

Syngen Blood/Cell DNA Mini Kit

Zestaw do izolacji całkowitego DNA z próbek:

- świeżej lub mrożonej krwi
- kożuszka leukocyтарnego
- hodowli komórkowych
- surowicy
- osocza
- wymazówek

Instrukcja dla użytkownika, w. 2018.01

Spis treści

Informacje wstępne	3
Ograniczenia	3
Zawartość zestawów	4
Przechowywanie	4
Sprzęt i odczynniki potrzebne do wykonania procedury, a niedostarczone z zestawem	5
Przygotowanie odczynników przed pierwszym użyciem	6
Materiał wyjściowy i wydajność DNA	7
Ogólne wytyczne dotyczące obsługi zestawów Syngen	9
Elucja DNA	10
Protokoły	
Protokół 1: Izolacja DNA ze świeżej krwi, surowicy, osocza, kożuszka leukocyтарnego	12
Protokół 2: Izolacja DNA z hodowli komórkowych	15
Protokół 3: Izolacja DNA z wymazówek	19
Protokół 4: Izolacja DNA z mrożonej krwi	22
Protokół 5: Izolacja DNA z krwi zwierząt	25
Samodzielne rozwiązywanie problemów	26
Protokoły skrócone	
Protokół 1: krew, osocza, kożuszek	29
Protokół 2: komórki	30
Protokół 3: wymazówki	31

Dziękujemy za wybór zestawu serii Syngen DNA i okazane nam zaufanie. Produkty serii Syngen DNA to wysokiej jakości zestawy odczynników do izolacji całkowitego DNA z szerokiej gamy próbek takich jak tkanki, komórki, krew, płyny ustrojowe i inne. Zastosowana technologia wykorzystuje technikę chromatografii na złożu krzemionkowym zamkniętym w membranie kolumnienki. Uzyskany DNA odznacza się wysoką czystością, wymaganą do zastosowań między innymi w technikach real-time PCR i microarray.

Niniejsza instrukcja dla użytkownika zawiera szczegółowe wytyczne dotyczące stosowania zestawu Syngen Blood/Cell DNA Mini. Rozdziały wstępne pomogą użytkownikowi przygotować się do wykonania procedur opisanych w dalszych rozdziałach. Zalecamy uważne przeczytanie całej instrukcji przed przystąpieniem do pracy.

Przy użyciu produktu powinna być zachowana uwaga i ostrożność. Zalecamy użytkownikom stosowanie się do zasad GLP (Dobrej Praktyki Laboratoryjnej), a także do zasad prowadzenia eksperymentów z rekombinowanym DNA. Między innymi należy stosować fartuch laboratoryjny, rękawiczki jednorazowe i okulary ochronne.

Aby uzyskać więcej informacji o substancjach niebezpiecznych, które mogą być zawarte w niektórych składnikach zestawów, prosimy przeczytać Karty Charakterystyki Substancji Niebezpiecznych (MSDS) dostępne u producenta.

W przypadku pytań, pozostajemy do Państwa dyspozycji. Życzymy sukcesów w pracy z zestawami Syngen.

Zespół Syngen Biotech

Ograniczenia

Zestawy serii Syngen DNA są przeznaczone wyłącznie do użytku laboratoryjnego. Nie będą uwzględniane żadne roszczenia wynikające z użycia zestawu do diagnozowania lub leczenia chorób.

Zawartość zestawu

Syngen Blood/Cell DNA Mini Kit	SY221010	SY221011	SY221012
Liczba izolacji	50	100	300
Kolumnienki DK	50	100	300
Probówki do elucji 1,5 ml	50	100	300
Proteinaza K – liofilizat	11 mg	2 x 11 mg	6 x 11 mg
Bufor lizujący komórki DLK	15 ml	30 ml	70 ml
Bufor płuczający DP1 – koncentrat	22 ml	44 ml	124 ml
Bufor płuczający DP2 – koncentrat	10 ml	20 ml	50 ml
Bufor elucyjny DE	15 ml	30 ml	90 ml
Probówki do płukania 2 ml	100	200	600

Przechowywanie

Kolumnienki DK, a także wszystkie roztwory poza rozpuszczoną proteinazą K, powinny być przechowywane w temperaturze pokojowej (15-25°C), chyba że na butelce określono inaczej.

Przechowywanie kolumnienek DK w wyższej temperaturze jest zabronione.

Proteinaza K po rozpuszczeniu powinna być przechowywana w 4°C.

Sprzęt i odczynniki potrzebne do wykonania procedury, a niedostarczone z zestawem

Do wszystkich protokołów:

- Etanol (96-100%)
- Probówki 1.5 ml (eppendorfki)
- Statyw
- Sterylne końcówki do pipet (najlepiej z filtrem)
- Pipety automatyczne nastawne
- Mikrowirówka
- Worteks
- Łaźnia wodna, blok grzejny lub termomikser na 60°C
- PBS (w niektórych sytuacjach)
- RNaza 100 mg/ml (opcjonalnie)
- Nośnikowe DNA (opcjonalnie)

Do izolacji DNA z mrożonej krwi:

- Łaźnia wodna, blok grzejny lub termomikser na 70°C
- Dodatkowa ilość Proteinazy K

Do izolacji DNA z hodowli komórkowej:

- Trypsyna lub skrobak (do komórek rosnących w monowarstwie)
- Medium hodowlane
- PBS
- Przyrządy do liczenia komórek

Do izolacji DNA z wymazówek:

- PBS
- Dodatkowa porcja buforu DLK
- Probówki 2 ml
- Nożyczki lub przecinak

Do izolacji DNA z krwi zwierząt:

- PBS

Przygotowanie odczynników przed pierwszym użyciem

Bufory płuczące

Bufory płuczące DP1 i DP2 są dostarczane jako koncentraty. Przed pierwszym użyciem dodaj do nich odpowiednią ilość etanolu (96-100%) i starannie wymieszaj. Poniższa tabela przedstawia sposób przygotowania buforów płuczących.

Syngen Blood/Cell DNA Mini	SY221010	SY221011	SY221012
Liczba próbek	50	100	300
Objętość etanolu, jaką należy dodać do koncentratu buforu płuczającego DP1	8 ml	16 ml	45 ml
Objętość etanolu, jaką należy dodać do koncentratu buforu płuczającego DP2	40 ml	80 ml	200 ml

Bufory DP1 i DP2 po dodaniu etanolu powinny być szczelnie zamknięte i przechowywane w temperaturze pokojowej. Przed rozpoczęciem procedury zawsze wymieszaj rozpuszczone bufory przez obrócenie butelki kilka razy.

