

Laboratorieprotokol for manuel isolering af DNA fra 0,5 mL prøve

Til isolering af genomisk DNA fra indsamlingssætserierne Oragene®- og ORAcollect®.

Du kan finde flere sprog og protokoller på vores webside www.dnagenotek.com.

Følgende protokol beskriver trin for trin, hvordan man isolerer DNA fra en alikvot på 500 µL af en prøve.

Medfølgende reagenter

- prepIT®·L2P (katalog #: PT-L2P)

Udstyr og reagenter

- Mikrocentrifuge med en kapacitet på 15.000 × g
- 1.5 mL pipettespidser (f.eks. Axygen #MCT-150-C)
- Luft- eller vandinkubator på 50° C
- Ethanol (95-100 %) ved stuetemperatur
- Ethanol (70 %) ved stuetemperatur
- Dna-opbevaringsbuffer: TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) eller tilsvarende opløsning

Procedure

Isolering trin for trin	Bemærkninger
1. Bland prøven i DNA-Genotek-sættet ved at vende og ryste den blidt i et par sekunder.	<ul style="list-style-type: none">• Dette sikrer, at tyktflydende prøver bliver ordentligt blandet.
2. Prøven inkuberes ved 50° C i en vandinkubator i mindst 1 time eller i en luftinkubator i mindst 2 timer. Bemærk: En luftinkubator kan være at foretrække, da prøverørerne kan flyde i et vandbad. Hvis det er nødvendigt at anvende et vandbad, skal man sikre sig, at den del af røret, som indeholder prøven, til stadighed er neddykket i vand.	<ul style="list-style-type: none">• Denne varmebehandling er vigtig for at sikre, at DNA'en frigøres korrekt, og at nucleaser inaktiveres permanent.• Dette inkubationstrin kan gennemføres på et hvilket som helst tidspunkt efter indsamling af prøven og før isolering.• Hele prøven skal inkuberes i det originale indsamlingsrør, før den opdeles, for at sikre homogenitet i prøven.• Prøven kan inkuberes ved 50° C natten over, hvis det er mest praktisk.• Inkubation i luftinkubator kræver længere tid, fordi temperaturudligningen sker langsommere end i en vandinkubator.
3. Overfør 500 µL af den blandede prøve til et 1,5 mL mikrocentrifugerør.	<ul style="list-style-type: none">• Resten af prøven kan opbevares ved stuetemperatur eller fryses ned (-15° C til -20° C).
4. For hver 500 µL prøve tilsættes 20 µL (1/25 mængde) PT-L2P til mikrocentrifugerøret. Blandes ved vortex i nogle sekunder.	<ul style="list-style-type: none">• Prøven vil blive uklar, idet urenheder og inhibitorer udfældes.

Isolering trin for trin	Bemærkninger
5. Inkuberes på is i 10 minutter.	<ul style="list-style-type: none"> Inkubation ved stuetemperatur kan også anvendes, men vil være lidt mindre effektiv med hensyn til at fjerne urenheder.
6. Centrifugeres ved stuetemperatur i 5 minutter ved 15.000 × g.	<ul style="list-style-type: none"> En længere centrifugeringsperiode (op til 15 minutter) kan være gavnlig med hensyn til at mindske uklarheden (høj A₃₂₀) i den endelige DNA-opløsning.
7. Med pipette overføres den klare supernatant til et nyt mikrocentrifugerør. Kassér pelleten med urenheder.	<ul style="list-style-type: none"> Pelleten indeholder uklare urenheder. Hvis den ødelægges ved et uheld, bør røret centrifugeres igen.
8. Til 500 µL supernatant tilsættes 600 µL 95-100 % ethanol ved stuetemperatur. Blandes forsigtigt ved 10 gange inversion.	<ul style="list-style-type: none"> Under blandingen med ethanol vil DNA'en blive udfældet. Dette kan vise sig som en klump af DNA-fibre eller som et fint præcipitat, afhængigt af mængden af DNA i prøven. Selv om der ikke er nogen synlig klump, vil der blive fundet DNA, når de følgende skridt udføres omhyggeligt.
9. Lad prøven stå ved stuetemperatur i 10 minutter, så DNA'en udfældes helt.	<ul style="list-style-type: none"> Inkubation ved -20° C anbefales ikke, idet urenheder da kan udfældes sammen med DNA'en.
10. Placér røret i mikrocentrifugen i en kendt orientering. Centrifugeres ved stuetemperatur i 2 minutter ved 15.000 × g.	<ul style="list-style-type: none"> Placér f.eks. hvert rør i mikrocentrifugen, så hættens hængsel peger væk fra rotorens centrum. Efter centrifugeringen kan pelletens position lokaliseres (selv hvis den er for lille til at kunne ses). Den vil befinde sig i bunden af røret under hængslet.
11. Fjern omhyggeligt supernatanten med en pipettespids, og kassér den. Pas på ikke at ødelægge DNA-pelleten.	<ul style="list-style-type: none"> Denne pellet indeholder DNA. Hvis pelleten går tabt, går DNA tabt. Hvis røret drejes, så pelleten befinder sig på den øvre del af væggen, kan man uden risiko bevæge en pipettespids langs den nederste del af væggen og fjerne supernatanten fuldstændigt. Supernatanten kan indeholde urenheder og bør fjernes så fuldstændigt som muligt. Overdreven tørring af pelleten kan gøre det vanskeligere at opløse DNA'en.
12. Ethanolvask: Tilsæt forsigtigt 250 µL 70 % ethanol. Lad det stå ved stuetemperatur i 1 minut. Fjern ethanolen fuldstændigt uden at ødelægge pelleten.	<ul style="list-style-type: none"> Det er vigtigt at fjerne al ethanol fra prøven. Rester af ethanol kan påvirke analysens nøjagtighed. Pas på ikke at ødelægge DNA-pelleten. DNA-pelleten kan være lille. Hvis pelleten skulle gå i opløsning, centrifugeres prøven i 5 minutter ved 15.000 × g. Når 70 %-ethanolen er fjernet, kan røret pulscentrifugeres for at gøre det muligt at fjerne ethanolrester.

