



EliGene® Soil DNA Isolation Kit

Návod k použití

Balení:

Kat. číslo	Velikost balení
412050	50 izolací

Skladování:

Všechny reagenty 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.



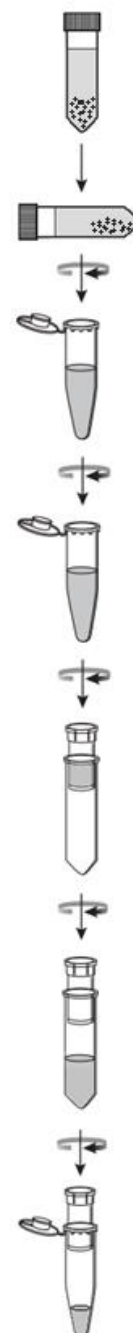
Poznámka: Wash Buffer S6 je promývací roztok, který pročistí DNA navázanou na spin filtru od nečistot.

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 etanolu.



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 dodržujete 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 nechte 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