

ÖLJY-YHDISTEILLÄ PILAANTUNEEN
MAAN MIKROBISTON ANALYSOINTI
DNA- MENETELMILLÄ

LAHDEN AMMATTIKORKEAKOULU
Ympäristötekniikan koulutusohjelma
Ympäristöbiotekniikan suuntautumisvaihtoehto
Opinnäytetyö
Kevät 2009
Hanna Puttonen

Lahden ammattikorkeakoulu
Tekniikan laitos
Ympäristötekniikan koulutusohjelma

PUTTONEN, HANNA: Öljy-yhdisteillä pilaantuneen maan mikrobiston analysointi DNA-menetelmillä

Ympäristöbiotekniikan opinnäytetyö, x sivua, x liitesivua

Kevät 2009

TIIVISTELMÄ

Tämä opinnäytetyö on osa Helsingin yliopiston TELMI-nimistä hankekokonaisuutta, joka koostuu Suomen luonnonvarainsäätiön rahoittamasta projektista ”Ympäristömyrkyjä hajottavien eliöiden jalostaminen tehostetun luonnonvalinnan avulla” sekä Marjatta ja Eino Kollin säätiön tukemasta ”Puunsuoja-aineilla pilaantuneen maan puhdistaminen maaperän bakteerien avulla” -nimisestä hankkeesta.

Opinnäytetyössä pyrittiin analysoimaan dieselin vaikutusta humusvoittoisen metsämaan mikrobistoon DNA-menetelmiä käyttäen. Puolet maanäytteistä oli otettu dieselillä saastuneesta kohdasta ja toinen puoli puhtaasta kohdasta. Osaan maanäytteistä lisättiin dieseliä ja osaan jätettiin tekemättä lisäys vertailun vuoksi. Työssä käytettiin kahta eri aikapistettä, kokeen aloituspäivä sekä kahdeksan viikon kuluttua tästä. Näiden kahden ajankohdan väliltä koetettiin löytää eroavaisuuksia.

Käytännön suoritukseen kuului DNA:n eristys maanäytteestä, DNA:n monistaminen polymeraasiketjureaktion avulla, agarosigeelija molemmista edellisistä saaduista tuotteista sekä denaturoitu gradienttigeelielektroforeesi eli DGGE, jossa eri mikrobiryhmät saadaan eroteltua toisistaan. DGGE-geeliä tarkastellen pystyttiin tekemään johtopäätöksiä dieselin vaikutuksesta mikrobeihin ajankohdittain ja käsittelyittäin.

Käytetyillä menetelmillä ei pystytty vastaamaan tutkimuskysymykseen. Koska tutkittavat näytteet sisälsivät runsaasti fragmentteja, oli tulosten käsittely hankalaa ja aikaa vievää. Rinnakkaisnäytteiden väliset erot olivat melko suuria, mistä johtuen ei juurikaan pystytty tekemään vertailuja eri käsittelyjen ja aikapisteiden välillä. DGGE-geelien tulkinta kannattaisi tehdä siihen suunnitellun tietokoneohjelman avulla. Spesifien alukkeiden käyttö olisi pienentänyt fragmenttien määrää, jolloin DGGE-geelien tulkinta olisi helpompaa.

Asiasanat: diesel, DGGE, bioremediaatio.

Lahti University of Applied Sciences
Faculty of Technology
Degree Program of Environmental Technology

PUTTONEN, HANNA: Analyzing microbiota of soil contaminated by oil compounds by DNA technologies

Bachelor's Thesis of Environmental Biotechnology, x pages, x appendices

Spring 2009

ABSTRACT

This bachelor's thesis is a part of a scheme called "TELMi" that consists of two different projects. The first one, "Expedited evolution of soil bacteria exposed to organic contaminants", is financed by Foundation for Research of Natural Resources in Finland, and the latter one, "Remediation of wood preserver contaminated soil", is financed by Marjatta and Eino Kolli Foundation.

The aim of this study was to analyze how diesel affects microbiota of a forestland including a lot of humus by DNA technologies. One half of the soil samples were taken of a site contaminated by diesel and the other half of a pure site. In some of the soil samples were added diesel and some were left without so that they could be compared. This study concentrated on two different points in time, the day the experiment started and eight weeks after that. Results between these two points were analyzed trying to find differences between them.

The methods used were DNA extraction out of soil sample, multiplying DNA by polymerase chain reaction, running agarose gel with products from above-mentioned phases and denaturing gradient gel electrophoresis, with which different microbe groups could be separated. Then the DGGE gel could be examined and conclusions out of diesel's impacts on microbes in the beginning and on the eighth week made.

With the methods used in this study the research question could not be answered to. Because there was a large number of fragments in samples, handling results was challenging and gradual. The differences between parallel samples were quite big, and because of that comparing different treatments and time points could not be done much. It would be more worthwhile to use a computer program designed for the purpose. Using specific primers there would have been less fragments, making interpretation easier.

Key words: diesel, DGGE, bioremediation.

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	1
2	TUTKIMUSMENETELMÄN KUVAUS	2
2.1	Menetelmän yleiskuvaus	2
2.2	Polymeraasiketjureaktio	3
2.3	Agaroosigeelielektroforeesi	5
2.4	Denaturoiva gradienttigelielektroforeesi (DGGE)	6
3	TUTKIMUSNÄYTTEET JA -OLOSUHTEET	7
3.1	Koejärjestely, näytteenotto ja analysoitavat näytteet	7
3.2	DNA:n eristys	9
3.3	Polymeraasiketjureaktio	9
3.4	DGGE-geeliajo	10
4	TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELO	11
4.1	Laboratoriotöiden onnistuminen	11
4.2	DGGE-geelien tulkinta ja fragmenttien laskeminen	13
4.3	DGGE-tulosten tarkastelu ja yhteenveto	15
5	JOHTOPÄÄTÖKSET JA JATKOTUTKIMUSHAASTEET	17
	LÄHTEET	18
	LIITTEET	19

1 JOHDANTO

Tämä opinnäytetyö on osa Helsingin yliopiston TELMI-nimistä hankekokonaisuutta, joka koostuu Suomen luonnonvarainsäätön rahoittamasta projektista ”Ympäristömyrkyjä hajottavien eliöiden jalostaminen tehostetun luonnonvalinnan avulla” sekä Marjatta ja Eino Kollin säätiön tukemasta ”Puunsuoja-aineilla pilaantuneen maan puhdistaminen maaperän bakteerien avulla” -nimisestä hankkeesta. Hankkeet tähtäävät siihen, että maan mikrobeja pystyttäisiin hyödyntämään selvästi paremmin eri ympäristömyrkyjen haittojen ehkäisemisessä ja vähentämisessä. (Sinkkonen 2007.)

Diesel on kevyttä polttoöljyä. Sitä voi joutua maahan teollisuusprosesseista, tahallisina päästöinä tai onnettomuuksien seurauksena. Pääasiallisesti sitä vuotaa jätemoottoriöljyn hävittämisen yhteydessä, kun tankit vuotavat tai kuljetuksen aikana sattuu onnettomuus. Vuodon sattuessa maanpinnalla tai sen läheisyydessä haihtuvat yhdisteet haihtuvat ilmakehään. Jos öljyä sen sijaan pääsee maan alapuolisiin kerroksiin, saattavat helposti liikkuvat ja vesiliukoiset ainesosat kulkeutua pohjaveteen. Veteen liukenemattomat ainesosat taas saattavat imeytyä hyvinkin tiukasti kiinni maahiukkasiin. (Scragg 2005.) Pääasiallisesti diesel joutuu maaperään nestemäisessä muodossa, mutta joskus öljyn palaessa sitä voi kulkeutua maahan myös laskeumana (Sillanpää 2007).

Suomen ilmastolla on jonkin verran vaikutusta dieselin käyttäytymiseen maaperässä. Lyhyt kasvukausi ja maan jäätyminen hidastavat hajoamisprosessia. Jäisessä maassa biologista hajoamista ei tapahdu lainkaan, ja lämpötilan lasku hidastaa mikrobitoimintaa, kun mennään kauemmaksi niiden entsyymien toiminnan lämpötilaoptimista. (Sillanpää 2007.)

Biologisia menetelmiä, joissa saastuttava aine hajotetaan ja poistetaan, kutsutaan yhteisellä nimellä bioremediaatio. Hiilivedyillä saastuneessa maassa on todettu olevan suurempi määrä mikrobeja kuin puhtaissa maissa, mutta lajimäärät sen sijaan ovat pienempiä. Tämä voi johtua useasta eri seikasta. Siihen voivat

vaikuttaa mikrobien kasvuun ja aineenvaihduntaan vaikuttavat tekijät sekä itse orgaanisen yhdisteen ominaisuudet. (Scragg 2005.)

Tämä opinnäytetyö liittyy maan alkuperäisen mikrobiston hyväksikäyttämiseen dieselin hajottamisessa. Työssä oli tarkoitus selvittää, millaisia muutoksia dieselillä saastuneen maan mikrobistossa tapahtuu ajan kuluessa. Olettamuksena on, että maassa, johon on aiemmin joutunut dieseliä, hajoaisi nopeammin kuin maassa, johon se joutuu ensimmäisen kerran ja siten myös mikrobisto olisi erilainen. Opinnäyte perustuu laboratoriossa tehdyn koejärjestelyn tulosten analysointiin DNA-menetelmillä. Koejärjestelyssä puhtaaseen ja aikaisemmin dieselillä saastuneeseen eli prekontaminoituneeseen maahan on lisätty dieseliä ja hajoamista seurattu.

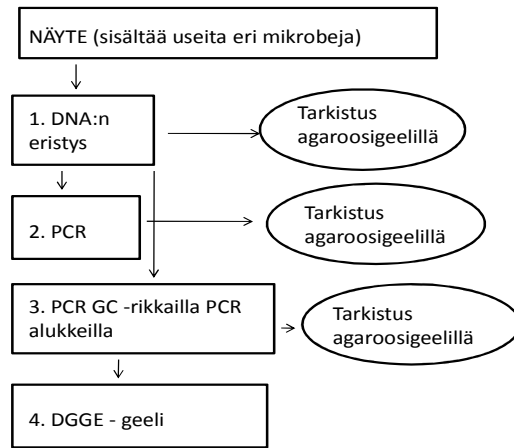
2 TUTKIMUSMENETELMÄN KUVAUS

2.1 Menetelmän yleiskuvaus

Tässä työssä on käytetty DNA-menetelmiä, joilla geneettinen aines saadaan suoraan ympäristönäytteestä sen sijaan, että mikrobeja ensin viljeltäisiin laboratoriossa. Tämä mahdollistaa myös sellaisten mikrobien tutkimisen, jotka eivät ole viljeltävissä. Tutkimukset suoraan ympäristöstä otetun ribosomaalisen RNA:n geneeistä ovat paljastaneet, että viljelyyn perustuvilla menetelmillä löydetään alle 1 % näytteessä olevista bakteeri- ja arkkilajeista. Tämä johtaa näytteen mikrobien monimuotoisuuden aliarvioimiseen. (Hugenholtz, Goebel & Pace 1998.)

