



EliGene[®] Soil DNA Isolation Kit

Návod k použití

Balení:

| | |
|------------|-----------------|
| Kat. číslo | Velikost balení |
| 412050 | 50 izolací |

Skladování:

Všechny reagentie a komponenty kitu by měly být skladovány při pokojové teplotě (15 – 30 °C). Při dodržení těchto skladovacích podmínek si kity plně udrží svou aktivitu, dokud neuběhne expirační doba uvedená na kitu.

Obsah

| | |
|----------------------------------|---|
| Úvod | 2 |
| Požadavky na vybavení | 2 |
| Obsah kitu | 2 |
| Preventivní opatření | 3 |
| Detailní izolační protokol | 3 |
| Stručný izolační protokol | 6 |
| Řešení problémů | 6 |



Úvod

EliGene® Soil DNA Isolation Kit je navržený pro rychlou izolaci genomické DNA ze vzorků prostředí. Využívá speciální technologie odstranění inhibitorů. Primárně je izolační kit určený pro vzorky prostředí s vysokým obsahem huminových kyselin, včetně různých typů půd, jakými jsou kompost, černá půda nebo hnůj a další typy běžných půd. Izolovaná DNA má vysokou čistotu, která je důležitá pro úspěšnou PCR amplifikaci DNA organismů ze vzorků půdy. Pomocí PCR a 16S metagenomických NGS studií byly z izolovaných vzorků úspěšně detekovány rozmanité druhy bakterií, plísni a řas.

Vzorky jsou homogenizovány ve zkumavce s rozbíječnými částicemi pomocí mechanických a chemických metod. Detergenty lyzují buňky a denaturují proteiny. V přítomnosti chaotropních solí je DNA vázána na spin filtr, promyta a eluována do TRIS-HCl pufru bez EDTA. DNA je pak připravena k použití v PCR, qPCR a sekvenování.

Požadavky na vybavení

Mikrocentrifuga (12 000 x g)

Vortex

Termostat/Termoshaker

Stojan na zkumavky

Pipety: 100 – 700 µl

Obsah kitu

| Komponenty | Množství (50 izolací) |
|------------------------------------|-----------------------|
| Homogenization Bead Tubes | 50 ks |
| Lysis Buffer S1 | 3,5 ml |
| Inhibitor Removal Buffer S2 | 14 ml |
| Inhibitor Removal Buffer S3 | 17 ml |
| Binding Buffer S4 | 23 ml |
| Binding Buffer S5 | 31 ml |
| Wash Buffer S6 | 27 ml |
| Elution Buffer S7 | 6 ml |
| Spin filtry (vložený v 2 ml Tubes) | 50 ks |
| 2 ml Tubes | 150 ks |
| 2 ml Collection Tubes | 100 ks |



Preventivní opatření

Při používání produktu prosím používejte ochranné rukavice a vyhněte se kontaktu reagensů s kůží. V případě kontaktu reagensů s kůží omyjte zasažené místo proudem tekoucí vody. Zabraňte požití. V případě kontaktu nebo náhodného požití nahlédněte do MSDS listů.

Reagencie označené jako hořlavé uchovávejte v bezpečné vzdálenosti od otevřeného ohně a jisker.

UPOZORNĚNÍ: Binding Buffer S5 a Wash Buffer S6 jsou hořlavé.

Detailní izolační protokol

Důrazně doporučujeme prostudovat si následující informace před prvním použitím EliGene® Soil DNA Isolation Kitu.

Důležitá upozornění před použitím

Prosíme, noste rukavice po celý čas práce s kitem.

Pokud je v Lysis Bufferu S1 precipitát, zahřejte láhev s pufrem na 60 °C a rozpustěte ho. Pro efektivní eluci DNA ze spin filtru do Elution Buffer S7 je klíčové odstranění zbytkového etanolu ze spin filtru.

