

Column DNA Lego Kit

UNIVERZÁLNÍ SOUPRAVY PRO RYCHLOU IZOLACI ČISTÉ DNA

(Katalogové číslo D201 + D202)

rev. 01/2022

Popis

Column DNA Lego Kit je základ moderní stavebnicové (Lego) soupravy pro izolaci čisté DNA různého původu. Tato izolační metoda využívá poznatku o kapacitě křemičitých povrchů vázat DNA v přítomnosti chaotropních látek (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 615-619, 1979*). Izolace DNA pomocí Column DNA Lego Kitu je ve srovnání s klasickými metodami izolace DNA rychlejší (nevyžaduje ultracentrifugaci, etanolovou precipitaci anebo vysoušení), bezpečnější (nevyžaduje fenolovou extrakci anebo ethidium bromid) a izolované preparáty DNA jsou podstatně čistější (nekontaminované RNA, proteiny a jejich štěpnými produkty). Tato izolační procedura je jednodušší a lacinější než izolace pomocí populárního DNA Lego Kitu, který jsme uvedli na trh před více než 10 léty. DNA izolovaná pomocí Column DNA Lego Kitu je použitelná pro řadu molekulárně biologických technik, které zahrnují sekvenování, klonování, PCR, štěpení pomocí restričních enzymů, mutagenesi *in vitro*, transkripci *in vitro*, transformaci nebo transfekci. Výhodou soupravy je, že její komponenty lze zakoupit i individuálně a univerzálně využít pro izolaci (1) plasmidové DNA, (2) DNA fragmentů z agarózových gelů, (3) DNA z roztoků, včetně amplifikované DNA po PCR a (4) genomové DNA.

Technické údaje

Definice jednotky

- Column DNA Lego Kit umožňuje 200 izolací vzorků čisté DNA.

Skladování

- Při pokojové teplotě (+15 až +25°C) s výjimkou RNase, která by měla být skladována při -15 až -25°C; Suspension solution [P1] s RNase skladovat při +2 až +8°C se stabilitou po dobu 6 měsíců. Skladování soupravy v lednici (+2 to + 8°C) může vest k tvorbě precipitátů solí, které se rozpustí při pokojové teplotě. Transport soupravy nevyžaduje chlazení.

Komponenty

Column DNA Lego Kit (200 purifikací):

- DNA bind kolonky (200 ks) a zkumavky (200 ks) ve 4 krabičkách
- DNA bind buffer [L1], 60 ml
- Wash buffer [L2], 250 ml
- Elution buffer [L3], 20 ml
- Návod k použití

Column DNA Lego Kit + plasmid supplement (200 purifikací):

obsahuje všechny komponenty Column DNA Lego Kitu a navíc 4 roztoky nutné pro izolaci plasmidové DNA

- Suspension buffer [P1], 50 ml
- RNase A, DNase-free (10 mg/ml), 0,5 ml
- Lysis buffer - blue [P2], 50 ml
- Neutralization buffer [P3], 10 ml

Protokoly

Pro izolaci DNA s využitím Column DNA Lego Kitu je požadováno běžné laboratorní vybavení mezi které patří stolní centrifuga (např. Eppendorf 5415C nebo ekvivalent s kapacitou 13.000 x g), pipetátory a špičky, odsávačka nebo vodní vývěva, lednice a mraznice a centrifugační zkumavky typu Eppendorf.

1. Izolace plasmidové DNA z bakteriálních kultur (miniprep)

Základem metody je dvoustupňová alkalická lyza a následná vazba plasmidu na křemičité membrány v přítomnosti chaotropního činidla (guanidin thiocyanát, GITC). Po odmytí nečistot je čistá DNA uvolněna z membrán pomocí elučního pufru a centrifugací. Schéma izolačních kroků je uvedeno v Obr. 1.

1.1. Bakterie jsou produkovány v přesnoční kultuře (densita 1.5 - 5.0 A₆₀₀) v objemu více než 1,5 ml v přítomnosti vhodného antibiotika.

1.2. Bakteriální suspenze je přenesena do zkumavky typu Eppendorf (1,5 ml) a buňky jsou sedimentovány centrifugací (30 s při 6.000 x g).