Kuviossa 1 on esitetty työssä käytetyn menetelmän yleiskuvaus. Näytteestä eristetystä DNA:sta on monistettu polymeerasiketjureaktiolla (PCR) geenisekvenssi. Eri näytteiden geenisekvenssien erojen löytämiseksi PCR-tuotteet on analysoitu denaturoivalla gradienttigelielektroforeesilla (DGGE). Kohdasta 1 voidaan siirtyä kohtaan 3 jos entuudestaan on olemassa riittävästi taustatietoa. Kohdasta 2 voidaan siirtyä kloonaamaan ja DNA sekvensoimaan PCR -tuote.

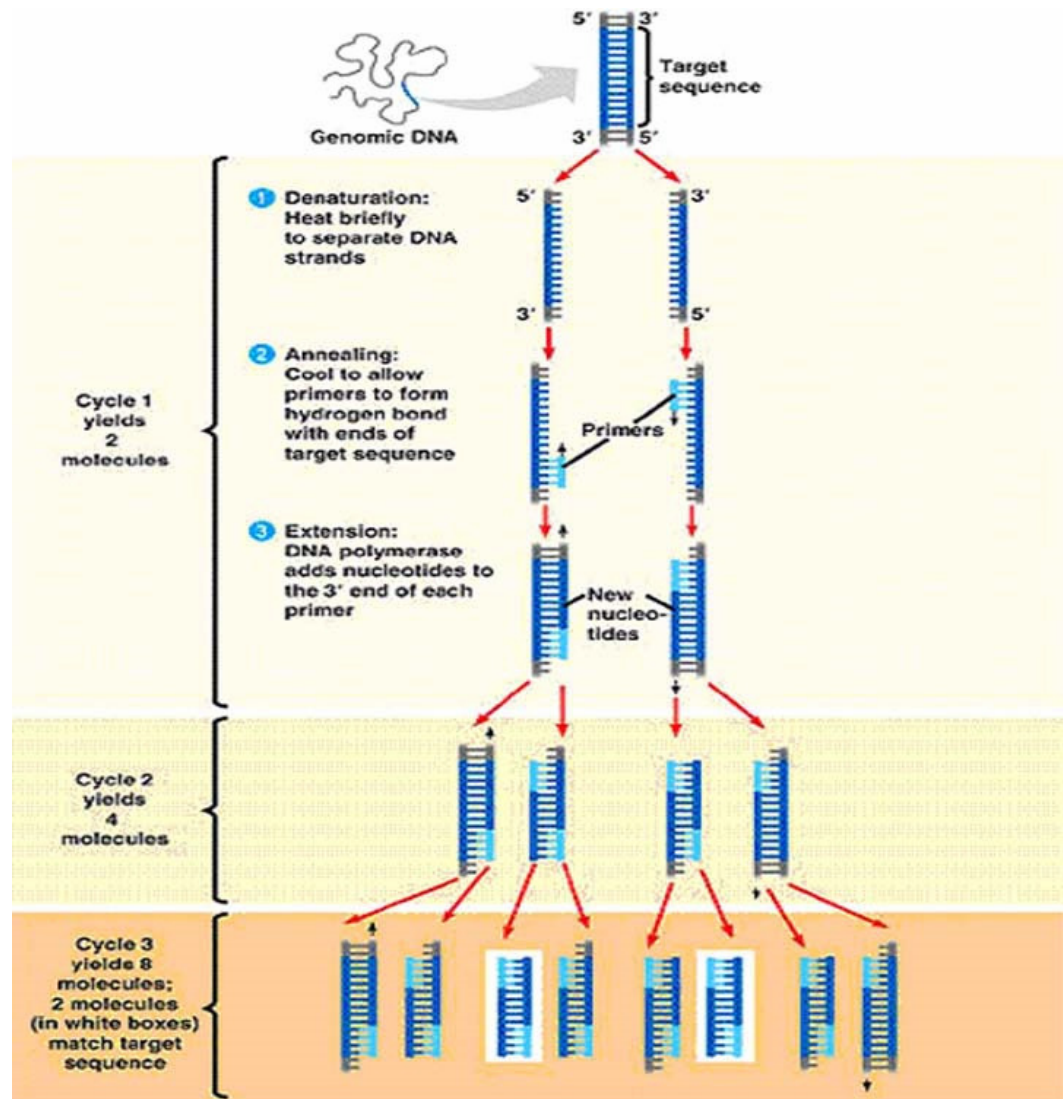
Myös kohdasta 4 voidaan jatkaa ja selvittää DNA sekvensoimalla näytteen mikrobisto tarkemmin kuin DGGE-geelillä.



KUVIO 1. Kaavio menetelmän etenemisestä.

2.2 Polymeerasiketjureaktio

Polymeerasiketjureaktion eli PCR:n avulla saadaan pienestä määrästä DNA:ta monistettua lyhyessä ajassa moninkertainen määrä, jota pystytään helpommin käyttämään analyyseissa. Se koostuu kolmesta eri vaiheesta, joita toistetaan 25-40 kertaa. Ensin nostetaan reaktioseoksen lämpötilaa, jotta DNA:n kaksoisjuosteet saadaan irrotettua toisistaan. Seuraavassa vaiheessa lämpötilaa lasketaan, jolloin juosteet alkavat taas pariutua ja alukkeet pääsevät sitoutumaan kohde-DNA:han. Alukkeet ovat oligonukleotidipätkiä, jotka ovat komplementaarisia monistettavan DNA-alueen alku- ja loppupäälle. Alukkeita on useimmiten kaksi kappaletta, yksi molempiin päihin. Kolmannessa vaiheessa nostetaan lämpötilaa arvoon, jossa uutta DNA:ta rakentava DNA-polymeraasi toimii parhaiten. Kyseinen entsyymi alkaa liittää alukkeista eteenpäin vastapuolta parittomalle juosteelle, ja DNA-synteesi alkaa. Kun seuraava kierros alkaa, uuden DNA:n mallina toimivat edellisessä syklissä muodostuneet tuotteet, ja näin DNA monistuu eksponentiaalisesti.



KUVIO 2. PCR-tekniikan kuvaus (Aaranyak 2007).

Polymeraasiketjureaktioon tarvittavia osasia ovat näytteen DNA:n, DNA-polymeraasin, ja alukkeiden lisäksi deoksidinukleosiditriposfaatit, joista uusi DNA alkaa rakentua. Tärkeää on valita alukkeet ja DNA-polymeraasi oikein. DNA-polymeraasi vaatii juuri sille sopivan lämpötilan ja ympäristön ja lämpötilan toimiakseen. Jos alukkeet on valittu väärin, toivotun tuotteen saanto voi jäädä pieneksi tai muodostua ei-toivottua tuotetta. Oikeat alukkeet myös helpottavat PCR-tuotteen jatkokäsittelyä. Templaatti eli näytteen sisältämä DNA on syytä puhdistaa hyvin, sillä muutoin se voi sisältää reaktiota inhiboivia aineita.

PCR on nykyisin yleistynyt siinä määrin, että sen voi sanoa olevan käytössä kaikissa molekyylibiologian laboratorioissa. Käytännössä PCR on hyvin herkkä menetelmä kontaminaatiolle. Jos reaktioseokseen joutuu jotakin ulkopuolista DNA:ta jossa on alukkeille sopivat sekvenssit, voi väärää DNA:ta monistua suuret määrät ja analyysien tulokset voivat vääristyä. Tavallisimpia kontaminaation lähteitä ovat reaktiossa käytettävät reagenssit sekä niiden käsittelyssä käytettävät välineet, etenkin pipetit. Pyrittäessä mahdollisimman puhtaaseen työskentelyyn olisi ennen PCR:ää tehtävät työvaiheet hyvä suorittaa eri tilassa ja eri välineillä kuin PCR-tuotteiden käsittely. Negatiiviset kontrollit ovat myös tärkeä keino, jonka avulla ns. väärät positiiviset tulokset voidaan havaita. (Piiparinen & Lappalainen 1998, 27-29 & 34.)

2.3 Agarosigeelielektroforeesi

Agarosigeelielektroforeesin avulla pystytään arvioimaan DNA:n pilkkoutuneisuutta sekä erottamaan erikokoiset DNA-molekyylit toisistaan. Eri kokoisten DNA-palojen nukleiinihapot kulkeutuvat ajolaitteen sähkökentässä negatiiviselta navalta positiivista napaa kohti. Koska agarosigeeli on rakenteeltaan verkkomainen, pääsevät pienemmät DNA-palat kulkemaan siinä suuria nopeammin.

Jotta DNA saataisiin näkymään, värjätään geeli väriaineella joko ennen ajoa tai ajon jälkeen. Kaksi yleisintä värjäysmenetelmää ovat etidiumbromidi- ja SYBR Gold -menetelmä. Näistä kahdesta menetelmästä etidiumbromidivärjäys on edullisempi vaihtoehto. SYBR Goldilla on muita etuja. Se fluoresoi yli tuhat kertaa paremmin kuin etidiumbromidi, ja sillä voidaan värjätä denaturantteja sisältäviä geelejä.

Tutkittavat näytteet pipetoidaan geelillä oleviin kaivoihin, joista ne lähtevät liikkeelle, kun sähkövirta kytketään päälle. Jotta näytteet saadaan putoamaan kukin omaan kaivoonsa, on niiden tiheyttä lisättävä. Tätä tarkoitusta varten näytteeseen lisätään latauspuskuria, joka sisältää kahta elektroforeesin positiivista

napaa kohti liikkuvaa väriä. Agarosigeelijaion päätyttyä geeliä tarkastellaan UV-valossa polaroid- tai CCD-kameralla.

Agarosigeelielektroforeesilla voidaan tarkistaa, onko PCR:llä saatu aikaan oletettua tuotetta. Siinä PCR-tuotteiden koot saadaan eroteltua. PCR-tuotteiden koot määritetään DNA-ladderin suhteen. Ladder sisältää tunnetun kokoisia DNA-fragmentteja, jotka ajetaan geelillä PCR-tuotteiden rinnalla. (Suominen & Ollikka 1994, 111-115.)

