

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

К статье:

Кострюкова Е.С., Карпова И.Ю., Ларин А.К., Попенко А.С., Тяхт А.В., Ильина Е.Н.

Вариабельность относительного содержания геномной ДНК человека

при метагеномном анализе микробиоты кишечника

Биомедицинская химия, 2014, том: 60(6), 695-701

Метод 1. К навеске образца кала 150 мг добавляли кремниево-циркониевые бусины (“BioSpec Products”) диаметром 0,1 мм (300 мг) и 0,5 мм (100 мг), а затем 1200 мкл теплого лизирующего буфера (500 мМ NaCl, 50 мМ Трис-НСl, рН 8,0, 50м М ЭДТА, 4% SDS), перемешивали на вортексе до однородного состояния и гомогенизировали с помощью MiniBeadBeater (“BioSpec Products”, США) в течение 3 мин. Полученный лизат инкубировали при 70°C в течение 15 мин, после чего образцы центрифугировали 20 мин при 14000 об/мин с использованием центрифуги Mikro 22R (“Hettich Zentrifugen”). Надосадочную жидкость отбирали в новые пробирки и ставили в лёд. К осадку повторно добавляли лизирующий буфер и повторяли процесс гомогенизации. Надосадочные жидкости объединяли, добавляли 2 объема 96% этанола и 1/10 объема 3 М ацетата натрия. Инкубировали при -20°C не менее часа. После этого образцы центрифугировали при 14000 об/мин 20 мин. Сформировавшийся осадок дважды промывали 80% этанолом, сушили на воздухе и растворяли в деионизованной воде.

Метод 2. Тотальную ДНК выделяли с помощью набора Stool Mini Kit (“Qiagen”). К навеске образца 150 мг добавляли 1,4 мл раствора ASL (“Qiagen”), перемешивали до однородного состояния и добавляли 0,2 г кремниево-цирконеовых бусин (“BioSpec Products”) диаметром 0,1 мм. Образец гомогенизировали с использованием MiniBeadBeater (“BioSpec Products”) в течение 4 мин. Далее суспензию центрифугировали при 14000 об/мин 2 мин. Надосадочную жидкость отбирали в новую пробирку и использовали для выделения ДНК, согласно протоколу производителя со следующей модификацией: лизис проводили при 95°C.

Метод 3. Навеску образца кала 125 мг ресуспендировали в 125 мкл раствора 4М гуанидинизотиоцианата (рН 7,4) и 18,75 мкл 10%-ого раствора N-лаурил-саркозина. Затем добавляли 500 мкл 5% раствора N-лаурил-саркозина в 0,1 М фосфатном буфере рН 7,5. Инкубировали полученную смесь при 70°C в течение 1 часа. После этого добавляли 750 мкл кремне-циркониевых бусин диаметром 0,1 мм (“BioSpec Products”) и гомогенизировали с использованием BeadBeater (“BioSpec Products”) в течение 3 мин. Затем к лизату добавляли 15 мг сухого поливинилпиралидона (ПВП) и перемешивали на вортексе до однородного состояния. Далее суспензию центрифугировали при 12000 об/мин в течение 3 мин, надосадочную жидкость

переносили в новую пробирку и ставили в лед. Осадок трижды промывали, ресуспендируя в 500 мкл буфера (50 мМ Трис (pH 8,0); 20 мМ ЭДТА (pH 8,0); 100 мМ NaCl; 1% ПВП) и центрифугируя 3 мин при 12000 об/мин. К объединенным супернатантам добавляли равный объем изопропанола и инкубировали смесь при -20°C не менее часа. После этого образец центрифугировали при 20000 об/мин 15 мин, полученный осадок ресуспендировали в 450 мкл фосфатного буфера (20 мМ Na₂HPO₄, 150 мМ NaCl, pH 7,5), добавляли 50 мкл 5 М раствора ацетата калия и выдерживали в течение 90 мин во льду и центрифугировали при 16000 об/мин 30 мин. Надосадочную жидкость переносили в новую пробирку, добавляли 4 мкл РНКазы (5 мг/мл) и инкубировали при 37°C 30 мин. После этого добавляли 50 мкл 3 М раствора ацетата натрия и 1 мл 96% этанола и инкубировали не менее часа при -20°C. После этого образцы центрифугировали при 12000 об/мин 15 мин. Сформированный осадок дважды промывали 70% этанолом, сушили на воздухе и растворяли в 400 мкл ТЕ-буфера (10 мМ Трис-HCl; 1 мМ ЭДТА (pH 8,0)).