1.3. Supernatant je pečlivě odstraněn odsátím a bakteriální pelet je resuspendován pipetováním nebo vortexováním v 250 µl **Suspension buffer + RNase [P1]**.

1.4. **Lysis buffer - blue [P2]** (250 µl) je přidán a vzorek je opatrně promíchán pomalou inverzí a inkubován 3 - 5 min při pokojové teplotě (mezi +15°C a 25°); při delší inkubaci může dojít k denaturaci plasmidu).

1.5. **Neutralizační buffer [P3]** (50 µl) a **DNA bind buffer [L1]** (300 µl) jsou přidány a jemně promíchány pomalou inverzí do doby zmizení modré barvy. Vzorek je inkubován na ledu 5 min (vytvoří se precipitáty) a následně centrifugován při 13.000 x g, 10 min.

1.6. Supernatant (800 µl) je přenesen do kolonky na sběrné zkumavce, které jsou poté vloženy do rotoru mikrocentrifugy a centrifugovány při 13.000 x g, 1 min.

1.7. Po centrifugaci je roztok ve sběrné zkumavce odstraněn a kolonka je vpravena zpět na tuto zkumavku. Následně je vpraven **Wash buffer [L2]** (700µl) do kolonky a vzorek je centrifugován při 13.000 x g, 1 min.

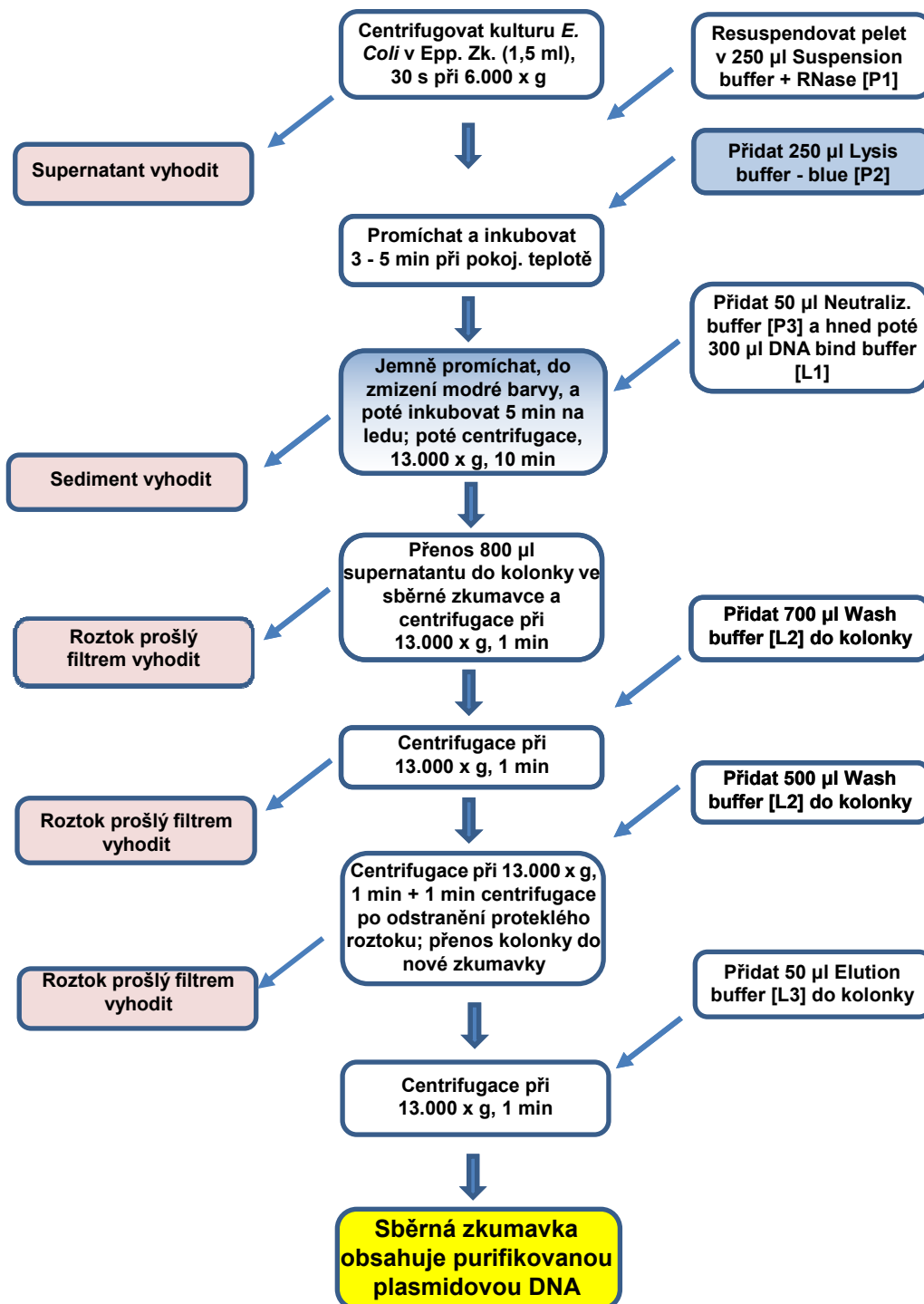
1.8. Tekutina prošlá přes filtr se odstraní odsátím, na kolonku se přidá opět **Wash buffer [L2]** (500µl) a kolonka se stočí při 13.000 x g, 1 min.