2.4 Denaturoiva gradienttigelielektroforeesi (DGGE)

Denaturoivalla gradienttigelielektroforeesilla pystytään erottamaan PCR-reaktion avulla monistetut DNA-tuotteet. Se eroaa agarosigeelielektroforeesista siinä, että samankokoiset PCR-tuotteet pystytään erottamaan toisistaan jos niiden DNA-sekvenssi on erilainen. Näin saadaan DNA yksilöityä. DGGE-ajossa PCR-tuotteet törmäävät suurempiin denaturoimisainemääriin kuin agarosigeelillä.

Saavutettaessa tietty denaturoimisainekonsentraatio, kaksijuosteisen PCR-tuotteen heikommin sulavat alueet alkavat denaturoitua, jolloin niiden kulkeutuminen hidastuu selvästi. Eri bakteerien DNA-sekvenssit denaturoituvat erilaisissa denaturoimisainekonsentraatioissa muodostaen bändejä eli juovia geelillä. Jokainen juova esittää teoreettisesti yhteisössä elävää bakteeripopulaatiota. Nämä ns. sormenjäljet voidaan ladata tietokantoihin, joissa pystytään arvioimaan sormenjälkien samankaltaisuus sekä määrittämään ympäristöjen ja eri käsittelyjen välisiä mikrobisia rakenne-eroja. (Sigler 2004.)

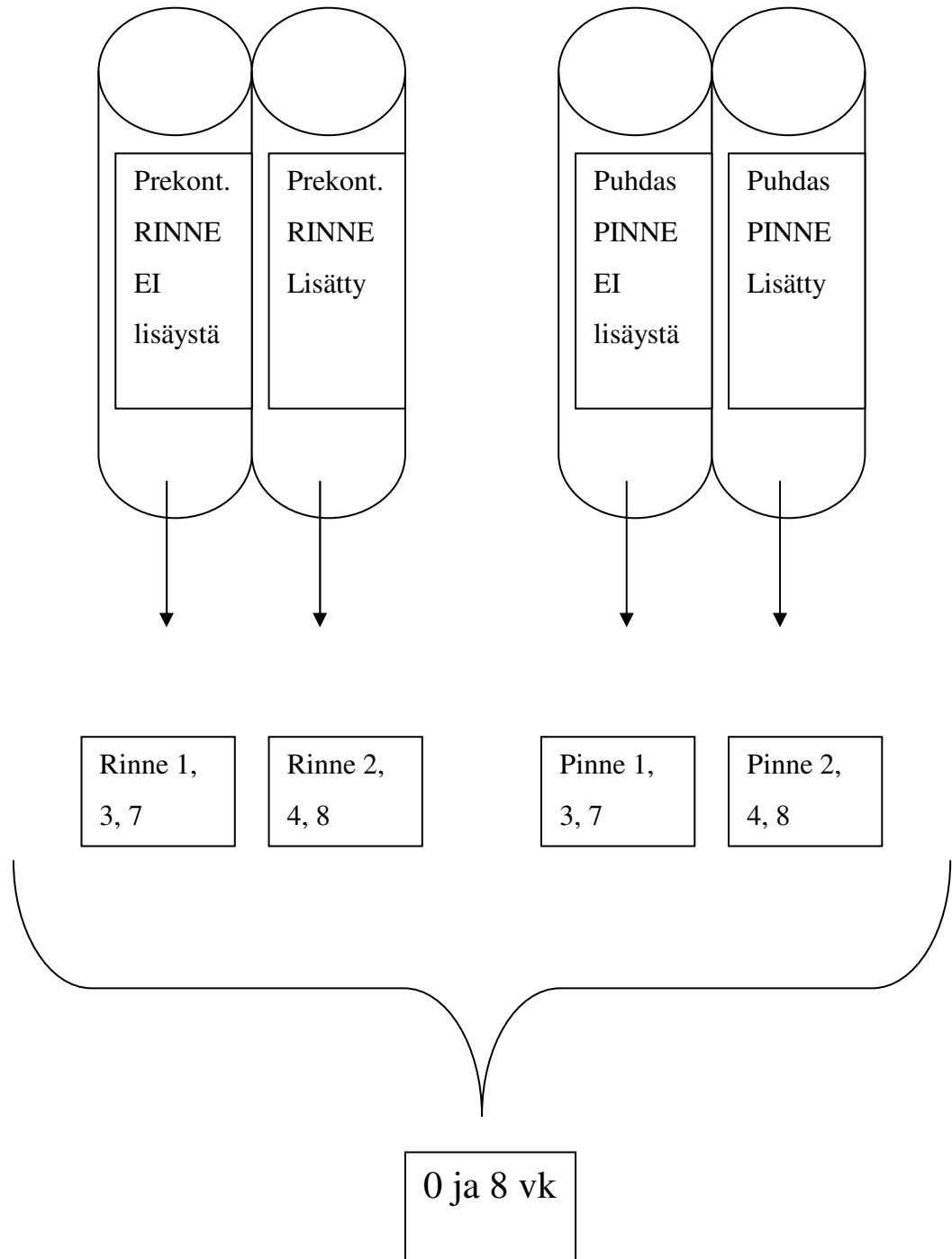
DGGE:n merkittävimpiä ominaisuuksia mikrobiekologian alalla on se, että sillä on mahdollista analysoida useita näytteitä samanaikaisesti. Näin pystytään seuraamaan mikrobisyhteisöissä ja niiden välillä tapahtuvia muutoksia. (Muyzer 1999, 319) DGGE:tä ei juurikaan voida käyttää kvantitatiivisuuden arvioimisessa. Lisäksi menetelmän toistettavuus eri laboratorioiden välillä on melko huono, eikä sen avulla pystytä erottamaan kovinkaan suuria määriä toiminnallisia taksonomyksiköitä toisistaan. (Grant & Ogilvie 2004, 133.)

3 TUTKIMUSNÄYTTEET JA -OLOSUHTEET

3.1 Koejärjestely, näytteenotto ja analysoitavat näytteet

Maanäytteet koejärjestelyä varten oli otettu joen lähellä olevasta humusmaasta sekä dieselillä saastuneesta että puhtaasta kohdasta. Koejärjestelyssä maatyyppejä oli neljä erilaista (Kuvio 3). Ensimmäinen tyyppi oli pre-kontaminoitunut maa, johon laboratorionäytteenottoa perustettaessa lisättiin dieseliä. Toinen tyyppi oli myös pre-kontaminoitunutta maata, mutta siihen ei lisätty dieseliä. Kolmas maatyyppi oli puhdasta maata, johon lisättiin dieseliä kokeen alussa. Neljäs näytetyyppi oli puhdasta maata ilman lisäyksiä. Jokaista maatyyppiä oli kolme rinnakkaista ämpäriä.

Kokeen alkaessa otettiin alunäytteet ja 8 viikkoa kokeen aloituksesta seuraavat. Näytteenotto ämpäreistä ei kuulunut tähän työhön vaan ne saatiin valmiina. Näytteenotto oli tehty ottamalla suurikokoisilla pinseteillä maata maaämpäristä kolmesta eri kohdasta siten, että maapatsas on ollut kiinteä ja näytettä on saatu jokaisesta kerroksesta. Pinsetit oli pesty etanolilla ja poltettu liekissä jokaisen näytteenoton jälkeen. Näytteet on säilytetty pienissä pakastepusseissa pakastimessa noin -20°C:n lämpötilassa. Näytteitä oli siis jokaista maatyyppiä kohden kolme sekä kokeen alussa että 8 viikon kohdalla. Tämä teki yhteensä 4 (eri maanäytteet) \times 3 (rinnakkaiset ämpärit) \times 2 (kaksi aikapistettä) = 24 analysoitavaa näytettä. Kuviossa 3 on esitty koejärjestely.



KUVIO 3. Kaavakuva näytejärjestyksestä sekä näytteiden koodit.

3.2 DNA:n eristys

Maanäytteistä eristettiin DNA:t MO BIO:n PowerSoil DNA Isolation Kit:n avulla. Kitti on kaupallinen tuote, joka sisältää DNA:n eristykseen tarvittavat reagenssit ja reaktioputket sekä tarkat ohjeet eristyksen suorittamiseksi. Edellämainittu kitti on suunniteltu erityisesti genomisen DNA:n eristämiseen ympäristönäytteistä, jotka sisältävät paljon humusta. Tällaisia näytetyyppejä ovat komposti, sedimentti ja lanta. Menetelmä poistaa tehokkaasti PCR:ää häiritsevät tekijät hankalimmistakin maatyypeistä.

Kukin näyte lisättiin omaan helmiä sisältävään putkeensa, jossa saatiin aikaan nopea ja täydellinen homogenisoituminen. Solut hajotettiin mekaanisilla ja kemiallisilla menetelmillä. Lopullinen genominen DNA saatiin kvartsisuodattimelle, jossa se pestiin ja josta se eluoitiin. Tämän jälkeen DNA oli valmiina käytettäväksi PCR-analyyseissa. (Liite 1.)

3.3 Polymeraasiketjureaktio

PCR-reaktiossa käytettiin seuraavia alukkeita: MF341GC (sekvenssi: 5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3') ja MR907 (sekvenssi: 5'-CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT-3'). Ne ovat peräisin 16S rDNA-geenistä. Alukkeiden valintaan vaikutti se, että niistä oli hyvät lähdetiedot DGGE-menetelmän kehittäjältä sekä se, että ne oli havaittu toimiviksi muissa tutkimuksissa. GC-hännätön aluke oli Invitrogenin valmistama. GC-hännällistä aluketta oli käytössä kahden eri valmistajan valmistamana. Alukkeiden määrä 50µl:n reaktiutilavuutta kohden oli Invitrogenin alukkeilla 10 ja Oligomerin alukkeilla 20 pikomoolia.

Näytteistä otetut DNA:t monistettiin PCR-menetelmällä käyttäen seuraavaa lämpötilaohjelmaa:

1. +94°C 5 min.
2. +94°C 20 sek.
3. +55°C 20 sek.
4. +72°C 30 sek.
5. kohdasta 2 34x
6. +72°C 5 min.
7. +11°C 20 sek.
8. +4°C loputtomiin.

Reaktiossa käytettiin Dynazyme II (Finnzymes, Espoo) DNA polymeraasia 1 U 50µl:n reaktiotilavuutta kohti. Templaattina käytettiin 0,1-10 µl DNA eristystä. PCR -reaktioista tarkistettiin 1/10 eli 5 µl agarosigeelillä (1 %) ajamalla 45 min 100 V. Näytteet agarosigeeliä varten valmistettiin lisäämällä 5 µl näytteeseen 6 x geeliväriä 0,5 – 0,7 µl.

