

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – analýza půd	Vydání	1
	31112.1 - Extrakce DNA z lesních půd kitem Powersoil® DNA Isolation kit	Revize	0

EXTRAKCE DNA Z LESNÍCH PŮD KITEM POWERSOIL® DNA ISOLATION KIT

1 Rozsah a účel

Postup izolace DNA tímto kitem je vhodný především pro extrakci DNA z půdy. Obecně je kit určen pro vzorky, které obsahují velké množství huminových kyselin (lesní půdy, organické půdy, kompost, sedimenty, mrva). Izolovaná DNA má vysokou čistotu, což je důležité pro úspěšnou PCR amplifikaci DNA mikroorganismů ze vzorku. PCR analýza tímto kitem umožňuje detekci mnoha organismů, včetně bakterií, hub, řas a aktinomycet.

2 Princip

Vzorky půd se přidají do zkumavky s rozbíjecími kuličkami a proběhne rychlá a dokonalá homogenizace intenzivním třepáním. Lyzace buněk probíhá mechanickými a chemickými metodami. Celková genomická DNA se zachytí na křemičité membráně v kolonce. DNA se promývá a eluuje z membrány. Poté je DNA připravena pro PCR analýzu a další aplikace.

3 Chemikálie

1 Voda ve vysoké čistotě pro molekulární biologii, H₂O, rezistivita 18,2 MΩ/cm.

2 Hydroxid sodný, NaOH, roztok, c(NaOH) = 10 mol/l.

Příprava: 400 g NaOH se rozpustí ve vodě (1) a po vytemperování se upraví na celkový objem 1000 ml.

3 Kyselina chlorovodíková, HCl, c(HCl) = 4 mol/l.

Příprava: Smíchá se 333 ml koncentrované HCl (c = 37%) a 664 ml vody (1).

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – analýza půd	Vydání	1
	31112.1 - Extrakce DNA z lesních půd kitem Powersoil® DNA Isolation kit	Revize	0

- 4 Tris(hydroxymethyl)aminomethan, $C_4H_{11}NO_3$.

Příprava roztoku Tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochloridu (Tris-HCl),
 $c(\text{Tris-HCl}) = 1 \text{ mol/l}$, $\text{pH} = 8,0$.

121,14 g Tris(hydroxymethyl)aminomethanu se rozpustí v 800 ml vody (1), pomocí
HCl (3) se upraví pH na hodnotu 8,0 a doplní se vodou (1) na celkový objem 1000 ml.

- 5 Disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA), $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$,
roztok, $c(\text{EDTA}) = 0,5 \text{ mol/l}$, $\text{pH} = 8,0$.

Příprava: Ke 186,10 g EDTA se přidá 800 ml vody (1), roztokem NaOH (2) se upraví
 pH na hodnotu 8,0 a doplní se vodou (1) na celkový objem 1000 ml (EDTA
se rozpouští až po přidavku roztoku NaOH).

- 6 TE pufr, $\text{pH} 8,0$.

Příprava: Smíchá se 10 ml roztoku Tris-HCl (4) a 2 ml roztoku EDTA (5) a doplní
se vodou (1) na celkový objem 1000 ml.

Další chemikálie jsou součástí kitu Powersoil® DNA Isolation kit (Mo Bio Laboratories, Inc.):

- 7 PowerSoil, roztok C1.

- 8 PowerSoil, roztok C2.

- 9 PowerSoil, roztok C3.

- 10 PowerSoil, roztok C4.

- 11 PowerSoil, roztok C5.

- 12 PowerSoil, roztok C6.

Poznámky

- 1 Voda, roztoky EDTA, Tris-HCl a TE se sterilizují 20 min při 120°C a skladují
při laboratorní teplotě.

- 2 Kit lze skladovat při teplotě $(15 - 30)^\circ\text{C}$.

