

Набор для выделения и очистки почвенной ДНК.

Описание

Набор предназначен для выделения почвенной ДНК и её очистки. Набор позволяет эффективно выделить ДНК из препаратов почвы и удалить из препарата большую часть гуминовых кислот, Набор может быть применен самостоятельно для решения задач, связанных с выделением почвенной ДНК и изучение почвенных микробных сообществ, поиск фитопатогенов. В случае использования полученных препаратов ДНК для ПЦР рекомендуется использовать добавку ПИР-1 (вставить гиперссылку)

Принцип метода

В наборе реализован прямой метод выделения почвенной ДНК (без предварительного выделения клеток микроорганизмов). Последующая очистка ДНК от гуматов осуществляется с помощью модифицированного метода Moreira (Moreira et al., 1998) основанного на промывке диализным буфером образцов ДНК, иммобилизованных в легкоплавкой агарозе. Метод проверен на десятках образцов почвы разного типа и из различных регионов.

Состав

В состав набора для выделение ДНК из почвы входит:

1. Буфер для экстракции +4°C
2. Раствор ПАВ
3. Спирт изопропиловый
4. Буфер для ресуспендирования
5. Легкоплавкая агароза
6. ТЕ-буфер 10x

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

1. Хлороформ
2. Спирт этиловый 80%

Условия хранения компонентов

Название компонента	Условия хранения	Расход компонента на одно выделение
Буфер для экстракции	+4°C. Не допускается хранение на свету.	500 мкл
Раствор ПАВ	При комнатной температуре. При температурах ниже 20 °C может выпадать осадок, в этом случае перед использованием необходимо нагреть раствор до полного растворения	30 мкл
Спирт изопропиловый	При комнатной температуре.	600 мкл
Буфер для ресуспендирования	При комнатной температуре.	40 мкл
Агароза легкоплавкая	+4°C. Не допускается замерзание!	20 мкл
ТЕ-буфер 10x	При комнатной температуре. Перед использованием разводится до 1x ТЕ-буфера (также хранится при комнатной температуре)	200-300 мкл (4 – 5 мл 1x-ТЕ)

Протокол.

1. Навеску почвы массой 0,12-0,19г растирают с 500 мкл буфера для экстракции.
2. Производят гомогенизацию образца любым пригодным методом (растирка в ступке, шаровой мельницей и др.) Выбранный способ гомогенизации должен обеспечивать разрушение клеточных стенок микроорганизмов.
3. Сразу после гомогенизации добавляют к образцам 30 мкл раствора ПАВ и тщательно перемешивают
4. Помещают пробирки с образцами в термостат и инкубируют при 60°C в течение 45 минут – 1 часа.

5. 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
6. Содержимое пробирок инкубируют при комнатной температуре с перемешиванием на ротационном перемешивателе.
7. Производят центрифугирование (10000g 15мин), гомогенизирующие шарики (если они применялись) перед этим этапом должны быть удалены из пробирок.
8. Верхнюю водную фазу аккуратно, не допуская подмешивания интерфазы, переносят в новую пробирку.
9. Добавляют равный объем изопропилового спирта. Немедленно начинается преципитация, выпадает темноокрашенный осадок.
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°C. Рекомендуется не допускать пересушивания.
16. Осадок ресуспендируют в 40мкл ресуспендирующего буфера.
17. Производят центрифугирование (10000g 15мин), на этом этапе отделяются нерастворимые фракции осадка.
18. Супернатант объемом около 40мкл делят на две аликвоты. Первую аликвоту объемом 20 мкл замораживают на -20 °С для длительного хранения.
19. В сухотельном термостате при +70 °С растапливают легкоплавкую агарозу
20. Вторую аликвоту (20мкл) быстро смешивают с 20 мкл растопленной легкоплавкой агарозы и небольшими каплями раскапывают по стенкам пробирки объемом 2 мл.
21. После застывания капле пробирку заполняют 1х ТЕ-буфером (2 мл) и устанавливают на ротационный перемешиватель.
22. Через час заменяют отработанный 1х ТЕ-буфер на новый.
23. Пробирку снова устанавливают на ротационный перемешиватель.
24. Через час сливают отработанный ТЕ-буфер. Качество отмывки определяют по исчезновению бурого оттенка. В случае. Если процедура прошла недостаточно

эффективно (бурый оттенок капель заметен), процедура повторяется начиная с п 22. Практически для всех испытанных образцов двухчасовой отмывки с одной сменой буфера достаточно. Не допускается повторная отмывка после заморозки препарата.

25. Полученный препарат ДНК в агарозе используют путем внесения 1мкл препарата, подогретого до 70°C, в реакционную смесь. Раствор ДНК замораживают на -20 °C для длительного хранения.

Контроль успешности выделения

Качество полученных препаратов может быть проверено с помощью ПЦР с любыми достаточно универсальными праймерами к бактериальной 16S рДНК, с помощью ПЦР-РВ с такими же праймерами и красителем SYBR Green I (значение порогового цикла не должно быть больше 24). В случае использования полученных препаратов ДНК для ПЦР рекомендуется использовать добавку ПИР-1

Библиография

Moreira D. 1998. Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations. // Oxford University Press Nucleic Acids Research, Vol.26, №.13 P.3309–3310.