3.4 DGGE-geeliajo

DGGE-geeliajot tehtiin Bio-Radin geeliajolaitteella, ja geelien valmistus suoritettiin myös Bio-Radin välineillä, jotka oli tarkoitettu juuri kyseisellä laitteella ajettavan geelin valmistukseen. Ajoissa käytettiin 6 % geeliä. Ainoa poikkeus oli 11.7.08 ajettu geeli, joka vahingossa tehtiin 9 %:ksi.

DGGE-geelejä ajettiin 16,5 h 70 V. Geelit värjättiin SyberGreen – värillä lisäämällä 3 µl väriä 30 ml:aan vettä ja levittämällä liuos geelin päälle. Ylimääräinen liuos poistettiin pipetillä 30 min kuluttua. Analysoitavia näytteitä sisältäviä DGGE-geelejä oli yhteensä viisi kappaletta, mutta koska yhdellä geelillä oli vain yksi analyysikelpoinen näyte, oli se hylättävä, koska tämän vuoksi sitä ei voinut vertailla muiden näytteiden kanssa.

4 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU

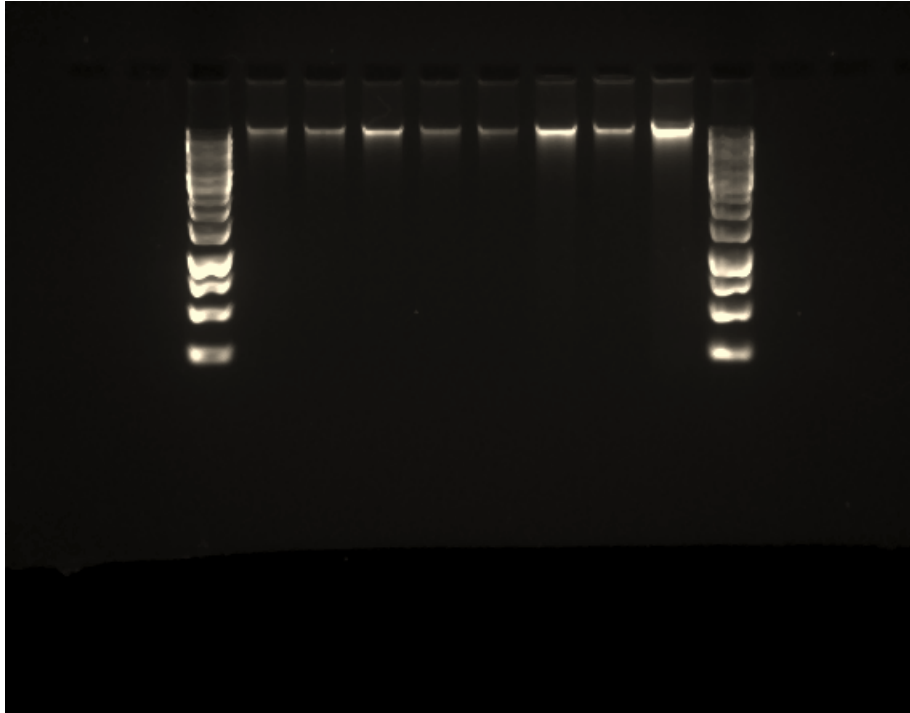
4.1 Laboratoriotöiden onnistuminen

DNA:n eristyksessä ei pääsääntöisesti esiintynyt ongelmia ja agarosigeelijaion jälkeen eristykset näyttivät kuvion 4 agarosigeelin kaltaiselta, eli DNA oli säilynyt kokonaisena. Suuren molekyylikoon DNA-juova näkyy kirkkaana etidiumbromidilla värjättyssä geelissä. Kaikista 24 näytteistä saatiin eristettyä DNA:ta.

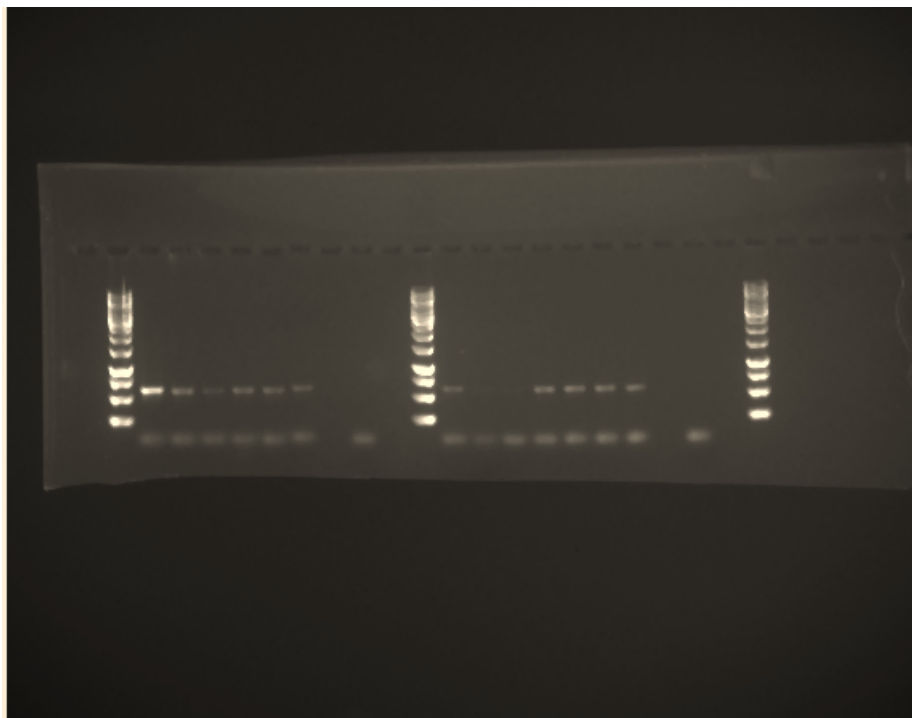
PCR:n kanssa oli jonkin verran ongelmia, jotka todennäköisesti johtuivat siitä, että DNA - näytteitä laimennettiin liikaa. Näytteitä laimennettiin kymmenesosaan, koska arveltiin niissä olevan PCR-reaktiota häiritseviä tekijöitä ja niiden määrän vähenevän tarpeeksi laimennettaessa. Näytteissä oli todennäköisesti laimennuksen jälkeen liian vähän DNA:ta, sillä lopulta PCR-tuotetta saatiin, kun näytteen määrät reaktiossa olivat kohdillaan.

DGGE – PCR:ään käytettiin aluksi Invitrogenin valmistamaa MF341GC aluketta ja sen loputtua vaihdettiin Oligomerin vastaavaan alukkeeseen. Aivan ongelmitta vaihto ei sujunut, sillä samalla alukemäärällä ei PCR-reaktiota saatu onnistumaan. Kokeilujen jälkeen tultiin siihen tulokseen, että Oligomerin aluketta tarvittiin kaksinkertainen määrä Invitrogenin alukkeeseen verrattuna. Loppujen lopuksi kaikista näytteistä saatiin PCR-tuotetta.

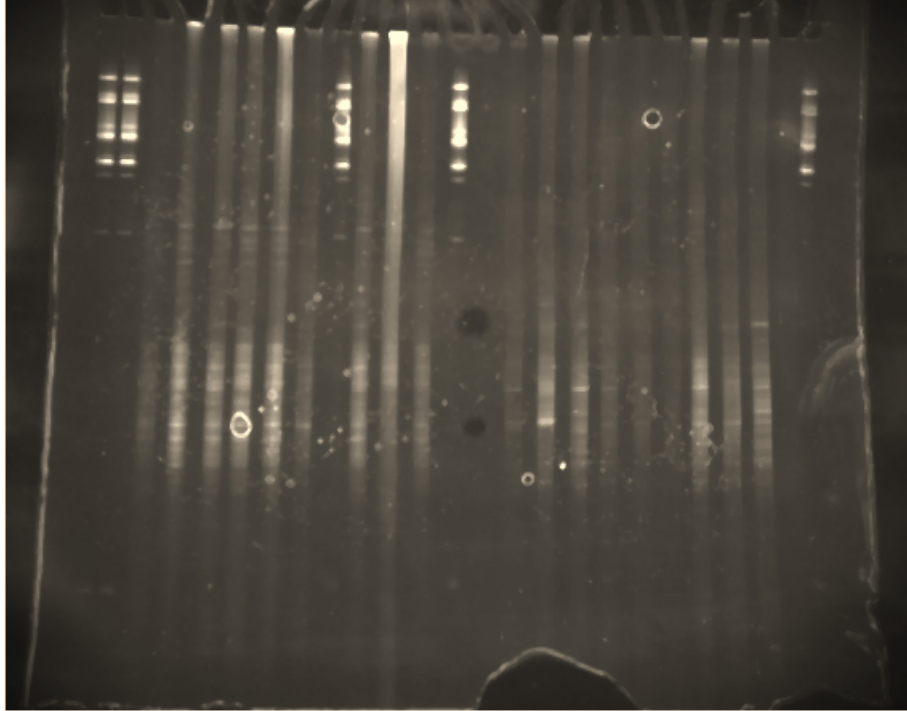
DGGE-geelit onnistuivat vaihtelevasti, ja useita samoja näytteitä oli ajettava useamman kerran. Ajoon laitettavan PCR-tuotteen määrää oli säädeltävä sen mukaan, kuinka paljon tuotetta reaktiossa muodostui. Jos agarosigeelillä PCR-tuote näytti onnistuneen heikosti, sitä tarvittiin DGGE-ajoon suurempi määrä. Yhteensä ajettiin viisi analysoitavaksi tarkoitettua DGGE- geeliä.



KUVIO 4. Agarosigeelillä analysoituja DNA-eristyksiä.



KUVIO 5. Agarosigeelillä analysoituja PCR-tuotteita, koko noin 625 bp.



KUVIO 6. DGGE-geelillä analysoituja näytteitä.

4.2 DGGE-geelien tulkinta ja fragmenttien laskeminen

Geelikuvat tulostettiin A4-kokoiselle paperille (Glossy 160 g/m²). Paperin päälle teipattiin läpinäkyvä kalvo, johon merkittiin tussilla analyysiin mukaan otettavat fragmentit. Apuna analysoinnissa käytettiin tietokoneruudulle suurennettuja kuvia, joissa bändit erottuvat usein selkeämmin kuin paperitulosteissa. Valokuvista piirrettiin word-ohjelman avulla työversiot, joihin merkittiin näytteiden bändit. Näin eri näytteiden välinen vertailu helpottui.