Метод 4. Навеску образца кала 500 мг ресуспендировали в 500 мкл буфера (200 мМ Трис (pH 8,0); 200 мМ NaCl; 20 мМ ЭДТА), 210 мкл 20% раствора SDS, 500 мкл смеси фенол:хлороформ (1:1, pH 7,9) и 500 мкг кремниево-цирконевого бусина ("BioSpec Products") диаметром 0,1 мм и подвергали механической гомогенизации с использованием BeadBeater ("BioSpec Products") в течение 2 мин. Далее образец центрифугировали при 20000 об/мин 15 мин, к надосадочной жидкости добавляли равный объем смеси фенол : хлороформ (1:1, pH 7,9), тщательно перемешивали и центрифугировали 10 мин при 20000 об/мин. Водную фазу переносили в новую пробирку, добавляли равный объем изопропанола и инкубировали при -20 °C не менее часа. Затем образец центрифугировали при 20000 об/мин 20 мин. Сформированный осадок дважды промывали 70% этанолом, сушили на воздухе и растворяли в 200 мкл ТЕ-буфера.

Метод 5. Навеску образца кала 500 мг тщательно ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере (8 мМ Na₂HPO₄; 137 мМ NaCl; 2,7 мМ KCl; 1,5 мМ KH₂PO₄). Суспензию центрифугировали со скоростью 500 об/мин 10 мин при 4°C, надосадочную жидкость переносили в новую пробирку и центрифугировали при 5000 об/мин 10 мин при 4°C. Осадок ресуспендировали в 5 мл ТЕ-буфера, добавляли 1,5 мг сухого лизоцима и инкубировали при 37°C в течение 1 часа с постоянным перемешиванием. После этого к образцу добавляли 2 мг протеиназы К и инкубировали при 55°C 5 мин. Затем добавляли 600 мкл 10% раствора SDS и инкубировали при 55°C 1 час. Далее к образцу добавляли равный объем смеси фенол : хлороформ (1:1, pH 7,9), тщательно вортировали и центрифугировали при 20000 об/мин 15 мин. Водную фазу переносили в чистую пробирку, добавляли 1/10 объема 3 М раствора ацетата натрия и два объема 96% этанола и инкубировали при -20 °C не менее часа. После этого центрифугировали при 20000 об/мин 20 мин. Сформированный осадок дважды промывали 70% этанолом, сушили на воздухе и растворяли в 200 мкл ТЕ-буфера.

Метод 6. Навеску кала 500 мг суспендировали в 5 мл фосфатного буфера (20 мМ Na_2HPO_4 , 150 мМ NaCl , рН 7,5) и перемешивали на вортексе 5 мин, периодически охлаждая во льду. Суспензию центрифугировали 10 минут при 200 об/мин при 4°C, супернатант сохраняли во льду, осадок повторно суспендировали в 5 мл фосфатного буфера. Процедуру повторяли 4 раза. Объединенный супернатант центрифугировали 20 минут при 13500 об/мин при 4°C, супернатант отбрасывали. Далее осадки объединяли, ресуспендировали в 1 мл фосфатного буфера с 0,1% твин-20 и перемешивали на вортексе 2 минуты, периодически охлаждая во льду. Суспензию центрифугировали 20 минут при 13500 об/мин при 4°C, супернатант сохраняли во льду, осадок повторно суспендировали в 1 мл фосфатного буфера с 0,1% твин-20. Процедуру повторяли до тех пор, пока супернатант не становился бесцветным. Из полученного осадка далее выделяли ДНК согласно методу 1.

Метод 7. К навеске образца кала 150 мг добавляли 1,5 мл ресуспендирующего буфера ТЕ (10 мМ Трис рН 8,2; 100 мМ ЭДТА). Перемешивали на вортексе до гомогенного состояния и центрифугировали 10 мин при 500 об/мин при +10°C, что позволяло очистить взвесь клеток от грубых примесей. Надосадочную жидкость отбирали в чистую пробирку и сохраняли во льду. К осадку добавляли такой же объем ресуспендирующего буфера ТЕ и повторяли процедуру отмывки ещё раз, отбирая надосадочную жидкость в новую пробирку. После этого обе пробирки с надосадочными жидкостями центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин при +10°C для высаживания клеточной фракции. Супернатант собирали в чистые пробирки, из образовавшихся осадков выделяли тотальную ДНК с использованием метода 1.

К супернатанту добавляли 1/10 объема 3 М раствора ацетата натрия и 2 объема этанола. Смесь инкубировали при -20°C не менее часа, а затем центрифугировали при 20000 об/мин 20 мин. Сформированный осадок дважды промывали 70% этанолом, сушили на воздухе и растворяли в деионизированной воде.