Proteinaza K

Proteinaza K jest dostarczana w postaci liofilizowanej. Aby przygotować porcję roztworu roboczego 10 mg/ml, probówkę zawierającą 11 mg liofilizatu proteinyzy K należy krótko zwirować, dodać 1,1 ml wody destylowanej (czystości do PCR), zamknąć i dokładnie wymieszać, aż do całkowitego rozpuszczenia. Po rozpuszczeniu roztwór roboczy proteinyzy K należy przechowywać w temperaturze 4°C.

Nośnikowe DNA

Gdy dysponujemy bardzo małą ilością materiału wyjściowego i spodziewana ilość DNA po izolacji jest bardzo mała (poniżej 10.000

kopii genomu), zaleca się zastosowanie nośnikowego DNA (np. poli-dA, poli-dT, poli-dA:dT), które poprawia wiązanie izolowanego materiału do złoża w kolumnie. Nośnikowe DNA dodaje się do buforu DLK użytego do lizy. Typowa ilość to 1 ul roztworu zawierającego 5-10 ug nośnikowego DNA na 200 ul buforu DLK.

Materiał wyjściowy i wydajność DNA

Zestaw Syngen Blood/Cell DNA Mini Kit służy do izolacji całkowitego DNA z szerokiej gamy próbek, takich jak świeża i mrożona krew, osocze, surowica, kożuszek leukocytny, hodowle komórkowe, czy wymazówki. Poza DNA genomowym, izolat zawiera także frakcję mitochondrialną, jak również wirusowy DNA. Wyizolowaniu ulegają fragmenty o długości do 50.000 pz, z przewagą fragmentów długości 20.000-30.000 pz.

Wyizolowany DNA ma wysoki stopień czystości, dzięki czemu może być użyty bezpośrednio do dalszych analiz, jak reakcje enzymatyczne z detekcją w czasie rzeczywistym, mikromacierze i inne procedury wymagające DNA wysokiej jakości.

Prawidłowe dobranie ilości materiału wyjściowego jest kluczem do wydajnej izolacji. Poniższa tabela określa zalecane maksymalne ilości poszczególnych rodzajów próbek oraz typowe wydajności DNA.

Materiał wyjściowy	Maksymalna ilość na 1 izolację	Typowa wydajność DNA
Krew świeża (z antykoagulantem)	200 ul	5 ug (4-12 ug)
Krew mrożona	200 ul	5 ug (4-12 ug)
Kożuszek leukocytny	200 ul	25-50 ug
Surowica	200 ul	n/a
Osocze	200 ul	n/a
Komórki	5 x 10 ⁶ w 200 ul PBS	20-40 ug

Próbki o objętości mniejszej niż 200 ul powinny zostać dopełnione przy użyciu PBS do objętości 200 ul.

Próbki rozcieńczone, których objętość jest większa niż zalecana w danym protokole, ale nie przekraczające maksymalnej ilości komórek jądrazystych na 1 izolację, można również wykorzystać w całości. W tym celu należy proporcjonalnie zwiększyć objętość pozostałych używanych buforów i reagentów we wszystkich krokach, aż do etapu nakładania na kolumnę (etap zaznaczony czarną strzałką). Nakładanie na kolumnę lizatów o większej objętości należy wykonać w kilku porcjach, usuwając przesącz i nakładając kolejną porcję, aż do przesączenia przez kolumnę całej próbki.

Próbki pełnej krwi podczas pobierania powinny zostać zabezpieczone przed koagulacją. W tym celu należy zastosować antykoagulant – EDTA lub cytrynian. Heparyna jest również dozwolona, jednak nie zalecamy jej stosowania, gdyż nawet śladowe jej ilości po przedostaniu się do eluatu mogą stać się inhibitorem reakcji PCR.

Kożuszek leukocyтарny to potoczna nazwa białego osadu powstającego na granicy osocza i komórek opadających w stojącej nieruchomo próbówce po pobraniu krwi. Frakcja ta jest bogata w WBC, głównie leukocyty. Zastosowanie do izolacji 200 ul kożuszka leukocyтарnego zamiast 200 ul pełnej krwi zwiększa około 10-krotnie wydajność izolacji DNA. Aby przygotować kożuszek leukocyтарny, 1-2 ml krwi pobranej na antykoagulant mieszamy z 5-krotnie większą objętością buforu RLE i inkubujemy przez 10 minut na lodzie mieszając co jakiś czas przez odwrócenie próbki. Następnie wirujemy z prędkością 3500-4500 x g przez 1-2 minuty w temperaturze pokojowej i usuwamy supernatant. Powstały biało-różowy osad WBC ma wystarczającą czystość do izolacji DNA. Zawieszamy go w 200 ul PBS i stosujemy jako próbkę.

Wymaz z błon śluzowych należy wykonać poprzez kilkukrotne stanowcze potarcie wymazówką powierzchni błony śluzowej, po uprzednim usunięciu śluzu. Zbyt słaby nacisk lub niewystarczająca ilość potarć może ograniczyć ilość komórek błony śluzowej, które pozostaną

na wymazówce, co znacznie zmniejszy wydajność izolacji. Przed zamknięciem wymazówki w probówce ochronnej, należy ją wysuszyć.

Komórki z hodowli przygotowuje się do izolacji poprzez zebranie i przemycie w PBS. Komórki rosnące w zawieszynie należy odwirować i zawiesić w PBS. Komórki rosnące w monowarstwie należy zebrać przy pomocy trypsyny lub zeszkrobać z powierzchni, odwirować i zawiesić w PBS. W każdym przypadku zalecamy dokładne określenie ilości komórek. Przygotowanie komórek do izolacji opisano szczegółowo w protokołach.

Ilość komórek rosnących w monowarstwie można określić na podstawie powierzchni hodowli. Należy przyjąć, że 1 cm² hodowli zawiera od 1x10⁵ do 1,5x10⁵ komórek.

Przy pomocy zestawu Syngen Blood/Cell DNA Mini można wykonać izolację DNA z krwi zwierzęcej, o ile zostanie ona odpowiednio rozcieńczona PBS'em. Krew o erytrocytach bezjądrzastych (większość ssaków) należy rozcieńczyć 4-krotnie (stosujemy 50 ul krwi z antykoagulantem + 150 ul PBS). Krew o erytrocytach jądrzastych (takich zwierząt jak ryby i ptaki) należy rozcieńczyć 10-20-krotnie (stosujemy 5-10 ul krwi z antykoagulantem + 190-195 ul PBS).