1.9. Tekutina prošlá filtrem se odstraní a kolonkový set opět stočí při maximální rychlosti 1 min, pro odstranění zbytkového wash buffer [L2].

1.10. Kolonka s navázaným plasmidem je přenesena do čisté 1,5 ml Eppendorf zkumavky a do kolonky je vpraven **Elution buffer [L3]**. Po 2 min kolonkový set centrifugován při 13.000 x g, 1 min (dojde k uvolnění DNA a její akumulaci na dně Eppendorf zkumavky). Při požadavku na kvantitativní vymytí DNA z kolonek lze vpravit do kolonek ještě jednou 50 µl elučního pufru, popřípadě eluční pufr zahřátý na 50°C a centrifugaci opakovat.

1.11. Sběrná Eppendorf zkumavka obsahuje plasmidovou DNA, která může být přímo použita pro sekvenování, klonování nebo další aplikace, popřípadě skladována v kapalném (+2 - +8oC) nebo pevném stavu (-15 - -80°C).

Obr. 1. Schéma izolace plasmidové DNA



2. Izolace DNA fragmentů z agarózového gelu

Tato metoda je založena na solubilizaci agarózového gelu v DNA bind pufru (obsahující GITC) a vazbě DNA na DNA bind kolonky v přítomnosti GITC. Po promytí nenavázaného materiálu je čistá DNA uvolněna elučním pufrem během centrifugace.

2.1. Pomocí skalpelu nebo žiletky vyříznout z gelu část obsahující fragment DNA. Gel zvážit a přidat 3 objemové díly **DNA bind buffer [L1]**. Hmotnost vyříznutého gelu je nutno minimalizovat, protože některé šarže agarózy inhibují vazbu DNA na membrány kolonky. Použití agarózy s nízkým bodem tuhnutí ("Low melting") zvyšuje výtěžnost DNA.

2.2. Inkubovat vzorek 5 - 10 min při 55°C (dojde k rozpuštění agarózy).

2.3. Roztok obsahující rozpuštěnou agarózu a DNA je převeden do kolonky DNA bind setu. Kolonkový set je vpraven do rotoru stolní mikrocentrifugy a vzorek je centrifugován při 13.000 x g po 1 min. V případě většího množství roztoku je proces opakován.

2.4. Roztok prošlý filtrem kolonky odstranit a kolonku znovu umístit na stejnou sběrnou zkumavku. Poté je přidán **Wash buffer [L2]** (700 µl) a set je centrifugován při 13.000 x g 1 min.

2.5. Roztok prošlý filtrem kolonky vyhodit, přidat opět **Wash buffer [L2]** (500 µl) a centrifugován vzorek při 13.000 x g 1 min.

2.6. Roztok prošlý filtrem kolonky opět vyhodit a vzorek centrifugovat při 13.000 x g 1 min pro odstranění zbytkového promývacího pufru.

