головку) снимают со среды микробиологической петлей и ресуспендируют в буфере для экстракции (500мкл)
2. Добавляют 500 мкл раствора ПАВ. Добавление поливинилпирролидона не требуется.
3. Замораживают суспензию на -20°C в течение получаса
4. Помещают пробирки с образцами в термостат и инкубируют при 65°C в течение 45 минут – 1 часа.
5. Добавляют к содержимому пробирок равный объем хлороформа. Содержимое пробирок инкубируют при комнатной температуре с перемешиванием на ротационном перемешивателе в течение 45 мин.
6. Производят центрифугирование (10000g 15мин)
7. Верхнюю водную фазу аккуратно, не допуская подмешивания интерфазы, переносят в новую пробирку.
8. Добавляют равный объем изопропилового спирта.
9. Содержимое пробирок инкубируют при $+4^{\circ}\text{C}$ в течение получаса.
10. Производят центрифугирование (10000g 15мин).
11. Супернатант тщательно сливают.
12. Осадок промывают 80% этиловым спиртом (400мкл на образец)
13. Производят кратковременное центрифугирование (10000g 5-10 сек). При этом капли изопропилового спирта сбрасываются со стенок в раствор этанола.
14. Этиловый спирт тщательно сливают.
15. Осадок сушат путем инкубирования пробирок с открытыми крышками в твердотельном термостате при $+40^{\circ}\text{C}$
16. Высушенный осадок ресуспендируют в 100мкл 1xTE буфера.
17. Раствор ДНК замораживают на -20°C для длительного хранения.

Выделение ДНК из тканей животных производится следующим образом:

1. Из подготовленного образца вырезают фрагмент объемом около 25мм^3

2. Добавляют 500мкл буфера для экстракции. Если гомогенизация будет производиться вручную, также добавляют 500мкл раствора ПАВ.
3. Производят гомогенизацию.
4. Если гомогенизация осуществлялась автоматизированным способом (гомогенизатором) или другим высокоинтенсивным способом, 500мкл раствора ПАВ добавляют сразу после завершения гомогенизации. Перерыв между этапами гомогенизации и добавлением ПАВ желательно сократить до возможного минимума
5. Помещают пробирки с образцами в термостат и инкубируют при 65°C в течение 45 минут – 1 часа.
6. Добавляют к содержимому пробирок равный объем хлороформа. В случае, если применялась гомогенизация в гомогенизаторе с помощью металлических шаров и/или абразивных частиц прямо в пробирках, необходимо перенести жидкость в новые пробирки
7. Содержимое пробирок инкубируют при комнатной температуре с перемешиванием на ротационном перемешивателе в течение 40 мин.
8. Производят центрифугирование (10000g 15 мин), гомогенизирующие шарики (если они применялись) перед этим этапом должны быть удалены из пробирок.
9. Верхнюю водную фазу аккуратно, не допуская подмешивания интерфазы, переносят в новую пробирку.
10. Добавляют к содержимому пробирок равный объем хлороформа
11. Содержимое пробирок инкубируют при комнатной температуре с перемешиванием на ротационном перемешивателе в течение 40 мин.
12. Производят центрифугирование (10000g 15мин)
13. Верхнюю водную фазу аккуратно, не допуская подмешивания интерфазы, переносят в новую пробирку.
14. Добавляют равный объем изопропилового спирта, перемешивают. При большом (видимым глазом) количестве выпадающей ДНК сразу переходят к этапу 16.
15. Содержимое пробирок инкубируют при +4°C в течение получаса.
16. Производят центрифугирование (10000g 15мин).
17. Супернатант тщательно сливают.
18. Осадок промывают 80% этиловым спиртом (400мкл на образец)
19. Производят кратковременное центрифугирование (10000g 5-10 сек). При этом капли изопропилового спирта сбрасываются со стенок в раствор этанола.
20. Этиловый спирт тщательно сливают.

21. Осадок сушат путем инкубирования пробирок с открытыми крышками в твердотельном термостате при +40°C

22. Высушенный осадок ресуспендируют в 100мкл 1хTE буфера.

23. Раствор ДНК замораживают на -20 °С для длительного хранения.

Проверялась возможность работы набора на крови животных, замороженной без консервации. В этом случае необходимо встряхнуть препарат крови, отобрать 25мкл и смешать с 500мкл буфера для экстракции, далее – по протоколу начиная с этапа 4, гомогенизация не нужна. При работе с таким материалом не допускается отделение клеток центрифугированием.

Библиография

Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. //Phytochem. Bull., Vol.19. P.11-15.

Tamari F., Hinkley C.S., Ramprashad N., 2013. A Comparison of DNA Extraction Methods using *Petunia hybrida* Tissues //J Biomol Tech., Vol.24. №3. P.113–118