Geelien tulkinta aloitettiin vertailemalla rinnakkaisnäytteitä toisiinsa yhden geelin sisällä. Fragmenttien määrät eri geeleiltä on koottu taulukkoon 1. Joitakin näytteitä on ajettu kahdella DGGE-geelillä, mikä antoi mahdollisuuden vertailla fragmenttien määriä. Useimmiten kuitenkin myös PCR jouduttiin uusimaan, koska PCR-tuotetta ei ollut tarpeeksi uuteen DGGE-geeliin.

TAULUKKO 1. DGGE-geeliltä tulkittujen fragmenttien määrä. Lihavoituja lukuja on käytetty myöhemmin keskiarvojen laskemiseen, ja suluissa olevat fragmenttiluvut on jätetty keskiarvolaskuista pois.

VIKKO 0	DGGE1 29.5.2008		DGGE2 2.7.2008		DGGE3 3.7.2008		DGGE4 11.7.2008	
Prekontaminoitunut Ei lisäystä	frag. lkm	PCR pvm	frag lkm	PCR pvm	frag. lkm	PCR pvm	frag lkm	PCR pvm
Rinne 1	(5)	(9.5)			35	2.7		
Rinne 3	(2)	(9.5)			31	2.7		
Rinne 7	(4)	(9.5)			26	2.7		
Prekont, Lis								
Rinne 2					31	2.7		
Rinne 4					(13)	2.7		
Rinne 8	23	5.5 I					25	9.7
Puhdas, Ei lis								
Pinne 1	(2)	(13.5)	24	30.6				
Pinne 3			16	4.6				
Pinne 7	(4)	(9.5)	20	30.6				
Puhdas, Lis								
Pinne 2			20	30.6				
Pinne 4	(6)	(9.5)	16	30.6			13	8.7
Pinne 8					(32)	30.6		
VIKKO 8								
Prekont.,Ei lis								
Rinne 1	30	30.4			38	2.7	30	9.7
Rinne 3	25	5.5 II			(13)	5.5 II		
Rinne 7	28	28.4			25	2.7		
Prekont., Lis								
Rinne 2	18	30.4			25	2.7		
Rinne 4	28	5.5 II			(17)	5.5 II		
Rinne 8	(8)	5.5 I						
Puhdas, Ei lis								
Pinne 1	20	28.4	26	30.6				
Pinne 3	17	5.5 II	24	23.6	23	23.6		
Pinne 7			21	30.6				
Puhdas, Lis								
Pinne 2					(13)	5.4	30	8.7
Pinne 4					25	19.5		
Pinne 8					34	5.5 II		

4.3 DGGE-tulosten tarkastelu ja yhteenveto

Kolmessa tapauksessa on sama PCR-tuote analysoitu eri DGGE-geeleillä (Rinne 3, Rinne 4 ja Pinne 3; kahdeksan viikkoa). Näistä kahdessa tapauksessa DGGE1 -geeliltä on tulkittu löytyväksi selvästi enemmän fragmentteja kuin geeliltä DGGE2. Viikon 8 Rinne 3 PCR – näytteestä DGGE 1 ja 2 geeliltä tulkittiin 25 ja 13 fragmenttia kun vastaavat luvut Rinne 4 näytteestä olivat 28 ja 17. Viikon 8 näytteestä Pinne 3 sama PCR -tuote kahdella eri geelillä ajettuna tuotti DGGE 2 ja - 3 geeleillä lähes saman määrän tulkittuja fragmentteja (24 ja 23). Vertailu eri DGGE - geelien välillä on vaikeaa ja identtisten olosuhteiden saaminen DGGE-analyysiin haastavaa.

Vastaavaa ”PCR-kontrollia” ei ole olemassa, sillä yhdestäkään näytteestä ei ole olemassa eri PCR-monistuksesta, samalla DGGE-geelillä ajettua esimerkkiä. Sen sijaan samasta DNA-näytteestä eri PCR-monistuksesta ja eri DGGE-geelillä ajetuista näytteistä kylläkin. Esimerkiksi kahdeksan viikon kohdalla otettu Pinne 2 –näyte (PCR 5.4.08) tuotti DGGE3-geelillä 13 ja DGGE4-geelillä (PCR 8.7.08) 30 fragmenttia. Toisaalta koejärjestelyn alussa otettu Rinne 8 – näyte tuotti DGGE1 ja – 4 geeleillä 23 (PCR 5.5.08) ja 25 (PCR 9.7.08) fragmenttia. Samoin Pinne 4 (0 viikkoa) sekä kahdeksan viikon kohdalla otetut näytteet Rinne 1, 2 ja 7 tuottivat melko samanlaiset määrät fragmentteja DGGE-geeleillä.

Taulukkoon 2 on laskettu keskiarvot taulukon 1 fragmenteista kun poikkeavat määrät on poistettu ja kun fragmenttimäärät yli 10 on otettu mukaan (kts. taulukko 1). Hylkäyksen perusteena on muista poikkeava arvo. Ainoa käsittely, jossa on havaittavissa eroa viikkojen 0 ja 8 välillä on puhdas maa, johon on lisätty dieseliä. Toisaalta, jos hylätty arvo ”32” otetaan mukaan, saadaan keskiarvoksi 20 fragmenttia.

TAULUKKO 2. Keskimääräiset fragmenttien määrät eri käsittelyissä 0 ja 8 viikon kohdalla.

Käsittely	Fragmenttien määrä vko 0 (kokeen aloitus)	Fragmenttien määrä vko 8
Prekontaminoitunut maa, ei lisäystä	31 (31)	29 (27)
Prekontaminoitunut, dieseliä lisätty	26 (23)	24 (19)
Puhdas maa, ei lisäystä	20 (20)	22 (22)
Puhdas maa, dieseliä lisätty	16 (20)	30 (26)

Alkuperäinen tarkoitus oli, että eri käsittelyjen ja kahden aikapisteen välillä löydettäisiin erilaisia DGGE-geelikuvioita eli sormenjälkiä ja voitaisiin näin arvioida mikrobiston monimuotoisuutta. Rinnakkaisnäytteiden välillä havaittu diversiteetti oli suuri ja eri käsittelyjen ja aikapisteiden välillä ei voitu tehdä vertailua. Taulukossa 3 on esitetty rinnakkaisnäytteiden välillä löydetty yhteiset fragmentit, joiden voidaan olettaa edustavan samaa mikrobilajia.

TAULUKKO 3. Rinnakkaisnäytteiden väliset yhteiset fragmentit.

	Näytteet	PCR, DGGE	Yhteiset fragmentit %
vko 0			
Prekont, ei lisäystä	Rinne1, 3, 7	2.7.08, 3.7.08	40
Puhdas maa, ei lisäystä	Pinne1, 7	30.6.08, 2.7.08	52
Puhdas maa, dieseliä lisätty	Pinne2, 4	30.6.08, 2.7.08	64
vko 8			
Prekont, ei lisäystä	Rinne1, 7	2.7.08, 3.7.08	43
Prekontaminoitunut, dieseliä lisätty	Rinne2, 4	PCR: 30.4 & 5.5 II, DGGE: 29.5.08	64
Puhdas maa, ei lisäystä	Pinne1, 7	30.6.08, 2.7.08	74
Puhdas maa, dieseliä lisätty	Pinne4, 8	PCR: 19.5 & 5.5 II, DGGE: 3.7.08	59

5 JOHTOPÄÄTÖKSET JA JATKOTUTKIMUSHAASTEET

Tässä työssä tuotettiin arvokasta tietoa jatkotutkimuksia varten vaikka valitulla tutkimusmenetelmällä ei pystytty vastaamaan tutkimuskysymykseen eli vertailemaan muutoksia maan mikrobistossa eri käsittelyiden välillä. DGGE-geelien erotuskyky on rajallinen ja käytettäessä universaaleita PCR-alukkeita monistustuotteita tulee paljon erilaisia. Vertailu eri geelien välillä on vaikeaa, vaikka geelille ottaisi mukaan vertailunäytteitä.

Osa tässä työssä ajettujen DGGE-geelien fragmenteista on leikattu irti, ja niistä voidaan DNA-sekvensoinnin avulla selvittää, mitä mikrobiryhmää ne edustavat. Myös spesifit, tietyille mikrobiryhmälle tarkoitetut PCR-alukkeet, on otettu käyttöön, mikä vähentää PCR-tuotteiden ja fragmenttien määrää DGGE-geelillä.

Fragmenttimäärät olivat niin suuria, että niiden käsittely käsin oli hankalaa ja työlästä. Tähän tarkoitukseen suunnitellulla tietokoneohjelmalla analysointi olisi helpottunut huomattavasti.

Voi myös olla, että näytteenottojen välinen aika ei ollut tarpeeksi pitkä eikä mikrobisyhteisöllä ollut aikaa muuttua. Sitä voidaan kuitenkin selvittää vasta, kun tutkimusmenetelmää on saatu parannettua.

LÄHTEET

Aaranyak. 2007. Diagrammatic representation of the process of PCR. Aaranyak. [viitattu 3.2.2009]. Saatavissa: http://www.aaranyak.org/images/PCR_1.jpg.

Grant, A. & Ogilvie, L. 2004. Name that microbe: rapid identification of taxa responsible for individual fragments in fingerprints of microbial community structure. *Molecular Ecology Notes* (2004). Centre for Ecology, Evolution and Conservation, School of Environmental Sciences, University of East Anglia, Norwich NR4 7TJ, UK, Blackwell Publishing Ltd, 133 - 136.

Hugenholtz, P., Goebel, B. & Pace, N. 1998. Impact of Culture-Independent Studies on the Emerging Phylogenetic View of Bacterial Diversity. *J Bacteriol.* 198 September 180(18), 4765-4774.

Muyzer, G. 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 1999, 2:317-322.

Piiparinen, H. & Lappalainen, M. 2001. Geenimonistusmenetelmät tänään. *Solubiologi* 19, 27-35.

Scragg, A. 2005. *Environmental biotechnology*. New York: Oxford.

Sigler, V. 2004. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). Department of Environmental Sciences, University of Toledo [viitattu 25.10.2008]. Saatavissa: <http://www.eescience.utoledo.edu/Faculty/Sigler/RESEARCH/Protocols/DGGE/DGGE.pdf> .

Sillanpää, P. 2007. Öljyhiilivedyillä saastuneen maan puhdistaminen puiden avulla. Suomen ympäristö 2/2007. Pirkanmaan ympäristökeskus [viitattu 17.5.2009]. Saatavissa: <http://www.ymparisto.fi/download.asp?contentid=64453&lan=FI>.

Sinkkonen, A. 2007. TELMI-hankekokonaisuuden esittely. Sinkkonen, A. [viitattu 12.2.09]. Saatavissa: <http://www.helsinki.fi/ecology/homepage/akisinkkonen/telmi.htm>.