1. Do homogenizační Bead Tube (součástí balení) vložte 0,2 g půdního vzorku a zvortexujte. U vzorků s velmi vysokým obsahem huminových kyselin použijte pouze 0,1 g.
Poznámka: Homogenizační Bead Tube obsahuje roztok zabraňující degradaci nukleových kyselin a rozpouští huminové kyseliny.
2. Přidejte 60 µl Lysis Buffer S1 a krátce zvortexujte. Inkubujte 10 min při 70 °C s občasným mícháním.
Poznámka: Lysis Buffer S1 je lyzační činidlo obsahující SDS a další složky potřebné pro kompletní lýzu buňky. Při nízké teplotě tvoří SDS bílý precipitát v lahvi. Zahřátím na 60 °C se SDS rozpustí. Lysis Buffer S1 může být použitý, i když je zahřátý.
3. Pomocí pásky upevněte homogenizační Bead Tube na vortexovací podložku v horizontální poloze a vortexujte 10 minut při maximální rychlosti.
4. Centrifugujte homogenizační Bead Tube 30 vteřin při 10 000 x g a pokojové teplotě.
UPOZORNĚNÍ: Nepřekračujte 10 000 x g, zkumavky by se mohly rozbít.
5. Přeneste supernatant do čisté 2 ml zkumavky (součástí balení), přidejte 250 µl Inhibitor Removal Buffer S2 a vortexujte 5 vteřin. 5 minut inkubujte na ledu.
Poznámka: Inhibitor Removal Buffer S2 obsahuje činidlo na vysrážení organických a anorganických složek jakými jsou huminové kyseliny a proteiny.



6. Centrifugujte zkumavku 1 minutu při 10 000 x g a pokojové teplotě.
7. Přeneste až 600 µl supernatantu do čisté 2 ml zkumavky (součástí balení). Pracujte opatrně, aby nedošlo k narušení peletu.
Poznámka: Pelet obsahuje organické a anorganické složky jako například huminové kyseliny a proteiny. Pro docílení co nejlepších izolačních výsledků se vyhněte porušení peletu.
8. Přidejte 300 µl Inhibitor Removal Buffer S3 a vortexujte 5 vteřin. Poté 5 minut inkubujte na ledu.
Poznámka: Inhibitor Removal Buffer S3 vysráží zbytkové organické a anorganické složky, jako jsou huminové látky nebo proteiny.
9. Centrifugujte zkumavku 1 minutu při 10 000 x g a pokojové teplotě.
10. Přeneste až 700 µl supernatantu do čisté 2 ml Collection Tube (součástí balení). Pracujte opatrně, aby nedošlo k narušení peletu.
Poznámka: Pelet obsahuje organické a anorganické složky jako například huminové kyseliny a proteiny. Pro docílení co nejlepších izolačních výsledků se vyhněte porušení peletu.
11. Přidejte 450 µl Binding Buffer S4 a vortexujte 5 vteřin. Krátce stočte, abyste odstranili roztok z víčka zkumavky.
Poznámka: Binding Buffer S4 obsahuje chaotropní soli, které poskytují optimální podmínky pro vazbu DNA, avšak ne pro organické a anorganické složky.
12. Přidejte 600 µl Binding Buffer S5 a vortexujte 5 vteřin. Krátce stočte, abyste odstranili roztok z víčka zkumavky.
Poznámka: Binding Buffer S5 obsahuje chaotropní soli, které poskytují optimální podmínky pro vazbu DNA, avšak ne pro organické non-DNA a anorganické složky.
13. Přemístěte 700 µl supernatantu do spin filtru a při pokojové teplotě 1 minutu centrifugujte při 10 000 x g. Odstraňte odstředěný roztok a přidejte 700 µl supernatantu do spin filtru. Znovu 1 minutu centrifugujte při 10 000 x g a pokojové teplotě. Odstraňte odstředěný roztok a přidejte zbylý supernatant (do 700 µl) do spin filtru. Znovu 1 minutu centrifugujte při 10 000 x g a pokojové teplotě.
Poznámka: DNA se naváže díky chaotropním solím k silika membráně spin filtru. Tekutá složka procházející skrz membránu obsahuje nenavázaný buněčný materiál jako denaturované proteiny a RNA.
14. Přemístěte spin filtr do nové 2 ml Collection Tube (součástí balení).
15. Přidejte 500 µl Wash Buffer S6 do spin filtru. Centrifugujte 1 minutu při 10 000 x g.