Isolering trin for trin	Bemærkninger
13. Tilsæt 100 µL TE-opløsning (se side 1) for at opløse DNA-pelleten. Vortex i mindst 5 sekunder.	<ul style="list-style-type: none"> Hvis der ønskes en højere koncentration af DNA, anvendes 50 µL TE. Bemærk: Store mængder DNA med høj molekylvægt kan være langsomme at hydrere (opløse) fuldstændigt. Ufuldstændig hydrering af DNA'en er årsag til unøjagtighed ved vurdering af DNA-koncentrationen og til fejl i senere anvendelser, såsom PCR.
14. For at sikre fuldstændig rehydrering af DNA'en (pellet og smear) inkuberes ved stuetemperatur natten over, fulgt af vortex, eller ved 50° C i 1 time med lejlighedsvis vortex.	<ul style="list-style-type: none"> Ufuldstændig rehydrering af DNA'en er årsag til unøjagtighed ved vurdering af DNA-koncentrationen og til potentielle fejl i senere anvendelser, såsom PCR.
15. Muligheder for opbevaring af den fuldstændigt rehydrerede DNA: a) Anbefalet: i TE, i alikvoter ved -20° C til langtidsopbevaring, eller b) i TE ved 4° C i op til 2 måneder.	<ul style="list-style-type: none"> Hvis rensed DNA fryses i TE, vil DNA udfældes. Ved optøning af en prøve af frosset, rensed DNA skal man være omhyggelig med rehydreringen som beskrevet i trin 14.

Mængdebestemmelse af DNA

Fluorescensmetoden

Analyser, hvor der anvendes fluorescerende farvestoffer, er mere specifikke end absorbans ved 260 nm til bestemmelse af mængden af dobbeltstrengt DNA (ds-DNA) i en DNA-prøve. Vi anbefaler anvendelse af fluorescerende farver, som f.eks. PicoGreen® eller SYBR® Green I, til at bestemme mængden af ds-DNA, da der optræder mindre interferens af forurenende RNA. En billig protokol med anvendelse af SYBR Green I er beskrevet i PD-PR-075, *DNA quantification using SYBR Green I Dye and a micro-plate reader*¹. Alternativt kan der anvendes sæt, som fås i handelen, f.eks. Invitrogen's Quant-iT™ PicoGreen dsDNA Assay Kit (kat. no. Q-33130). Uanset hvilken protokol, der anvendes, anbefaler vi, at den rensede DNA opløses i forholdet 1:50 med TE-væske, og at der anvendes 5 µL i mængdebestemmelse analysen.

Absorbansmetoden

Hvis man ønsker at mængdebestemme DNA ved hjælp af absorbans, anbefaler vi, at den rensede prøve først behandles med RNase for at fjerne forurenende RNA, hvorefter RNA-fragmenterne fjernes ved ethanoludfældning af DNA'en. En detaljeret protokol findes i PD-PR-040, *RNA removal by double-RNase digestion*². Bemærk, at DNA fra en oral prøve typisk indeholder betydeligt mere RNA end blodprøver. Sørg for, at alkoholudfældet DNA er helt opløst, før absorbansen aflæses.

Omregningsfaktor: En absorbans på 1,0 ved 260 nm svarer til en koncentration på 50 ng/µL (50 µg/mL) for ren ds-DNA.

Sørg for, at absorbansværdierne ligger inden for spektrofotometerets lineære skala. Prøver, som falder uden for den lineære skala, skal genopløses og genmåles. Find yderligere oplysninger i dokumentationen til dit instrument.

