**PROTOKOL ZA IZOLACIJO DNA IZ ZEMLJE S PowerLyzer® PowerSoil® DNA Isolation Kit (MO BIO)**

*Prilagojen glede na protokol proizvajalca (L. Gregur, D. Kutnjak., Š. Baebler; NIB, april 2015)*

1. **Dodaj vzorec zemlje** (0.05-0.25 g) v epice s kita in jih primerno označi (na vrhu in ob strani)
   * pri zelo suhih vzorcih naj ne bo več kot 0.2 g

Vklopi termoblok

1. Dodaj **750 µL BEAD SOLUTION**
2. Malo **zvroteksiraj** in rahlo spin-down **centrifugiraj**
   * če je raztopina C1 precepitirala, jo daj segrevati na 60°C, dokler se precipitat ne raztopi)
3. Dodaj **60µL raztopine C1**
4. Na kratko **zvorteksiraj** ali nekajkrat obrni epico
   * *Če je vzorec suh in se tekočina vpije, po potrebi dodajaj Bead solution in C1 v razmerju (100:8)- lahko tudi v kasnejših korakih*
5. **homogeniziraj** s FastPrep:
   * 45 sek, adapter MP (24x), 6.5 m/s; !!! pravilno pritrdi stojalo v FastPrepu !!!
6. **inkubacija na 70°C za 10 min, stresanje 2000 rpm** *(koraka dodana glede na orig. protokol)*
7. **ponovna homogenizacija** s FastPrep:
   * 45 sek, adapter MP (24x), 6.5 m/s; !!! pravilno pritrdi stojalo v FastPrepu !!!
8. **centrifugiraj**: 10 000x g, 2x1 min + vmes »s prsti potapkaj«, da odstraniš čim več pene, sobna temp.

Nastavi si nove 2 mL »collection tubes« iz kita in si jih primerno označi

1. prenesi 400-500 µL supernatanta v novo označeno epico – supernatant v hladilnik, da dokončaš klasičnega 17-20, potem nadaljuj po kitu.
   * raje prenesi manj, sam da ne potegneš nič peleta!!
   * Če je premalo supernatanta, ponovi še enkrat centrifugiranje (10 000x g, 1 min, sobna temp).

!!! EPICE S PESKOM SHRANI za morebitne nove izolacije

1. supernatantu dodaj **250µL raztopine C2**
2. **zvorteksiraj** za 5 sek
3. **inkubiraj** v hladni sobi (4°C) za 5 min (papirnato brisačo daj pod stojalo!)
4. **centrifugiraj**: 10 000x g, 1 min, sobna temp.

Nastavi si nove 2 mL »collection tubes« iz kita in si jih primerno označi

1. prenesi 600 µL supernatanta v novo označeno epico
   * raje prenesi manj, sam da ne potegneš nič peleta!!
2. dodaj **200µL raztopine C3**
3. na kratko **zvorteksiraj**
4. **inkubiraj** v hladni sobi (4°C) za 5 min (papirnato brisačo daj pod stojalo!)
5. **centrifugiraj**: 10 000x g, 1 min, sobna temp.

Nastavi si nove 2 mL »collection tubes« iz kita in si jih primerno označi

1. prenesi **625µL** supernatanta v novo označeno epico (*manj kot v orig. protokolu - lažja manipulacija v naslednjih korakih)*
   * raje prenesi manj, sam da ne potegneš nič peleta!!

Pred uporabo premešaj raztopino C4

1. dodaj **1000µL raztopine C4 supernatantu** (pazi, da ne prekoračiš zgornje črte na epici!!)
   * PREVERI BARVE 🡪 če je raztopina zelo temna, se lahko ponavlja wash (C5)
2. **vorteksiraj** za 5 sek in kratko »spin down« centrifugiraj

Nastavi si SPIN FILTRE

1. prenesi **600µL** na SPIN FILTER
2. **centrifugiraj**: 10 000x g, 1 min, sobna temp.

Nastavi si nove 2 mL navadne epice in si jih primerno označi; PUSTI JIH ODPRTE!

1. po centrifugiranju zavrži spodnje dno s tekočino; **zgornji del pa prenesi** na nove prej pripravljene in označene 2 mL navadne epice.
2. ponovno prenesi **600µL** na SPIN FILTER
3. **centrifugiraj**: 10 000x g, 1 min, sobna temp.

Nastavi si nove 2 mL navadne epice in si jih primerno označi; PUSTI JIH ODPRTE!

1. po centrifugiranju zavrži spodnje dno s tekočino; **zgornji del pa prenesi** na nove prej pripravljene in označene 2 mL navadne epice.
2. prenesi še **preostanek** supernatanta na SPIN FILTER
3. **centrifugiraj**: 10 000x g, 1 min, sobna temp.

Nastavi si nove 2 mL navadne epice in si jih primerno označi; PUSTI JIH ODPRTE!

1. po centrifugiranju zavrži spodnje dno s tekočino; **zgornji del pa prenesi** na nove prej pripravljene in označene 2 mL navadne epice.
2. dodaj **500µL raztopine C5**
3. centrifugiraj: 10 000x g, 30 sek
   * Ponovi spiranje (korak 32, 33) z vzorci, ki so bili zelo obarvani (korak 21). Pri spiranju pride do cca 20% izgube DNA

Nastavi si nove 2 mL navadne epice in si jih primerno označi; PUSTI JIH ODPRTE!

1. po centrifugiranju zavrži spodnje dno s tekočino; **zgornji del pa prenesi** na nove prej pripravljene in označene 2 mL navadne epice.
2. centrifugiraj: 10 000x g, 1 min

Nastavi si nove 2 mL navadne epice in si jih primerno označi (lepilni trak čez!); PUSTI JIH ODPRTE!

1. po centrifugiranju zavrži spodnje dno s tekočino; **zgornji del pa prenesi** na nove prej pripravljene in označene 2 mL navadne epice.
   * PREVERI, če je ostala še kakšna kapljica etanola kje na filtru ali v zgornjem nastavku. Če ja, ponovno scentrifugiraj preden preideš na naslednji korak! (moraš se znebiti vsega etanola)
2. dodaj **75µL raztopine C6 na sredino filtra** ne da bi se ga dotikala!!!
3. **inkubiraj** na sobni temperaturi 3-5 min *(podaljšano glede na orig protokol)* 🡪 podaljšaj na 10 min
4. **centrifugiraj**: 10 000x g, 30 sek, sobna temp.

Nastavi si nove COLLECTION TUBE in si jih primerno označi (lepilni trak čez!); PUSTI JIH ODPRTE!

1. zgornji filter prestavi na novo COLLECTION TUBE; *(ponovljena elucija, dodano glede na orig. protokol)*
2. Tekočino pa prepipetiraj še enkat na filter, ki si ga prestavila na novo COLLECTION TUBE
3. ponovno **inkubiraj** na sobni temperaturi 3-5 min 🡪 podaljšaj na 10 min
4. **centrifugiraj**: 10 000x g, 30 sek, sobna temp.
5. Zavrži zgornji nastavek s filtrom, **obdrži spodnji del s tekočino in ga shrani na -20°C.**