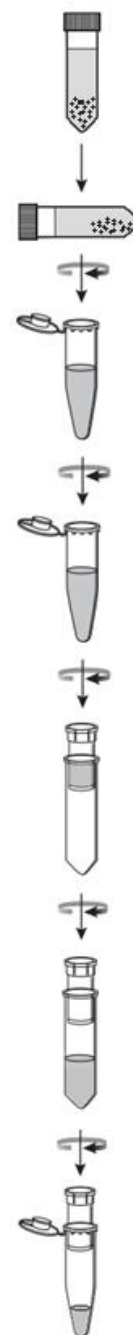
Poznámka: Wash Buffer S6 je promývací roztok, který pročistí DNA navázanou na spin filtru od nečistot.

16. Vyjměte spin filtr a odstraňte roztok z 2 ml Collection Tube. Poté umístěte spin filtr zpátky do stejné 2 ml Collection Tube.
17. Pro vysušení membrány spin filtru znovu centrifugujte 1 minutu při 12 000 x g.
Poznámka: Membrána spin filtru je zcela vysušena od zbytků ethanolu, čímž se zvýší výtěžnost DNA v elučním kroku.
18. Opatrně vyjměte spin filtr a přemístěte ho do nové 2 ml Collection Tube (součástí balení).
19. Přidejte 100 µl Elution Buffer S7.
Poznámka: Pro zvýšení výtěžnosti inkubujte 5 minut při 65 °C.
20. Centrifugujte 1 minutu při 10 000 x g.
21. Vyjměte spin filtr. Genomová DNA ve zkumavce je nyní připravena k použití pro další aplikace.
Poznámka: Elution Buffer S7 je 10 mM TRIS-HCl (pH=8.0). Uvolňuje DNA z filtru a ta přechází do 2 ml Collection Tube. DNA je uvolněna díky nepřítomnosti solí a ethanolu.



Stručný izolační protokol

1. Do homogenizační Bead Tube (součástí balení) vložte 0,2 g vzorku půdy a vortexujte.
2. Přidejte 60 µl Lysis Buffer S1 a vortexováním lehce promíchejte. Inkubujte 10 min při 70 °C s občasným mícháním.
3. Pomocí pásky upevněte homogenizační Bead Tubes na vortexovací podložku v horizontální poloze a vortexujte 10 minut při maximální rychlosti. Centrifugujte 30 sekund při 10 000 x g.
4. Přemístěte supernatant do čisté 2 ml zkumavky, přidejte 250 µl Inhibitor Removal Buffer S2 a vortexujte 5 vteřin. Poté 5 minut inkubujte na ledě.
5. Centrifugujte zkumavku 1 minutu při 10 000 x g a pokojové teplotě.
6. Přemístěte až do 600 µl supernatantu do čisté 2 ml zkumavky, přidejte 300 µl Inhibitor Removal Buffer S3 a vortexujte 5 vteřin. Poté 5 minut inkubujte na ledě.
7. Centrifugujte zkumavku 1 minutu při 10 000 x g a pokojové teplotě.
8. Přemístěte až do 700 µl supernatantu do čisté 2 ml zkumavky, přidejte 450 µl Binding Buffer S4 a vortexujte 5 vteřin. Krátce stočte, abyste odstranili roztok z víčka zkumavky.
9. Přidejte 600 µl Binding Buffer S5 a vortexujte 5 vteřin. Krátce stočte, abyste odstranili roztok z víčka zkumavky.
10. Přemístěte 700 µl supernatantu do spin filtru a 1 minutu centrifugujte při 10 000 x g a pokojové teplotě. Odstraňte odstředěný roztok a přidejte zbylý supernatant (po 700 µl) do spin filtru. Znovu 1 minutu centrifugujte při 10 000 x g a pokojové teplotě.
11. Přemístěte spin filtr do nové 2 ml Collection Tube a přidejte 500 µl Wash Buffer S6. Centrifugujte 1 minutu při 10 000 x g.
12. Vyjměte spin filtr a odstraňte roztok. Poté umístěte spin filtr zpátky do stejné 2 ml Collection Tube a 1 minutu centrifugujte při 12 000 x g.
13. Opatrně vyjměte spin filtr a přemístěte ho do nové 2 ml Collection Tube. Přidejte 100 µl Elution Buffer S7 a 1 minutu centrifugujte při 10 000 x g.
14. Vyjměte spin filtr. Genomová DNA je připravena k použití pro další aplikace.