Ogólne wytyczne dotyczące obsługi zestawów Syngen DNA

Kolumienki Mini pasują do większości probówek wirówkowych o pojemności 1.5 ml lub 2 ml (tzw. eppendorfek).

Wszystkie wirowania wykonywane są z pełną prędkością (ok. 14.000 rpm lub 10.000 x g), aczkolwiek możliwe jest zastosowanie niższych prędkości (8000 rpm lub 6000 x g), gdy użytkownik nie posiada szybszej wirówki lub przeszkadza mu hałas – w takim przypadku należy proporcjonalnie wydłużyć wirowanie. Zaleca się jednak, aby przynajmniej wszystkie drugie płukania, kroki dosuszania membrany oraz elucja odbywały się przy najwyższych obrotach wirówki. Wszystkie wirowania

należy przeprowadzać w temperaturze pokojowej, chyba że w protokole zaznaczono inaczej.

Podczas obsługi zestawów Syngen zalecamy, aby ograniczać dotykanie membran w kolumnkach końcówką pipety, przed wirowaniem zamykać wieczka kolumnek i probówek, a z wirówki kolumnki wyjmować razem z probówkami – dopiero po ustawieniu w statywie można wyjąć kolumnkę z próbki. Ponadto, dla ograniczenia kontaminacji pomiędzy próbkami (cross-contamination), zalecamy aby utrzymywać w czystości rękawiczki ochronne, używać końcówek do pipet z filtrem i po każdym wortełkowaniu lub mieszaniu zwirowywać probówki, aby usunąć krople ze spodu wieczek.

Elucja DNA

Typowa objętość elucji na zimno (15-25°C) wynosi 200 ul i jest wystarczająca dla zdecydowanej większości próbek. Elucja na ciepło najczęściej wykonywana jest objętością 100 ul.

Elucję z kolumny można wykonywać dostarczonym buforem do elucji lub wodą destylowaną o pH=7.5-9.0. Woda o innym pH może znacznie ograniczyć wydajność elucji, lub nawet uniemożliwić ją.

Nie należy eluować DNA zimnym buforem lub wodą. W przypadku elucji na zimno bufor do elucji (lub woda) powinien być doprowadzony co najmniej do temperatury pokojowej (15-25°C). Elucję na ciepło wykonuje się buforem ogrzanym do temperatury 70°C.

Jeśli izolację wykonywano z materiału wyjątkowo bogatego w DNA (jak np. pełna porcja kożuszka leukocytnego) i użytkownikowi zależy na odzyskaniu całego DNA z kolumny, zalecamy drugą elucję do oddzielnej próbki przy pomocy drugiej porcji 200 ul. W niektórych przypadkach pierwsza elucja pozwala na uzyskanie tylko 60% DNA, druga – aż 40%. Drugim sposobem na odzyskanie większej ilości materiału z kolumny jest zastosowanie 100 ul buforu elucyjnego DE podgrzanego do 70°C i po

naniesieniu go na kolumnę, a przed wirowaniem elucyjnym – inkubacja kolumny z buforem przez 5-10 minut w 37°C (np. w ciepłarni hodowlanej). Dzięki temu więcej DNA związanego w kolumnie rozpuści się w buforze elucyjnym DE.

W przypadku próbek ubogich w DNA, aby zatężyć otrzymany materiał, zalecamy elucję mniejszą objętością. Dla próbek o zawartości DNA < 3 ug zalecamy zastosowanie objętości 100 ul na zimno lub 50 ul na ciepło, dla próbek o zawartości DNA < 1 ug, zalecamy objętość buforu do elucji 50 ul na zimno lub 30 ul na ciepło.

Objętość elucji za zimno powinna mieścić się w granicach od 50 do 200 ul. Objętość elucji na ciepło powinna mieścić się w granicach od 30 do 100 ul. Objętość eluatu uzyskanego w probówce może być mniejsza niż objętość Buforu do elucji (lub wody) naniesiona na kolumnę.

Do przypadku przechowywania wyizolowanego DNA do 4 tygodni, wystarczą warunki chłodnicze 2-8°C. Do długoterminowego przechowywania wyizolowanego DNA zalecamy temperaturę -20°C.

Protokół 1

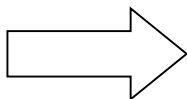
Izolacja DNA z próbek świeżej krwi, osocza, surowicy lub kożuszka leukocytarnego

Zanim zaczniesz

- Jeżeli pierwszy raz używasz zestawu Syngen DNA Mini Kit, najpierw przeczytaj wszystkie rozdziały poprzedzające protokoły.
- Upewnij się, że przygotowałeś wszystkie potrzebne odczynniki i sprzęty opisane w rozdziale „Sprzęt i odczynniki potrzebne do wykonania procedury, a niedostarczone z zestawem”.
- Upewnij się, że buforы płuczające i proteinaza K zostały przygotowane zgodnie z instrukcjami zawartymi w rozdziale „Przygotowanie odczynników przed pierwszym użyciem”.
- Jeżeli w którymś buforze wytrącił się precipitat, rozpuść go inkubując w 37°C przez kilka minut i mieszając.
- Doprowadź wszystkie buforы do temperatury pokojowej (15-25°C).
- Nastaw łaźnię wodną, blok grzewczy lub termomikser na 60°C.
- Doprowadź próbki do temperatury pokojowej (15-25°C) i dokładnie je wymieszaj.

Procedura

1. Do eppendorfki (nie dostarczono) dodaj 200 ul próbki (pełnej krwi z antykoagulantem, surowicy, osocza lub kożuszka leukocytarnego).



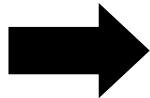
Próbki o objętości mniejszej niż 200 ul dopełnij przy użyciu PBS (nie dostarczono) i wymieszaj.

Jeśli wymagane jest DNA wolne od RNA, dodaj 4 ul roztworu RNazy A o stężeniu 100 mg/ml (nie dostarczono), wymieszaj i inkubuj 2 minuty w temperaturze pokojowej.

2. Dodaj 20 ul roztworu proteinazy K oraz 200 ul buforu DLK, zamknij i wymieszaj na wortexie. Upewnij się, że roztwory zmieszają się całkowicie i zawartość próbki jest homogenna. Inkubuj w 60°C przez 15 minut, mieszając na wortexie co 3-5 minut, aż do całkowitej lizy komórek. Zwiruj krótko próbki, aby usunąć krople z wieczka.

Nie wolno mieszać buforu DLK bezpośrednio z proteinazą K przed dodaniem do próbki.