Suominen, I. & Ollikka, P. 1994. Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet. Vantaa: Tummavuoren kirjapaino Oy.

LIITTEET

LIITE 1 Työversio geelikuvan DGGE1 analysoitavista näytteistä.

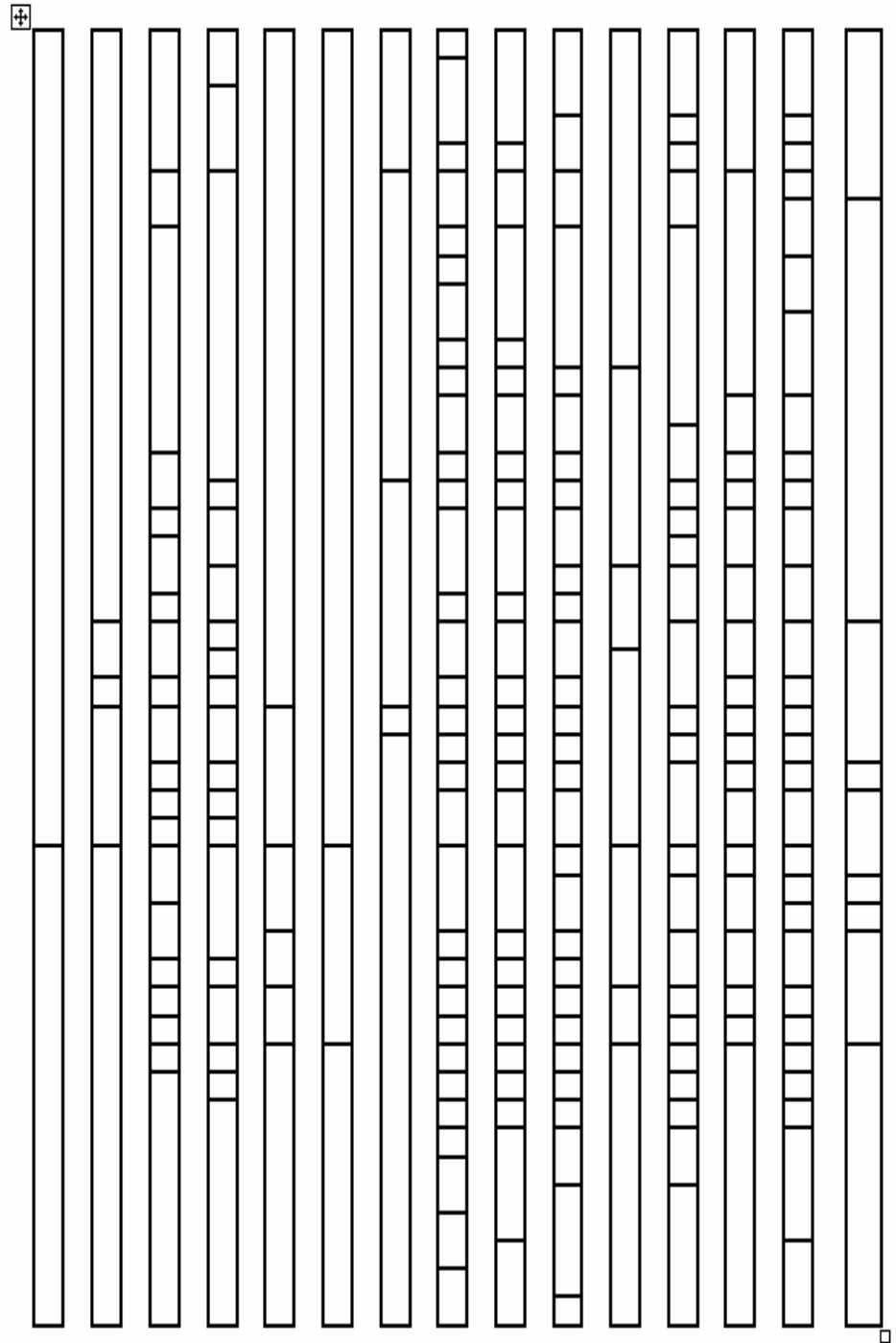
LIITE 2 Työversio geelikuvan DGGE2 analysoitavista näytteistä.

LIITE 3 Työversio geelikuvan DGGE3 analysoitavista näytteistä.

LIITE 4 Työversio geelikuvan DGGE4 analysoitavista näytteistä.

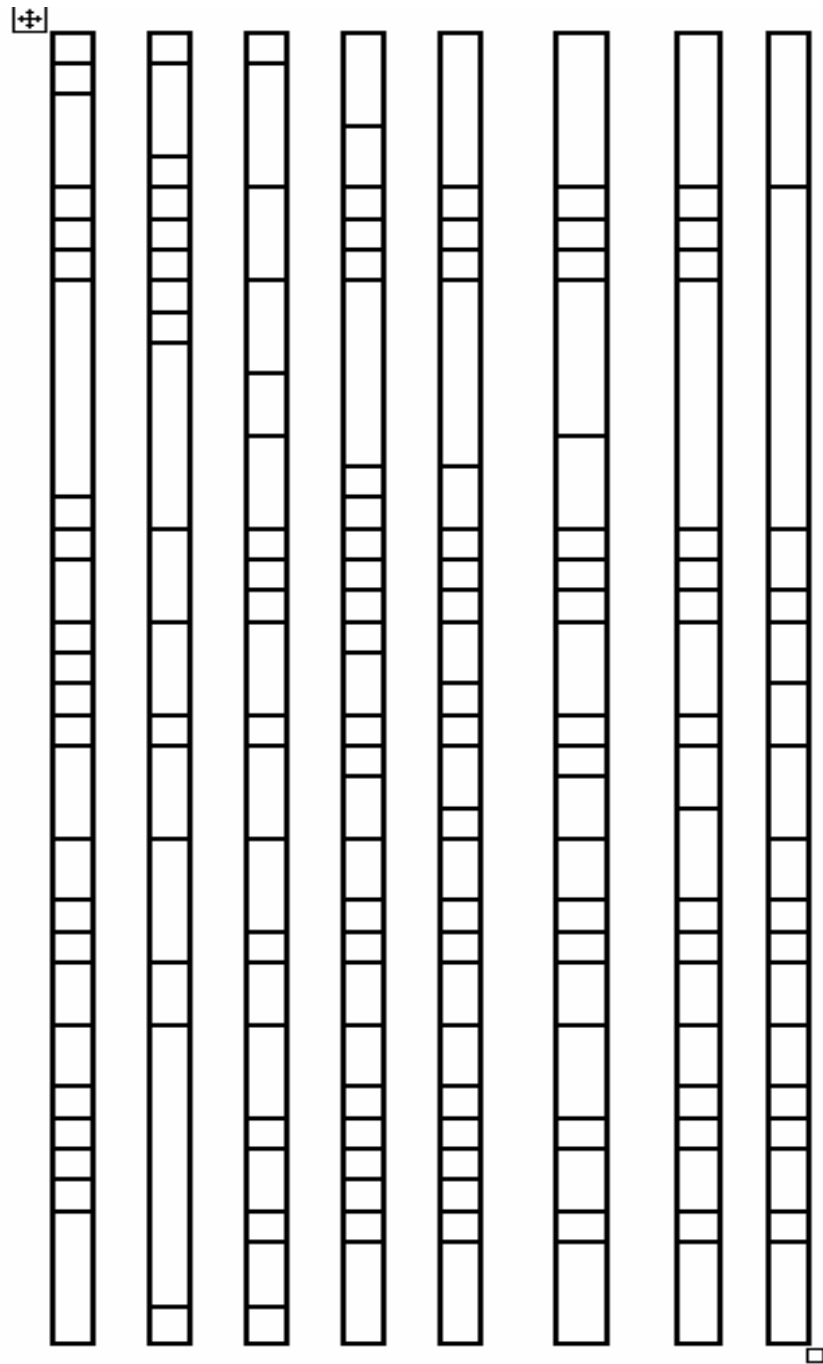
LIITE 5 MO BIO Kitin käyttöohje.

Liite 1



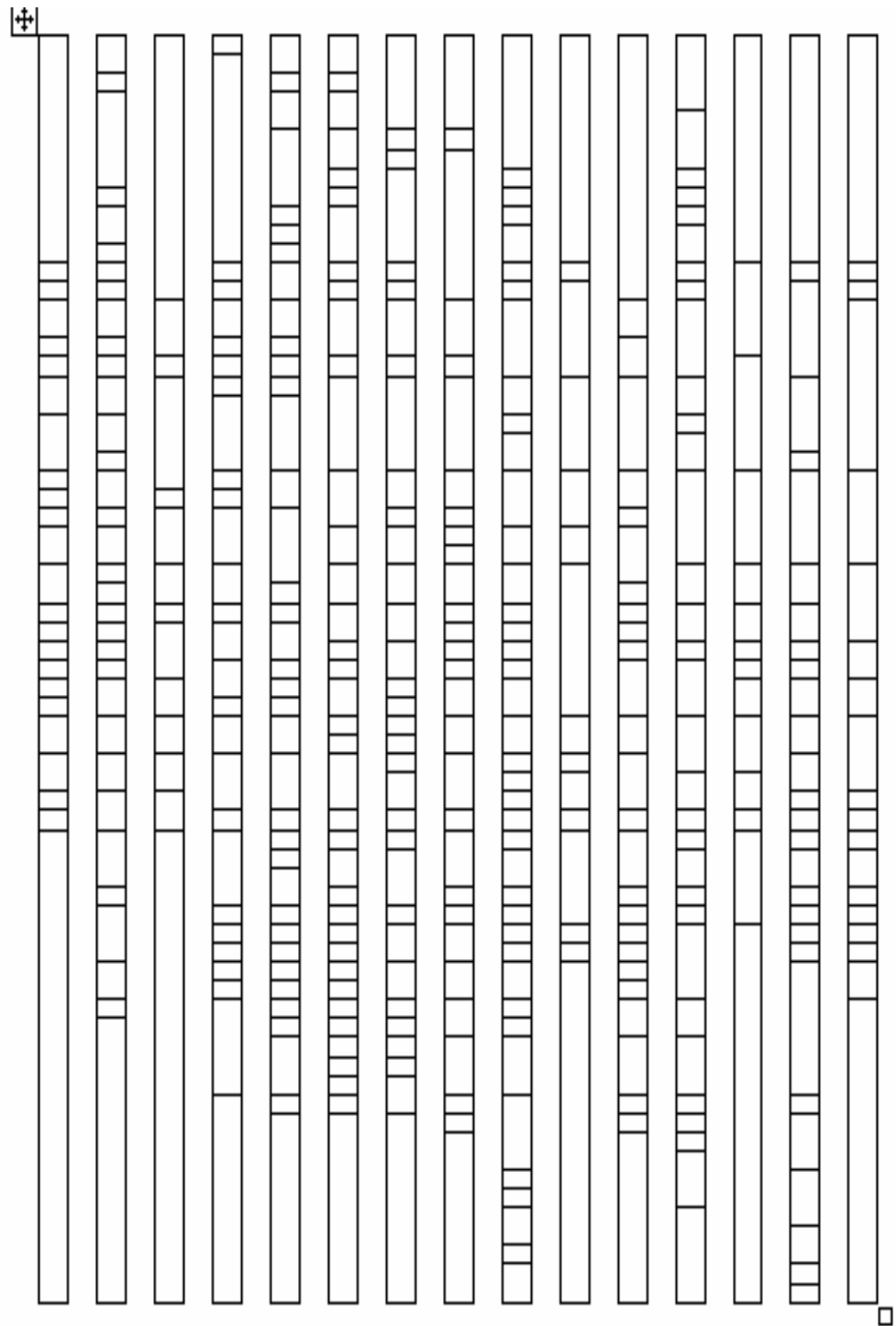
näyte	P1A	P7A	P18	P38	R1A	R3A	R7A	R18	R38	R78	R4A	R8A	R28	R48	R88
DGGE	29.5	29.5	29.5	29.5	29.5	29.5	29.5	29.5	29.5	29.5	29.5	29.5	29.5	29.5	29.5
lkm	2	4	20	17	5	2	4	30	25	28	6	23	18	28	8
PCR	13.5	9.5	28.4	5.5 II	9.5	9.5	9.5	30.4	5.5	28.4	9.5	5.5	30.4	5.5 II	5.5 I