Řešení problémů

Suchý vzorek půdy

V případě půdních vzorků s velmi nízkým obsahem vody se začne izolace jenom s 0,1 g vzorku půdy.



Vlhký vzorek půdy

V případě, že má vzorek půdy vysoký obsah vody, přemístěte obsah homogenizačního Bead Tube do 1,5 ml zkumavky. Zároveň přidejte vzorek půdy a 1 minutu centrifugujte při 10 000 x g. Odsajte všechnu kapalinu, kterou je možno, a přemístěte zbylý obsah zpět do homogenizačního Bead Tube. Dále pokračujte podle návodu od 2. kroku.

Problémy s amplifikací DNA

- Zkontrolujte množství a čistotu DNA gelovou elektroforézou nebo spektrofotometrem. Příliš vysoké množství DNA může inhibovat PCR reakci.
- Rozřeďte templátovou DNA.

Eluovaný vzorek DNA je hnědě zbarvený nebo dochází k ucpávání silikonového spin filtru

- Pokud dodržíte doporučení uvedená v tomto manuálu, žádné zbarvení DNA by se nemělo objevovat.
- Nepoužívejte více než 0,2 g půdy.

Nízká výtěžnost DNA

Výtěžnost DNA může být nižší, pokud má vzorek půdy vysoký obsah vody, byl skladován dlouhou dobu nebo opakovaně zmrazován a rozmrazován. Pokud máte problémy s nízkou výtěžností, zkontrolujte následující body:

- Ujistěte se, že jste dobře smíchaly vzorek po přidání Lysis Buffer S1.
- Teplota pro lýzi by měla být nastavena správně.
- Nepřeskakujte krok odstranění zbytkového etanolu ze spin filtru. Je to klíčový krok pro efektivní eluci DNA ze spin filtru do Elution Buffer S7.

DNA má nízký poměr A260/280

Poměr A260/280 pro čistou DNA by se měl pohybovat v rozmezí 1,7 – 1,9. Poměr nižší než 1,6 může poukazovat na znečištění DNA proteiny. Máte-li problémy s nízkým poměrem A260/280 zkontrolujte následující:

- Přesvědčte se, že jste použili Wash Buffer S6.
- Používáte-li Nanodrop, používejte jako blank Elution Buffer S7.

DNA vyplavala z jamek při nanášení na gel

- Ve vzorku zůstaly zbytky Wash Buffer S6. Nepřeskakujte krok odstranění zbytkového etanolu ze spin filtru. Zároveň můžete prodloužit dobu vysoušení centrifugací na 2 minuty.



Koncentrování DNA

Finální množství eluované DNA je 100 µl. DNA může být koncentrována přidáním 10 µl 3M acetátu sodného (pH = 5,2) a převrácením zkumavky 3 – 5krát k promíchání. Poté přidejte 200 µl studeného 100% etanolu, opět převrácením zkumavky 3 – 5krát promíchejte a centrifugujte 15 minut při 12 000 x g a pokojové teplotě. Odstraňte supernatant a promyjte DNA pelet 70% etanolem. Zbýlý etanol nechejte odpařit pomocí exsikátoru a resuspendujte DNA na požadovaný objem pomocí PCR vody nebo pufru.

Výrobce:

ELISABETH PHARMACON, spol. s r. o.

Rokycanova 4437/5, Brno-Židenice 615 00

info@elisabeth.cz | www.elisabeth.cz | tel.: +420 542 213 851



Katalogové číslo



Číslo šarže



Datum expirace



Skladovací podmínky (teplotní limity)



Výrobce



Počet reakcí v balení