3. Dodaj 200 μ l etanolu (96-100%), zamknij i zmieszaj na wortexie przez 30 sekund. Upewnij się, że roztwory zmieszały się całkowicie i zawartość próbówki jest homogenna.



4. Umieść kolumienkę w próbówce 2 ml do płukania. Wiruj krótko próbówki z lizatem, aby usunąć krople z wieczka. Przenieś lizat na kolumienkę. Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością.
5. Przenieś kolumienkę do nowej próbówki 2 ml i wyrzuć przesącz razem ze starą próbówką. Dodaj do kolumienki 500 μ l buforu DP1. Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością. Wylej przesącz, nie wyrzucaj próbówki.
6. Dodaj do kolumienki 750 μ l buforu DP2. Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością. Wylej przesącz, nie wyrzucaj próbówki.
7. Wiruj przez 3 minuty z maksymalną prędkością, aby wysuszyć membranę i pozbyć się z kolumienki resztek buforów zawierających etanol.

Upewnij się, że w rogu kolumienki nie został żaden płyn. Ewentualnie usuń go pipetą i powtórz wirowanie.

8. Przenieś kolumienkę do próbówki elucyjnej 1,5 ml i wyrzuć starą próbówkę z resztkami buforu płuczącego. Ostrożnie, nie dotykając membrany, dodaj na sam środek membrany 200 μ l buforu do elucji DE lub wody o pH=7,5-9,0. Zamknij wieczko i inkubuj przez 3 minuty w temperaturze pokojowej, aż bufor wsiąknie w membranę. Wiruj przez 2 minuty w temperaturze pokojowej z maksymalną prędkością.

Objętość elucji i warunki inkubacji mogą być inne. Więcej na temat elucji znajdziesz w rozdziale „Elucja DNA”.

9. Ostrożnie wysuń kolumnkę i zamknij wieczko w probówce z wyizolowanym DNA.

Nie wyrzucaj kolumnki do czasu określenia stężenia wyizolowanego DNA. Jak w przypadku każdej metody chromatograficznej, niewłaściwe pH wody użytej do elucji może wyraźnie zmniejszyć wydajność elucji, a nawet uniemożliwić ją, powodując pozostanie całego DNA na kolumnie.

Przy pomiarze stężenia DNA metodami spektrofotometrycznymi, stosuj bufor użyty do elucji jako próbę ślełą (blank).

Wyizolowany DNA można przechowywać w temperaturze 2-8°C do 4 tygodni, lub w -20°C przez dłuższy czas.

Protokół 2

Izolacja DNA z hodowli komórkowych

Zanim zaczniesz

- Jeżeli pierwszy raz używasz zestawu Syngen DNA Mini Kit, najpierw przeczytaj wszystkie rozdziały poprzedzające protokoły.
- Upewnij się, że przygotowałeś wszystkie potrzebne odczynniki i sprzęty opisane w rozdziale „Sprzęt i odczynniki potrzebne do wykonania procedury, a niedostarczone z zestawem”.
- Upewnij się, że bufony płuczące i proteinaza K zostały przygotowane zgodnie z instrukcjami zawartymi w rozdziale „Przygotowanie odczynników przed pierwszym użyciem”.
- Jeżeli w którymś buforze wytrącił się precipitat, rozpuść go inkubując w 37°C przez kilka minut i mieszając.
- Doprowadź wszystkie bufony do temperatury pokojowej (15-25°C).
- Nastaw łaźnię wodną, blok grzejny lub termomikser na 60°C.
- Nastaw łaźnię wodną, blok grzejny lub termomikser na 70°C.
- Do zebrania komórek rosnących na powierzchni przygotuj roztwór trypsyny lub skrobak oraz medium hodowlane. Można użyć medium zebranego z tej samej hodowli.
- Przygotuj narzędzie do liczenia komórek

Procedura dla komórek rosnących z zawiesinie

1.1. Przenieś maksymalnie 5×10^6 komórek do probówki 1,5 ml (nie dostarczono).

Wiruj przez 5 minut z prędkością 300 x g.

Ostrożnie usuń cały supernatant, nie naruszając pelletu.

Uwaga: Pellet komórek może być niewidoczny lub tworzyć nalot na ukośnej ścianie wewnątrz probówki.

1.2. Dodaj 200 ul PBS i zawieś komórki – można zastosować energiczne worteksowanie.

Procedura dla komórek rosnących na powierzchni – trypsyna

- 1.1. Usuń medium, przemyj używając PBS, usuń PBS.
- 1.2. Dodaj 0,10-0,25% roztwór trypsyny.
Gdy komórki zaczną się odrywać, dolej medium, aby zatrzymać działanie trypsyny i zawieś komórki przez pipetowanie.
- 1.3. Przenieś maksymalnie 5×10^6 komórek do probówki 1,5 ml (nie dostarczono).
Wiruj przez 5 minut z prędkością 300 x g.
Ostrożnie usuń cały supernatant, nie naruszając pelletu.

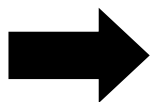
Uwaga: Pellet komórek może być niewidoczny lub tworzyć nalot na ukośnej ścianie wewnątrz probówki.
- 1.4. Dodaj 200 ul PBS i zawieś komórki – można zastosować energiczne worteksowanie.

Ciąg dalszy procedur:

Jeśli wymagane jest DNA wolne od RNA, dodaj 4 ul roztworu RNazy A o stężeniu 100 mg/ml (nie dostarczono), wymieszaj i inkubuj 2 minuty w temperaturze pokojowej.

2. Dodaj 20 ul roztworu proteinazy K oraz 200 ul buforu DLK, zamknij i wymieszaj na worteksie. Upewnij się, że roztwory zmieszały się całkowicie i zawartość probówki jest homogenna.
Inkubuj w 60°C przez 15 minut, mieszając na worteksie co 3-5 minut, aż do całkowitej lizy komórek.
Zwiruj krótko probówki, aby usunąć krople z wieczka.

Nie wolno mieszać buforu DLK bezpośrednio z proteinazą K przed dodaniem do próbki.
3. Dodaj 200 ul etanolu (96-100%), zamknij i zmieszaj na worteksie przez 30 sekund. Upewnij się, że roztwory zmieszały się całkowicie i zawartość probówki jest homogenna.