- 3 V chladu vznikají v PowerSoil roztoku C1 sraženiny. Zahřátím roztoku na 60°C
se sraženiny rozpustí, roztok C1 může být použit i horký.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – analýza půd	Vydání	1
	31112.1 - Extrakce DNA z lesních půd kitem Powersoil® DNA Isolation kit	Revize	0

4 *PowerSoil roztok C5 obsahuje ethanol, je hořlavý.*

4 **Přístroje a pomůcky**

- 1 Homogenizátor typu „mini bead-beater“ s oscilační frekvencí 3000 kmitů/min.
- 2 Vortex.
- 3 Stolní centrifuga s rotorem pro 2,0ml mikrozkušavky typu Eppendorf s nastavitelnou hodnotou g do 10000 g.
- 4 Vhodná nádoba se šupinkovým ledem.
- 5 Sada automatických pipet pokrývající rozsah (20 – 1000) µl.
- 6 Špičky s filtrem pro rozsah (100 – 1000) µl a bez filtru pro rozsahy (20 – 200) µl a (100 – 1000) µl.
- 7 Stojánek pro inkubaci vzorků v 2,0ml mikrozkušavkách na vodní lázni umožňující přímý kontakt mikrozkušavky a vody.

Další pomůcky jsou součástí kitu Powersoil® DNA Isolation kit (Mo Bio Laboratories, Inc.):

- 8 Rozbíjecí zkumavky PowerBead Tubes (obsahují 750 µl roztoku).
- 9 PowerSoil 2,0ml mikrozkušavky.
- 10 PowerSoil kolonky ve 2,0ml mikrozkušavkách.

5 **Postup**

Do rozbíjecích zkumavek PowerBead Tubes (součást kitu) se přidá 0,25 g přirozeně vlhké půdy a zkumavky se promíchají opatrným vortexováním. Do rozbíjecích zkumavek se přidá 60 µl roztoku C1 (7), zkumavky se opět zvortexují a nechají se 45 s třepat v homogenizátoru typu bead-beater při frekvenci 3000 kmitů/min. Poté se rozbíjecí zkumavky centrifugují 30 s při 10000 g při laboratorní teplotě.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – analýza půd	Vydání	1
	31112.1 - Extrakce DNA z lesních půd kitem Powersoil® DNA Isolation kit	Revize	0

Supernatant se přenese do čisté 2,0ml mikrozkušavky (součást kitu), k supernatantu se přidá 250 µl roztoku C2 (8), vzorky se 5 s vortexují a 5 min inkubují při 4 °C (je nutné použít vodní lázeň s ledem, nikoliv lednici). Zkušavky se centrifugují 60 s při 10000 g při laboratorní teplotě.

Do čisté 2,0ml mikrozkušavky (součást kitu) se přenese maximálně 600 µl supernatantu, k němu se přidá 200 µl roztoku C3 (9), vzorky se krátce vortexují a 5 min inkubují při 4 °C (je nutné použít vodní lázeň s ledem, nikoliv lednici). Zkušavky se centrifugují 60 s při 10000 g při laboratorní teplotě.

Do čisté 2,0ml mikrozkušavky (součást kitu) se přenese maximálně 750 µl supernatantu, k němu se přidá 1200 µl roztoku C4 (10) a vzorky se 5 s vortexují. Poté se přenese přibližně 675 µl takto vzniklé směsi do kolonky umístěné ve 2,0ml mikrozkušavce (součást kitu) a centrifuguje se 1 min při 10000 g při laboratorní teplotě. Přefiltrovaná kapalina se vylije, přidá se dalších 675 µl směsi a centrifugace se opakuje. Přefiltrovaná kapalina se opět vylije, do kolonky se přidá zbytek směsi, kolonky se stejným způsobem centrifugují a zbytek přefiltrované kapaliny se vylije (každý vzorek je tedy nutné rozdělit na tři dávky).

Do kolonek se přidá 500 µl roztoku C5 (11) a ty se centrifugují 30 s při 10000 g při laboratorní teplotě. Přefiltrovaná kapalina se vylije a kolonky se centrifugují 60 s při 10000 g při laboratorní teplotě, aby se odstranily reziduální zbytky roztoku C5.

Kolonky se opatrně přenesou do čistých 2,0ml mikrozkušavek (součást kitu), je nutné zabránit potřísnění kolonek roztokem C5. Doprostřed bílé membrány uvnitř kolonky se nanese 100 µl TE pufru (6) nebo roztoku C6 (12). Kolonky se centrifugují 30 s při 10000 g při pokojové teplotě. Kolonky se z 2,0ml mikrozkušavek odstraní a DNA v mikrozkušavkách je připravena pro různé aplikace. Další purifikace extraktu DNA již není nutná. DNA se uchová při –20 °C až do příštího použití.

6 Literatura

- 1 Powersoil® DNA Isolation Kit, Instruction Manual. Mo Bio Laboratories, Inc., USA, 1-20.