Liite 2



näyte	P1A	P3A	P7A	P18	P38	P78	P2A	P4A
DCGR	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7
lkm	24	16	20	26	24	21	20	16
PCR	30.6	4.6	30.6	30.6	23.6	30.6	30.6	30.6


Liite 3



kuva	P38	P3A	P28	P48	P38	R1A	R3A	R7A	R18	R38	R78	R2A	R4A	***	R48
****	3,7	3,7	3,7	3,7	3,7	3,7	3,7	3,7	3,7	3,7	3,7	3,7	3,7	3,7	3,7
lkm	23	32	13	25	34	35	31	26	38	13	25	31	13	25	17
vm	23.6	30.6	5.4	19.5	5.5 II	2.7	2.7	2.7	2.7	5.5 II	2.7	2.7	2.7	2.7	5.5 II

Liite 4

mÄyri	P2A	P2B	P2A	P2B
DOGE	11,7	11,7	11,7	11,7
Ikem	13	30	25	30
PCR	8,7	8,7	9,7	9,7



Experienced User Protocol
Please wear gloves at all times

PowerSoil™ DNA Isolation Kit

Catalog No.	Quantity
12888-50	50 Preps
12888-100	100 Preps

Instruction Manual

Introduction

The PowerSoil™ DNA Isolation Kit* is comprised of a novel and proprietary method for isolating genomic DNA from environmental samples. The kit is intended for use with environmental samples containing a high humic acid content including difficult soil types such as compost, sediment, and manure. Other more common soil types have also been used successfully with this kit. The isolated DNA has a high level of purity allowing for more successful PCR amplification of organisms from the sample. PCR analysis has been performed to detect a variety of organisms including bacteria (e.g. *Bacillus subtilis*, *Bacillus anthracis*), fungi (e.g. yeasts, molds), algae and Actinomycetes (e.g. *Streptomyces*).

The PowerSoil™ DNA Isolation Kit distinguishes itself from MO BIO's UltraClean™ Soil DNA Isolation Kit with a **NEW** humic substance/brown color removal procedure. This new procedure is effective at removing PCR inhibitors from even the most difficult soil types.

Environmental samples are added to a bead beating tube for rapid and thorough homogenization. Cell lysis occurs by mechanical and chemical methods. Total genomic DNA is captured on a silica membrane in a spin column format. DNA is then washed and eluted from the membrane. DNA is then ready for PCR analysis and other downstream applications.

This kit is for research purposes only. Not for diagnostic use.

***PATENT PENDING**



Required Equipment:

Microcentrifuge (10,000 x g)
 Pipettors (50 μ l - 500 μ l)
 Vortex
 Vortex Adapter (MO BIO Catalog # 13000-V1)

Kit Contents

Component	Kit Catalog # 12888-50		Kit Catalog # 12888-100	
	Catalog #	Amount	Catalog #	Amount
PowerBead Tubes (contain 750 μ l solution)	12888-50-PBT	50	12888-100-PBT	100
PowerSoil Solution C1	12888-50-1	3.3 ml	12888-100-1	6.6 ml
PowerSoil Solution C2	12888-50-2	14 ml	12888-100-2	28 ml
PowerSoil Solution C3	12888-50-3	11 ml	12888-100-3	22 ml
PowerSoil Solution C4	12888-50-4	72 ml	12888-100-4	144 ml
PowerSoil Solution C5	12888-50-5	30 ml	12888-100-5	2 x 30 ml
PowerSoil Solution C6	12888-50-6	6 ml	12888-100-6	12 ml
PowerSoil Spin Filters (units in 2 ml tubes)	12888-50-SF	50	12888-100-SF	100
PowerSoil 2 ml Collection Tubes	12888-50-T	200	12888-100-T	400

Kit Storage

Kit reagents and components should be stored at room temperature (15-30°C).

Precautions

Please wear gloves when using this product. Avoid all skin contact with kit reagents. In case of contact, wash thoroughly with water. Do not ingest. See Material Safety Data Sheets for emergency procedures in case of accidental ingestion or contact. All MSDS information is available upon request (760-929-9911) or at www.mobio.com. Reagents labeled flammable should be kept away from open flames and sparks.

WARNING: Solution C5 contains ethanol. It is flammable.

IMPORTANT NOTE FOR USE: Make sure the 2 ml PowerBead Tubes rotate freely in your centrifuge without rubbing.

Technical Information: Toll free 1-800-606-6246, or 1-760-929-9911 Email: technical@mobio.com



Experienced User Protocol

Please wear gloves at all times

1. To the PowerBead Tubes provided, add 0.25 gm of soil sample.
2. Gently vortex to mix.
3. **Check Solution C1.** If Solution C1 is precipitated, heat solution to 60°C until dissolved before use.
4. Add 60µl of Solution C1 and invert several times or vortex briefly.
5. Secure PowerBead Tubes horizontally using the MO BIO Vortex Adapter tube holder for the vortex (MO BIO Catalog No. 13000-V1) or secure tubes horizontally on a flat-bed vortex pad with tape. Vortex at maximum speed for 10 minutes.
6. Make sure the PowerBead Tubes rotate freely in your centrifuge without rubbing. Centrifuge tubes at 10,000 x g for 30 seconds at room temperature. **CAUTION:** Be sure not to exceed 10,000 x g or tubes may break.
7. Transfer the supernatant to a clean 2 ml Collection Tube (provided).
Note: Expect between 400 to 500µl of supernatant. Supernatant may still contain some soil particles.
8. Add 250µl of Solution C2 and vortex for 5 seconds. Incubate at 4°C for 5 minutes.
9. Centrifuge the tubes at room temperature for 1 minute at 10,000 x g.
10. Avoiding the pellet, transfer up to, but no more than, 600µl of supernatant to a clean 2 ml Collection Tube (provided).
11. Add 200µl of Solution C3 and vortex briefly. Incubate at 4°C for 5 minutes.
12. Centrifuge the tubes at room temperature for 1 minute at 10,000 x g.
13. Avoiding the pellet, transfer up to, but no more than, 750µl of supernatant into a clean 2 ml Collection Tube (provided).
14. Add 1200µl of Solution C4 to the supernatant and vortex for 5 seconds.
15. Load approximately 675µl onto a Spin Filter and centrifuge at 10,000 x g for 1 minute at room temperature. Discard the flow through and add an additional 675µl of supernatant to the Spin Filter and centrifuge at 10,000 x g for 1 minute at room temperature. Load the remaining supernatant onto the Spin Filter and centrifuge at 10,000 x g for 1 minute at room temperature. **Note:** A total of three loads for each sample processed are required.
16. Add 500µl of Solution C5 and centrifuge at room temperature for 30 seconds at 10,000 x g.
17. Discard the flow through.
18. Centrifuge again at room temperature for 1 minute at 10,000 x g.
19. Carefully place Spin Filter in a clean 2 ml Collection Tube (provided). **Avoid splashing any Solution C5 onto the Spin Filter.**
20. Add 100µl of Solution C6 to the center of the white filter membrane. Alternatively, sterile DNA-Free PCR Grade Water may be used for elution from the silica Spin Filter membrane at this step (MO BIO Catalog No. 17000-10).
21. Centrifuge at room temperature for 30 seconds at 10,000 x g.
22. Discard the Spin Filter. The DNA in the tube is now ready for any downstream application. No further steps are required.

We recommend storing DNA frozen (-20° to -80°C). Solution C6 contains no EDTA. To concentrate the DNA see the Additional Information Section.

Thank you for choosing the PowerSoil™ DNA Isolation Kit.

Technical Information: Toll free 1-800-606-6246, or 1-760-929-9911 Email: technical@mobio.com



Detailed Protocol

Please wear gloves at all times

1. To the PowerBead Tubes provided, add 0.25 gm of soil sample.

After your sample has been loaded into the PowerBead Tube, the next step is a homogenization and lysis procedure. The PowerBead Tube contains a buffer that will (a) help disperse the soil particles, (b) begin to dissolve humic acids and (c) protect nucleic acids from degradation.

2. Gently vortex to mix.

Gentle vortexing mixes the components in the PowerBead Tube and begins to disperse the sample in the PowerBead Solution.

3. **Check Solution C1.** If Solution C1 is precipitated, heat solution to 60°C until the precipitate has dissolved before use.

Solution C1 contains SDS and other disruption agents required for complete cell lysis. In addition to aiding in cell lysis, SDS is an anionic detergent that breaks down fatty acids and lipids associated with the cell membrane of several organisms. If it gets cold, it will form a white precipitate in the bottle. Heating to 60°C will dissolve the SDS and will not harm the SDS or the other disruption agents. Solution C1 can be used while it is still warm.

4. Add 60µl of Solution C1 and invert several times or vortex briefly.

5. Secure PowerBead Tubes horizontally using the MO BIO Vortex Adapter tube holder for the vortex (MO BIO Catalog No. 13000-V1) or secure tubes horizontally on a flat-bed vortex pad with tape. Vortex at maximum speed for 10 minutes.