Metode:

1. Opløs en 10 µL alikvot rensed RNase-behandlet DNA med 90 µL TE (1/10 opløsning). Blandes ved forsigtigt at føre pipetten op og ned. Vent til boblerne er forsvundet.
2. Brug TE i referencecellen (blank).
3. Mål absorbansen ved 320 nm, 280 nm og 260 nm.
4. Beregn de korrigerede A_{280} - og A_{260} -værdier ved at trække absorbansen ved 320 nm (A_{320}) fra A_{280} - og A_{260} -værdierne.
5. DNA-koncentration i ng/µL = korrigeret $A_{260} \times 10$ (opløsningsfaktor) $\times 50$ (omregningsfaktor).
6. A_{260}/A_{280} -forhold: Divider korrigeret A_{260} med korrigeret A_{280} .

Eksempel

1. Vi antager, at den målte $A_{320} = 0,025$, $A_{280} = 0,175$ og $A_{260} = 0,295$.
2. DNA-koncentrationen af den ufortyndede prøve vil være:
 $(A_{260} - A_{320}) \times 10$ [fortyndingsfaktor] $\times 50$ [omregningsfaktor]
 $= (0,295 - 0,025) \times 10 \times 50$
 $= 0,270 \times 10 \times 50$
 $= 135 \text{ ng/}\mu\text{L}$ eller $135 \text{ }\mu\text{g/mL}$
3. Det korrigerede A_{260}/A_{280} -forhold vil være:
 $(A_{260} - A_{320}) \div (A_{280} - A_{320})$
 $= (0,296 - 0,025) \div (0,175 - 0,025)$
 $= 0,270 \div 0,150$
 $= 1,80$

Referencer

- 1 Bestemmelse af mængden af DNA ved anvendelse af fluorescens/DNase (F/D)-analyse. Erstattet af mængdebestemmelse af DNA med anvendelse af SYBR Green I farve og en mikropladelæser. DNA Genotek. PD-PR-075.
- 2 Fjernelse af RNA ved dobbelt RNase-digestion. DNA Genotek. PD-PR-040.

Teknisk support har åbent mandag til fredag (9.00-17.00 EST):

- Ring gratis (Nordamerika): 1.866.813.6354, option 6
- Alle andre lande: 613.723.5757, option 6
- E-mail: support@dnagenotek.com

Oragene®-DNA og ORAcollect®-DNA sælges ikke i USA.

Oragene®-DISCOVER er kun beregnet til forskningsbrug, ikke til anvendelse i diagnostiske procedurer.

Nogle DNA Genotek-produkter fås muligvis ikke i alle geografiske regioner.

*Oragene, preplT og ORAcollect er registrerede varemærker tilhørende DNA Genotek Inc. Alle andre mærker og navne indeholdt heri er de respektive ejeres ejendom.

Alle DNA Genotek-protokoller, -hvidbøger og -anvendelsesnoter findes på vores webside www.dnagenotek.com under support.

Kortfattet vejledning:

Laboratorieprotokol for manuel rensning af DNA fra 0,5 mL prøve

Isoleringstrin
1. Bland prøven i DNA-Genotek-sættet ved at vende og ryste den blidt i et par sekunder.
2. Prøven inkuberes ved 50° C i en vandinkubator i mindst 1 time eller i en luftinkubator i mindst 2 timer.
3. Overfør 500 af prøven til et mikrocentrifugerør.
4. Tilsæt 20 PT-L2P og bland ved vortex i et par sekunder.
5. Inkuberes på is i 10 minutter.
6. Centrifugeres ved stuetemperatur i 5 minutter ved 15.000 × g.
7. Med pipette overføres størstedelen af den klare supernatant til et nyt mikrocentrifugerør. Kassér pelleten.
8. Tilsæt 600 RT 95-100 % ethanol til den klare supernatant. Blandes forsigtigt ved 10 gange inversion.
9. Lad prøven stå ved stuetemperatur i 10 minutter, så DNA'en udfældes helt.
10. Placér røret i mikrocentrifugen i en kendt orientering. Centrifugeres ved stuetemperatur i 2 minutter ved 15.000 × g.
11. Fjern forsigtigt supernatanten med pipette og kassér den. Pas på ikke at ødelægge DNA-pelleten.
12. Tilsæt 250 70 % ethanol, og lad det stå ved stuetemperatur i 1 minut. Fjern ethanolen fuldstændigt uden at ødelægge pelleten.
13. Tilsæt 100 TE-opløsning, og vortex prøven i mindst 5 sekunder.
14. Inkubér natten over ved stuetemperatur eller ved 50° C i en time med lejlighedsvis vortex.
15. Opbevaring: I aliquoter ved -20° C for langtidsopbevaring (anbefalet) eller ved 4° C i op til 2 måneder.