4. Umieść kolumienkę w probówce 2 ml do płukania.
Zwiruj krótko probówki z lizatem, aby usunąć krople z wieczka.
Przenieś lizat na kolumienkę.
Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością.
5. Przenieś kolumienkę do nowej probówki 2 ml i wyrzuć przesącz razem ze starą probówką.
Dodaj do kolumienki 500 ul buforu DP1.
Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością.
Wylej przesącz, nie wyrzucaj probówki.
6. Dodaj do kolumienki 750 ul buforu DP2.
Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością.
Wylej przesącz, nie wyrzucaj probówki.
7. Wiruj przez 3 minuty z maksymalną prędkością, aby wysuszyć membranę i pozbyć się z kolumienki resztek buforów zawierających etanol.

Upewnij się, że w rogu kolumienki nie został żaden płyn.
Ewentualnie usuń go pipetą i powtórz wirowanie.
8. Przenieś kolumienkę do probówki elucyjnej 1,5 ml i wyrzuć starą probówkę z resztkami buforu płuczącego.
Ostrożnie, nie dotykając membrany, dodaj na sam środek membrany 200 ul buforu do elucji DE lub wody o pH=7,5-9,0.
Zamknij wieczko i inkubuj przez 3 minuty w temperaturze pokojowej, aż bufor wsiąknie w membranę.
Wiruj przez 2 minuty w temperaturze pokojowej z maksymalną prędkością.

Objętość elucji i warunki inkubacji mogą być inne. Więcej na temat elucji znajdziesz w rozdziale „Elucja DNA”.

9. Ostrożnie wysuń kolumnkę i zamknij wieczko w probówce z wyizolowanym DNA.

Nie wyrzucaj kolumnki do czasu określenia stężenia wyizolowanego DNA. Jak w przypadku każdej metody chromatograficznej, niewłaściwe pH wody użytej do elucji może wyraźnie zmniejszyć wydajność elucji, a nawet uniemożliwić ją, powodując pozostanie całego DNA na kolumnie.

Przy pomiarze stężenia DNA metodami spektrofotometrycznymi, stosuj bufor użyty do elucji jako próbę ślełą (blank).

Wyizolowany DNA można przechowywać w temperaturze 2-8°C do 4 tygodni, lub w -20°C przez dłuższy czas.

Protokół 3

Izolacja DNA z wymazówek

Zanim zaczniesz

- Jeżeli pierwszy raz używasz zestawu Syngen DNA Mini Kit, najpierw przeczytaj wszystkie rozdziały poprzedzające protokoły.
- Upewnij się, że przygotowałeś wszystkie potrzebne odczynniki i sprzęty opisane w rozdziale „Sprzęt i odczynniki potrzebne do wykonania procedury, a niedostarczone z zestawem”.
- Upewnij się, że buforzy płuczące i proteinaza K zostały przygotowane zgodnie z instrukcjami zawartymi w rozdziale „Przygotowanie odczynników przed pierwszym użyciem”.
- Jeżeli w którymś buforze wytrącił się precipitat, rozpuść go inkubując w 37°C przez kilka minut i mieszając.
- Doprowadź wszystkie buforzy do temperatury pokojowej (15-25°C).
- Nastaw łaźnię wodną, blok grzejny lub termomikser na 60°C.
- Doprowadź próbki do temperatury pokojowej (15-25°C) i dokładnie je wymieszaj.
- Przygotuj dodatkową porcję buforu DLK.
- Przygotuj nożyczki lub obcinak.

Procedura

1. Włóż wymazówkę z wymazem do 2 ml probówki (nie dostarczono) i obetnij krótko patyczek.

Dodaj 600 ul PBS (nie dostarczono), zamknij i wymieszaj.

Zwiruj krótko probówki, aby usunąć krople z wieczka.

Jeśli wymagane jest DNA wolne od RNA, dodaj 4 ul roztworu RNazy A o stężeniu 100 mg/ml (nie dostarczono), wymieszaj i inkubuj 2 minuty w temperaturze pokojowej.

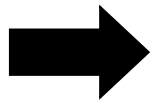
2. Dodaj 20 ul roztworu proteinazy K oraz 600 ul buforu DLK, zamknij i wymieszaj na wortexie. Upewnij się, że roztwory zmieszały się całkowicie i zawartość probówki jest homogenna.

Inkubuj w 60°C przez 15 minut, mieszając na wortexie co 3-5 minut.

Zwiruj krótko probówki, aby usunąć krople z wieczka.

Nie wolno mieszać buforu DLK bezpośrednio z proteinazą K przed dodaniem do próbki.

3. Dodaj 600 ul etanolu (96-100%), zamknij i zmieszaj na wortexie przez 30 sekund. Upewnij się, że roztwory zmieszały się całkowicie i zawartość probówki jest homogenna.



4. Umieść kolumnkę w probówce 2 ml do płukania. Wiruj krótko probówki z lizatem, aby usunąć krople z wieczka. Przenieś lizat na kolumnkę. Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością.

Jeśli objętość lizatu w punkcie 5 jest większa niż 700 ul, przenieś na kolumnę tylko 700 ul na raz, wiruj usuń przesącz (nie wyrzucaj probówki) i powtarzaj, aż do nałożenia całego lizatu na kolumnę.

5. Przenieś kolumnkę do nowej probówki 2 ml i wyrzuć przesącz razem ze starą probówką. Dodaj do kolumnki 500 ul buforu DP1. Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością. Wylej przesącz, nie wyrzucaj probówki.

6. Dodaj do kolumnki 750 ul buforu DP2. Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością. Wylej przesącz, nie wyrzucaj probówki.

7. Wiruj przez 3 minuty z maksymalną prędkością, aby wysuszyć membranę i pozbyć się z kolumnki resztek buforów zawierających etanol.

Upewnij się, że w rogu kolumnki nie został żaden płyn. Ewentualnie usuń go pipetą i powtórz wirowanie.

8. Przenieś kolumnkę do probówki elucyjnej 1,5 ml i wyrzuć starą probówkę z resztkami buforu płuczącego. Ostrożnie, nie dotykając membrany, dodaj na sam środek membrany 200 ul buforu do elucji DE lub wody o pH=7,5-9,0. Zamknij wieczko i inkubuj przez 3 minuty w temperaturze pokojowej, aż bufor wsiąknie w membranę.

Wiruj przez 2 minuty w temperaturze pokojowej z maksymalną prędkością.

Objętość elucji i warunki inkubacji mogą być inne. Więcej na temat elucji znajdziesz w rozdziale „Elucja DNA”.

9. Ostrożnie wysuń kolumnkę i zamknij wieczko w probówce z wyizolowanym DNA.

Nie wyrzucaj kolumnki do czasu określenia stężenia wyizolowanego DNA. Jak w przypadku każdej metody chromatograficznej, niewłaściwe pH wody użytej do elucji może wyraźnie zmniejszyć wydajność elucji, a nawet uniemożliwić ją, powodując pozostanie całego DNA na kolumnie.