Note: *The vortexing step is critical for complete homogenization and cell lysis. Cells are lysed by a combination of chemical agents from steps 1-4 and mechanical shaking introduced at this step. By randomly shaking the beads in the presence of disruption agents, collision of the beads with microbial cells will cause the cells to break open.*

The MO BIO Vortex Adapter is designed to be a simple platform to facilitate keeping the tubes tightly attached to the vortex. It should be noted that although you can attach tubes with tape, often the tape becomes loose and not all tubes will shake evenly or efficiently. This may lead to inconsistent results or lower yields. Therefore, the use of the MO BIO Vortex Adapter is a highly recommended and cost effective way to obtain maximum DNA yields.

6. Make sure the PowerBead Tubes rotate freely in your centrifuge without rubbing. Centrifuge tubes at 10,000 x g for 30 seconds at room temperature. **CAUTION:** Be sure not to exceed 10,000 x g or tubes may break.

7. Transfer the supernatant to a clean 2 ml Collection Tube (provided).

Note: *Expect between 400 to 500µl of supernatant at this step. The exact recovered volume depends on the absorbancy of your starting material and is not critical for the procedure to be effective. The supernatant may be dark in appearance and still contain some soil particles. The presence of carry over soil or a dark color in the mixture is expected in many soil types at this step. Subsequent steps in the protocol will remove both carry over soil and coloration of the mixture.*

Technical Information: Toll free 1-800-606-6246, or 1-760-929-9911 Email: technical@mobio.com



Additional information

8. Add 250 μ l of Solution C2 and vortex for 5 seconds. Incubate at 4°C for 5 minutes.

Solution C2 contains a reagent to precipitate non-DNA organic and inorganic material including humic substances, cell debris, and proteins. It is important to remove contaminating organic and inorganic matter that may reduce DNA purity and inhibit downstream DNA applications.

9. Centrifuge the tubes at room temperature for 1 minute at 10,000 x g.

10. Avoiding the pellet, transfer up to 600 μ l of supernatant to a clean 2 ml Collection Tube (provided).

The pellet at this point contains non-DNA organic and inorganic material including humic acid, cell debris, and proteins. For the best DNA yields, and quality, avoid transferring any of the pellet.

11. Add 200 μ l of Solution C3 and vortex briefly. Incubate at 4°C for 5 minutes.

Solution C3 is a second reagent to precipitate additional non-DNA organic and inorganic material including humic acid, cell debris, and proteins. It is important to remove contaminating organic and inorganic matter that may reduce DNA purity and inhibit downstream DNA applications.

12. Centrifuge the tubes at room temperature for 1 minute at 10,000 x g.

13. Transfer up to 750 μ l of supernatant to a clean 2 ml Collection Tube (provided).

The pellet at this point contains additional non-DNA organic and inorganic material including humic acid, cell debris, and proteins. For the best DNA yields, and quality, avoid transferring any of the pellet.

14. Add 1.2ml of Solution C4 to the supernatant (be careful solution doesn't exceed rim of tube) and vortex for 5 seconds.

Solution C4 is a high concentration salt solution. Since DNA binds tightly to silica at high salt concentrations, this will adjust the DNA solution salt concentrations to allow binding of DNA, but not non-DNA organic and inorganic material that may still be present at low levels, to the Spin Filters.

15. Load approximately 675 μ l onto a Spin Filter and centrifuge at 10,000 x g for 1 minute at room temperature. Discard the flow through and add an additional 675 μ l of supernatant to the Spin Filter and centrifuge at 10,000 x g for 1 minute at room temperature. Load the remaining supernatant onto the Spin Filter and centrifuge at 10,000 x g for 1 minute at room temperature. **Note:** A total of three loads for each sample processed are required.

DNA is selectively bound to the silica membrane in the Spin Filter device in the high salt solution. Contaminants pass through the filter membrane, leaving only DNA bound to the membrane.

16. Add 500 μ l of Solution C5 and centrifuge at room temperature for 30 seconds at 10,000 x g.

Solution C5 is an ethanol based wash solution used to further clean the DNA that is bound to the silica filter membrane in the Spin Filter. This wash solution removes residual salt, humic acid, and other contaminants while allowing the DNA to stay bound to the silica membrane.

Technical Information: Toll free 1-800-606-6246, or 1-760-929-9911 Email: technical@mobio.com



17. Discard the flow through from the 2 ml Collection tube.

This flow through fraction is just non-DNA organic and inorganic waste removed from the silica Spin Filter membrane by the ethanol wash solution.

18. Centrifuge at room temperature for 1 minute at 10,000 x g.

This second spin removes residual Solution C5 (ethanol wash solution). It is critical to remove all traces of wash solution because the ethanol in Solution C5 can interfere with many downstream DNA applications such as PCR, restriction digests, and gel electrophoresis.

19. Carefully place Spin Filter in a clean 2 ml Collection Tube (provided). Avoid splashing any Solution C5 onto the Spin Filter.

Note: *It is important to avoid any traces of the ethanol based wash solution.*

20. Add 100 μ l of Solution C6 to the center of the white filter membrane.

Note: *Placing the Solution C6 (sterile elution buffer) in the center of the small white membrane will make sure the entire membrane is wetted. This will result in a more efficient and complete release of the DNA from the silica Spin Filter membrane. As Solution C6 (elution buffer) passes through the silica membrane, DNA that was bound in the presence of high salt is selectively released by Solution C6 (10 mM Tris) which lacks salt.*

Alternatively, sterile DNA-Free PCR Grade Water may be used for DNA elution from the silica Spin Filter membrane at this step (MO BIO Catalog No. 17000-10). Solution C6 contains no EDTA. If DNA degradation is a concern, Sterile TE may also be used instead of Solution C6 for elution of DNA from the Spin Filter.

21. Centrifuge at room temperature for 30 seconds at 10,000 x g.

22. Discard the Spin Filter. The DNA in the tube is now ready for any downstream application. No further steps are required.

We recommend storing DNA frozen (-20° to -80°C). Solution C6 does not contain any EDTA. To concentrate DNA see the Additional Information Section.

Thank you for choosing the PowerSoil™ DNA Isolation Kit.

Technical Information: Toll free 1-800-606-6246, or 1-760-929-9911 Email: technical@mobio.com



Additional Information

Amount of Soil to Process

This kit is designed to process 0.25 g of soil. For inquiries regarding the use of larger sample amounts, please contact technical support for suggestions. For wet soils, see information under "Wet Soil Sample" below.

Wet Soil Sample

If soil sample is high in water content, remove contents from PowerBead Tube (beads and solution) and transfer into another sterile microcentrifuge tube (not provided). Add soil sample to PowerBead Tube and centrifuge at room temperature for 30 seconds at 10,000 x g. Remove as much liquid as possible with a pipet tip. Add beads and bead solution back to PowerBead Tube and follow protocol starting at step 2.

If DNA Does Not Amplify

- Make sure to check DNA yields by gel electrophoresis or spectrophotometer reading. An excess amount of DNA will inhibit a PCR reaction.
- Diluting the template DNA should not be necessary with DNA isolated with the PowerSoil DNA Isolation Kit; however, it should still be attempted.
- If DNA will still not amplify after trying the steps above, then PCR optimization (changing reaction conditions and primer choice) may be needed.

Eluted DNA Sample Is Brown

We have not observed any coloration in DNAs isolated using the PowerSoil DNA Isolation kit. If you observe coloration in your samples, please contact technical support for suggestions.

Alternative Lysis Methods

- After adding Solution C1, vortex 3-4 seconds, then heat to 70°C for 5 minutes. Vortex 3-4 seconds. Heat another 5 minutes. Vortex 3-4 seconds. This alternative procedure will reduce shearing but may also reduce yield.
- If cells are difficult to lyse, a 10 minute incubation at 70°C, after adding Solution C1, can be performed. Follow by continuing with protocol step 5.

Concentrating the DNA

The final volume of eluted DNA will be 100µl. The DNA may be concentrated by adding 4µl of 5M NaCl and inverting 3-5 times to mix. Centrifuge at 10,000 x g for 5 minutes at room temperature. Decant all liquid. Remove residual ethanol in a speed vac, dessicator, or air dry. Resuspend precipitated DNA in sterile water or sterile 10 mM Tris.

DNA Floats Out of Well When Loaded on a Gel

This usually occurs because residual Solution C5 remains in the final sample. Prevent this by being careful in step 19 not to transfer liquid onto the bottom of the spin filter basket. Ethanol precipitation (described in "Concentrating the DNA") is the best way to remove residual Solution C5.

Storing DNA

DNA is eluted in Solution C6 (10mM Tris) and must be stored at -20° to -80°C to prevent degradation. DNA can be eluted in TE without loss, but the EDTA may inhibit downstream reactions such as PCR and automated sequencing. DNA may also be eluted with sterile DNA-Free PCR Grade Water (MO BIO Catalog No. 17000-10).

Technical Information: Toll free 1-800-606-6246, or 1-760-929-9911 Email: technical@mobio.com

0.5, 1, 2



Other Quality Products Available from MO BIO Laboratories, Inc.

<u>Product Description</u>	<u>Catalog No.</u>
DNA Isolation Kits	
UltraClean™ Soil DNA Isolation Kit (50 preps)	12800-50
UltraClean™ Mega Soil DNA Isolation Kit (10 preps)	12900-10
UltraClean-htp™ 96 Well Soil DNA Isolation Kit (4 x 96 preps)	12896-4
UltraClean™ Fecal DNA Isolation Kit (50 preps)	12811-50
UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit (50 preps)	12224-50
RNA Isolation Kits	
UltraClean™ Microbial RNA Isolation Kit (50 preps)	15800-50
DNA Purification Kits	
UltraClean™ 15 DNA Purification Kit (300 preps)	12100-300
UltraClean™ GelSpin™ DNA Extraction Kit (100 preps)	12400-100
UltraClean™ PCR Clean-Up Kit (100 preps)	12500-100

Contact Information

Phone MO BIO Laboratories, Inc. Toll Free 800-606-6246, or 760-929-9911

Email: technical@mobio.com

Fax: 760-929-0109

Mail: MO BIO Laboratories, Inc, 2746 Loker Ave West, Carlsbad, CA 92010

Ordering Information

Direct: Phone MO BIO Laboratories, Inc. Toll Free 800-606-6246, or 760-929-9911

Email: orders@mobio.com

Fax: 760-929-0109

Mail: MO BIO Laboratories, Inc, 2746 Loker Ave West, Carlsbad, CA 92010

For the distributor nearest you, visit our web site at www.mobio.com/distributors

Technical Information: Toll free 1-800-606-6246, or 1-760-929-9911 Email: technical@mobio.com