Przy pomiarze stężenia DNA metodami spektrofotometrycznymi, stosuj bufor użyty do elucji jako próbę ślełą (blank).

Wyizolowany DNA można przechowywać w temperaturze 2-8°C do 4 tygodni, lub w -20°C przez dłuższy czas.

Protokół 4

Izolacja DNA z próbek mrożonej krwi

Zanim zaczniesz

- Jeżeli pierwszy raz używasz zestawu Syngen DNA Mini Kit, najpierw przeczytaj wszystkie rozdziały poprzedzające protokoły.
- Upewnij się, że przygotowałeś wszystkie potrzebne odczynniki i sprzęty opisane w rozdziale „Sprzęt i odczynniki potrzebne do wykonania procedury, a niedostarczone z zestawem”.
- Upewnij się, że buforzy płuczące i proteinaza K zostały przygotowane zgodnie z instrukcjami zawartymi w rozdziale „Przygotowanie odczynników przed pierwszym użyciem”.
- Jeżeli w którymś buforze wytrącił się precipitat, rozpuść go inkubując w 37°C przez kilka minut i mieszając.
- Doprowadź wszystkie buforzy do temperatury pokojowej (15-25°C).
- Nastaw łaźnię wodną, blok grzejny lub termomikser na 60°C.
- Nastaw łaźnię wodną, blok grzejny lub termomikser na 70°C.
- Doprowadź próbki do temperatury pokojowej (15-25°C) i dokładnie je wymieszaj.

Procedura

1. Do eppendorfki (nie dostarczono) dodaj 200 ul mrożonej krwi.

Próbki o objętości mniejszej niż 200 ul dopełnij przy użyciu PBS (nie dostarczono) i wymieszaj.

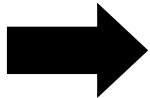
Jeśli wymagane jest DNA wolne od RNA, dodaj 4 ul roztworu RNazy A o stężeniu 100 mg/ml (nie dostarczono), wymieszaj i inkubuj 2 minuty w temperaturze pokojowej.

2. Dodaj 20 ul roztworu proteinazy K oraz 200 ul buforu DLK, zamknij i wymieszaj na wortexie. Upewnij się, że roztwory zmieszały się całkowicie i zawartość próbki jest homogenna. Inkubuj w 60°C przez 15 minut, mieszając na wortexie co 3-5 minut.
Zwiruj krótko próbki, aby usunąć krople z wieczka.

Nie wolno mieszać buforu DLK bezpośrednio z proteinazą K przed dodaniem do próbki.

Jeśli liza enzymatyczna nie zachodzi całkowicie, można zwiększyć stosowaną ilość roztworu proteinazy K do 30 ul.

3. Opcjonalnie: Jeśli liza enzymatyczna zaszła niewydajnie, inkubuj w 70°C przez 15 minut, mieszając co 3 minuty poprzez odwrócenie probówki, aż do całkowitej lizy komórek.
4. Dodaj 200 ul etanolu (96-100%), zamknij i zmieszaj na wortexie przez 30 sekund. Upewnij się, że roztwory zmieszały się całkowicie i zawartość probówki jest homogenna.



5. Umieść kolumienkę w probówce 2 ml do płukania.
Zwiruj krótko probówki z lizatem, aby usunąć krople z wieczka.
Przenieś lizat na kolumienkę.
Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością.
6. Przenieś kolumienkę do nowej probówki 2 ml i wyrzuć przesącz razem ze starą probówką.
Dodaj do kolumienki 500 ul buforu DP1.
Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością.
Wylej przesącz, nie wyrzucaj probówki.
7. Dodaj do kolumienki 750 ul buforu DP2.
Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością.
Wylej przesącz, nie wyrzucaj probówki.
8. Wiruj przez 3 minuty z maksymalną prędkością, aby wysuszyć membranę i pozbyć się z kolumienki resztek buforów zawierających etanol.

Upewnij się, że w rogu kolumienki nie został żaden płyn.
Ewentualnie usuń go pipetą i powtórz wirowanie.

9. Przenieś kolumienkę do probówki elucyjnej 1,5 ml i wyrzuć starą probówkę z resztkami buforu płuczającego.
Ostrożnie, nie dotykając membrany, dodaj na sam środek membrany 200 ul buforu do elucji DE lub wody o pH=7,5-9,0.
Zamknij wieczko i inkubuj przez 3 minuty w temperaturze pokojowej, aż bufor wsiąknie w membranę.

Wiruj przez 2 minuty w temperaturze pokojowej z maksymalną prędkością.

Objętość elucji i warunki inkubacji mogą być inne. Więcej na temat elucji znajdziesz w rozdziale „Elucja DNA”.

10. Ostrożnie wysuń kolumnkę i zamknij wieczko w probówce z wyizolowanym DNA.

Nie wyrzucaj kolumnki do czasu określenia stężenia wyizolowanego DNA. Jak w przypadku każdej metody chromatograficznej, niewłaściwe pH wody użytej do elucji może wyraźnie zmniejszyć wydajność elucji, a nawet uniemożliwić ją, powodując pozostanie całego DNA na kolumnie.

Przy pomiarze stężenia DNA metodami spektrofotometrycznymi, stosuj bufor użyty do elucji jako próbę ślełą (blank).

Wyizolowany DNA można przechowywać w temperaturze 2-8°C do 4 tygodni, lub w -20°C przez dłuższy czas.


Protokół 5

Izolacja DNA z krwi zwierząt

Zanim zaczniesz

- Jeżeli pierwszy raz używasz zestawu Syngen Blood/Cell DNA Mini Kit, najpierw przeczytaj wszystkie rozdziały poprzedzające protokoły.
- Upewnij się, że przygotowałeś wszystkie potrzebne odczynniki i sprzęty opisane w rozdziale „Sprzęt i odczynniki potrzebne do wykonania procedury, a niedostarczone z zestawem”.
- Upewnij się, że buforzy płuczające i proteinaza K zostały przygotowane zgodnie z instrukcjami zawartymi w rozdziale „Przygotowanie odczynników przed pierwszym użyciem”.
- Jeżeli w którymś buforze wytrącił się precypitat, rozpuść go inkubując w 37°C przez kilka minut i mieszając.
- Doprowadź wszystkie buforzy do temperatury pokojowej (15-25°C).
- Nastaw łaźnię wodną, blok grzejny lub termomikser na 60°C.
- Doprowadź próbki do temperatury pokojowej (15-25°C) i dokładnie je wymieszaj.
- Przygotuj PBS

Procedura

1. Do eppendorfki (nie dostarczono) dodaj 50 ul krwi o erytrocytach bezjądrzastych (większość ssaków) lub 5-10 ul krwi o erytrocytach jądrzastych (np. ryby i ptaki)
2. Dopełnij do objętości 200 ul przy użyciu PBS, zamknij i wymieszaj na wortexie.
3. Zwiruj krótko probówki, aby usunąć krople z wieczka.
4. Przejdź do Protokołu 1 „Izolacja DNA z próbek świeżej krwi, osocza, surowicy lub kożuszka leukocytnego”, zacznij krok 1 od miejsca zaznaczonego białą strzałką. 

Samodzielne rozwiązywanie problemów

Za niska czystość A260/A280

Przyczyna	Rozwiązanie
Zanieczyszczenia wprowadzone przez użytkownika	Stosuj się do wskazówek w rozdziale „Ogólne wytyczne dotyczące obsługi zestawów Syngen DNA” – 3 akapit. Nakładaj bufor i próbki do wnętrza kolumny, nie zanieczyszczając brzegu kolumny
Niewydajna liza z powodu za dużej ilości komórek w próbce	Powtórz izolację. Zmniejsz ilość próbki do objętości zalecanej
Niewydajna liza z powodu małej aktywności proteiny K	- Powtórz izolację. Użyj świeżej proteiny K - Powtórz izolację. Przedłuż trawienie - Nie mieszaj proteiny K z buforem DLK przed dodaniem do próbki
Niewydajna liza z powodu niedokładnego wymieszania z buforem DLK	Powtórz izolację. Mieszaj dokładnie próbkę z buforem DLK
Niewydajna liza z powodu niewystarczających warunków inkubacji	Powtórz izolację. Wydłuż inkubację w 60 st.
Nie dodano etanolu do próbki przed nałożeniem na kolumnę lub zastosowano etanol o złym stężeniu	Powtórz izolację, nie pomijaj żadnego kroku, upewnij się, że używasz etanolu minimum 96%
Nie dodano etanolu do buforów płuczających przed pierwszym użyciem lub zastosowano etanol o złym stężeniu	Powtórz izolację, przygotuj prawidłowo bufor, upewnij się, że używasz etanolu minimum 96%

Za wysoki stosunek A260/A280

Przyczyna	Rozwiązanie
Duża zawartość RNA w izolacie z powodu pominięcia trawienia RNazą	Powtórz izolację, wykonaj opcjonalne trawienie RNazą (drugi akapit za białą strzałką)
Duża zawartość RNA w izolacie z powodu niewłaściwego wykonania trawienia RNazą	Powtórz izolację, nie dodawaj buforu DLK przed trawieniem RNazą

Mała lub zerowa wydajność izolacji

Przyczyna	Rozwiązanie
Mało komórek w próbce	<ul style="list-style-type: none"> - Powtórz izolację, użyj kożuszka leukocytarnego - Powtórz izolację, użyj większej objętości i zwiększ proporcje buforów do etapu nakładania na kolumnę - Powtórz izolację, zastosuj nośnikowe DNA
Niewydajna liza z powodu za dużej ilości komórek w próbce	Powtórz izolację. Zmniejsz ilość próbki do objętości zalecanej
Niewydajna liza z powodu małej aktywności proteiny K	<ul style="list-style-type: none"> - Powtórz izolację. Użyj świeżej proteiny K - Powtórz izolację. Przedłuż trawienie - Nie mieszaj proteiny K z buforem DLK przed dodaniem do próbki
Niewydajna liza z powodu niedokładnego wymieszania z buforem DLK	Powtórz izolację. Mieszaj dokładnie próbkę z buforem DLK
Niewydajna liza z powodu niewystarczających warunków inkubacji	Powtórz izolację. Wydłuż inkubację w 60 st.
Nie dodano etanolu do próbki przed nałożeniem na kolumnę lub zastosowano etanol o złym stężeniu	Powtórz izolację, nie pomijaj żadnego kroku, upewnij się, że używasz etanolu minimum 96%
Nie dodano etanolu do buforów płuczających przed pierwszym użyciem lub zastosowano etanol o złym stężeniu	Powtórz izolację, przygotuj prawidłowo bufor, upewnij się, że używasz etanolu minimum 96%
Niewydajna elucja wodą o za niskim pH (niższe niż 7.5-9.0)	Wykonaj elucję ponownie buforem DE
Niewydajna elucja – bufor nie wsiąkł w membranę	<ul style="list-style-type: none"> - Powtórz elucję buforem DE - upewnij się, że nanosisz bufor na sam środek membrany - pozwól buforowi wsiąknąć w membranę - inkubuj 5 minut przed wirowaniem
Niewydajna elucja w powodu przedziurawienia membrany	Powtórz izolację

Materiał po izolacji jest zdegradowany

Przyczyna	Rozwiązanie
Próbka jest stara lub źle przechowywana	Powtórz izolację na nowej próbce, izoluj DNA z próbek świeżych lub prawidłowo przechowywanych

Brązowy osad na membranie w kolumnie

Przyczyna	Rozwiązanie
Niewydajna liza z powodu za dużej ilości komórek w próbce	Powtórz izolację. Zmniejsz ilość próbki do objętości zalecanej
Niewydajna liza z powodu małej aktywności proteiny K	- Powtórz izolację. Użyj świeżej proteiny K - Powtórz izolację. Przedłuż trawienie - Nie mieszaj proteiny K z buforem DLK przed dodaniem do próbki
Niewydajna liza z powodu niedokładnego wymieszania z buforem DLK	Powtórz izolację. Mieszaj dokładnie próbkę z buforem DLK
Niewydajna liza z powodu niewystarczających warunków inkubacji	Powtórz izolację. Wydłuż inkubację w 60 st.
Nie dodano etanolu do próbki przed nałożeniem na kolumnę lub zastosowano etanol o złym stężeniu	Powtórz izolację, nie pomijaj żadnego kroku, upewnij się, że używasz etanolu minimum 96%
Nie dodano etanolu do buforów płuczających przed pierwszym użyciem lub zastosowano etanol o złym stężeniu	Powtórz izolację, przygotuj prawidłowo bufor, upewnij się, że używasz etanolu minimum 96%

Kolumnienka zatkała się

Przyczyna	Rozwiązanie
Skrzep w próbce	Powtórz izolację z nowej próbki. Pobierając krew stosuj się do wskazówek z rozdziału „Materiał wyjściowy i wydajność DNA”, w tym zastosuj antykoagulant
Próbka jest zbyt gęsta lub lepka	Powtórz izolację z mniejszej ilości próbki.
Niewydajna liza z powodu małej aktywności proteiny K	- Powtórz izolację. Użyj świeżej proteiny K - Powtórz izolację. Przedłuż trawienie - Nie mieszaj proteiny K z buforem DLK przed dodaniem do próbki

Protokół skrócony 1

Izolacja DNA z próbek świeżej krwi, osocza, surowicy lub kożuszka leukocytarnego

Przed zastosowaniem protokołu skróconego należy zapoznać się z protokołami w pełnej wersji oraz z rozdziałami poprzedzającymi protokoły, opisującymi przygotowanie materiału oraz teorię.

- Przygotuj potrzebny sprzęt i odczynniki
- Rozcieńcz bufor płuczący i rozpuść proteinazę K
- Doprowadź wszystkie bufor do temperatury pokojowej (15-25°C)
- Doprowadź próbki do temperatury pokojowej (15-25°C) i dokładnie je wymieszaj.

Procedura

1. Do eppendorfki dodaj 200 ul próbki oraz 200 ul buforu DLK i wymieszaj.
2. Dodaj 20 ul roztworu proteinazy K, inkubuj w 60°C przez 15 minut, mieszając na wortexie co 3-5 minut, aż do całkowitej lizy komórek.
3. Dodaj 200 ul etanolu (96-100%), zamknij i zmieszaj na wortexie przez 30 sekund.
4. Przenieś całą zawartość probówek na kolumienkę umieszczoną w probówce 2 ml do płukania i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością.
5. Przemyj kolumienkę w nowej probówce 500 ul buforu DP1 i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością.
6. Przemyj kolumienkę w tej samej probówce 750 ul buforu DP2 i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością.
7. Dosusz membranę przez wirowanie 3 minuty z maksymalną prędkością w pustej probówce.
8. Przenieś kolumienkę do probówki elucyjnej 1,5 ml i ostrożnie, nie dotykając membrany, dodaj na sam środek membrany 200 ul buforu do elucji DE lub wody o pH=7,5-9,0. Zamknij wieczko i inkubuj przez 3 minuty w temperaturze pokojowej, aż bufor wsiąknie w membranę. Wiruj przez 2 minuty w temperaturze pokojowej z maksymalną prędkością.

Protokół skrócony 2

Izolacja DNA z hodowli komórkowych

Przed zastosowaniem protokołu skróconego należy zapoznać się z protokołami w pełnej wersji oraz z rozdziałami poprzedzającymi protokoły, opisującymi przygotowanie materiału oraz teorię.

- Przygotuj potrzebny sprzęt i odczynniki
- Rozcieńcz bufory płuczące i rozpuść proteinazę K
- Doprowadź wszystkie bufory do temperatury pokojowej (15-25°C)
- Doprowadź próbki do temperatury pokojowej (15-25°C) i dokładnie je wymieszaj.

Procedura

1. Zbierz 5×10^6 komórek, przemyj w PBS, zawieś w 200 ul PBS w eppendorfce 1,5 ml, dodaj 200 ul buforu DLK i wymieszaj.
2. Dodaj 20 ul roztworu proteinazy K, inkubuj w 60°C przez 15 minut, mieszając na wortexie co 3-5 minut, aż do całkowitej lizy komórek.
3. Dodaj 200 ul etanolu (96-100%), zamknij i zmieszaj na wortexie przez 30 sekund.
4. Przenieś całą zawartość probówek na kolumienkę umieszczoną w probówce 2 ml do płukania i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością.
5. Przemyj kolumienkę w nowej probówce 500 ul buforu DP1 i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością.
6. Przemyj kolumienkę w tej samej probówce 750 ul buforu DP2 i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością.
7. Dosusz membranę przez wirowanie 3 minuty z maksymalną prędkością w pustej probówce.
8. Przenieś kolumienkę do próbki elucyjnej 1,5 ml i ostrożnie, nie dotykając membrany, dodaj na sam środek membrany 200 ul buforu do elucji DE lub wody o pH=7,5-9,0. Zamknij wieczko i inkubuj przez 3 minuty w temperaturze pokojowej, aż bufor wsiąknie w membranę. Wiruj przez 2 minuty w temperaturze pokojowej z maksymalną prędkością.

Protokół skrócony 3

Izolacja DNA z wymazówek

Przed zastosowaniem protokołu skróconego należy zapoznać się z protokołami w pełnej wersji oraz z rozdziałami poprzedzającymi protokoły, opisującymi przygotowanie materiału oraz teorię.

- Przygotuj potrzebny sprzęt i odczynniki
- Rozcieńcz bufory płuczące i rozpuść proteinazę K
- Doprowadź wszystkie bufory do temperatury pokojowej (15-25°C)
- Doprowadź próbki do temperatury pokojowej (15-25°C) i dokładnie je wymieszaj.

Procedura

1. Wymazówkę z obciętym patyczkiem umieść w probówce 2 ml, dodaj 600 ul PBS oraz 600 ul buforu DLK i wymieszaj.
2. Dodaj 20 ul roztworu proteinazy K, inkubuj w 60°C przez 15 minut, mieszając na wortexie co 3-5 minut, aż do całkowitej lizy komórek.
3. Dodaj 600 ul etanolu (96-100%), zamknij i zmieszaj na wortexie przez 30 sekund.
4. Przenieś całą zawartość probówek na kolumnkę umieszczoną w probówce 2 ml do płukania i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością.
5. Przemyj kolumnkę w nowej probówce 500 ul buforu DP1 i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością.
6. Przemyj kolumnkę w tej samej probówce 750 ul buforu DP2 i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością.
7. Dosusz membranę przez wirowanie 3 minuty z maksymalną prędkością w pustej probówce.
8. Przenieś kolumnkę do próbki elucyjnej 1,5 ml i ostrożnie, nie dotykając membrany, dodaj na sam środek membrany 200 ul buforu do elucji DE lub wody o pH=7,5-9,0. Zamknij wieczko i inkubuj przez 3 minuty w temperaturze pokojowej, aż bufor wsiąknie w membranę. Wiruj przez 2 minuty w temperaturze pokojowej z maksymalną prędkością.



facebook.com/SyngenBiotech

Syngen Biotech Sp. z o.o. Sp. k.

54-116 Wrocław, ul. Ostródzka 13

kolumienki.pl, syngen.pl, info@syngen.pl

tel. +48 71 349 70 13, +48 349 91 66, +48 71 349 91 67, faks +48 71 349 70 33