2.7. Kolonka s navázanou DNA je přenesena do nové 1,5 ml zkumavky Eppendorf a do kolonky je vpraven **Elution buffer [L3]** (50 µl). Po dvou minutách je kolonkový set centrifugován při 13.000 x g po 1 min (dojde k vymytí DNA a její akumulaci na dně sběrné zkumavky). Při požadavku na účinnější vymytí DNA lze vpravit do kolonky ještě dalších 50 µl **elučního pufru** a centrifugaci opakovat. Dalšího zvýšení eluce DNA lze dosáhnout zahřátím elučního pufru na 50°C před jeho vpravením do kolonky.

2.8. Čistá DNA v Eppendorf zkumavce může být použita bezprostředně pro další manipulace nebo skladována při +2 - +8°C nebo -15 to -80°C pro pozdější užití.

3. Izolace DNA z roztoků

Tato metoda je založena na smíchání roztoku obsahujícího DNA s DNA bind pufrem a následné vazbě DNA na DNA bind kolonku. Po odmytí nenavázaného materiálu je čistá DNA uvolněna elučním pufrem během centrifugace.

3.1. Roztok obsahující DNA je smíchán s dvojnásobným objemem DNA **bind buffer [L1]** a následně inkubován minimálně 1 min při pokojové teplotě.

3.2. Následně je roztok (<800 µl) převeden do kolonky na sběrné zkumavce. Tento set je umístěn do rotoru mikrocentrifugy a centrifugován při 13.000 x g po 1 min. V případě většího množství vzorku je tento proces opakován.

3.3. Roztok prošlý filtrem kolonky je odstraněn a kolonka je umístěna na stejnou sběrnou zkumavku. Poté je přidán **Wash buffer [L2]** (700 µl) a set je centrifugován při 13.000 x g 1 min.

3.4. Roztok prošlý filtrem kolonky je odstraněn a je opět přidán **Wash buffer [L2]** (500 µl); kolonkový set je centrifugován při 13.000 x g 1 min.

3.5. Roztok prošlý filtrem kolonky je odstraněn a kolonka je centrifugována při 13.000 x g po 1 min (pro odstranění zbytkového promývacího pufru).

3.6. Kolonka s navázanou DNA je přenesena do nové 1,5 ml zkumavky Eppendorf a do kolonky je vpraven **Elution buffer [L3]** (50 µl). Po dvou minutách je kolonkový set centrifugován při 13.000 x g po 1 min (dojde k vymytí DNA a její akumulaci na dně sběrné zkumavky). Při požadavku na účinnější vymytí DNA z kolonky lze vpravit do kolonky ještě

dalších 50 µl **elučního pufru** a centrifugaci opakovat. Dalšího zvýšení eluce DNA lze dosáhnout zahřátím elučního pufru na 50°C před jeho vpravením do kolonky.

3.7. Čistá DNA v Eppendorf zkumavce může být použita bezprostředně pro další manipulace nebo skladována při +2 - +8°C nebo -15 to -80°C pro pozdější užití.

4. Izolace genomové DNA

Genomová DNA izolovaná níže uvedeným způsobem je vhodná pro PCR a qPCR amplifikace.

4.1. Je připravena buněčná suspenze v PBS (0,1 - 10 x 10⁶ buněk/ml). Alternativně je lidská nebo zvířecí krev odebrána do EDTA [například smícháním 50 µl 50 mM EDTA s 0,5 ml krve].

4.2. V 1,5 ml zkumavce typu Eppendorf smíchat 3 díly **DNA vazebného pufru [L1]** s 1 dílem (nebo méně) buněčné suspenze nebo krve v EDTA.

4.3. Směs je inkubována 10 min při pokojové teplotě za jemného míchání každé 2 min.

4.4. Vzorek je centrifugován na stolní mikrocentrifuze při 6.000 x g po 30 s.

4.5. Supernatant (<800 µl) převeden do kolonky na sběrné zkumavce. Tento set je umístěn do rotoru mikrocentrifugy a centrifugován při 13.000 x g po 1 min. V případě většího množství vzorku je tento proces opakován.

4.6. Roztok prošlý filtrem kolonky je odstraněn a kolonka je umístěna na stejnou sběrnou zkumavku. Poté je přidán **Wash buffer [L2]** (700 µl) a set je centrifugován při 13.000 x g 1 min.

4.7. Roztok prošlý filtrem kolonky je odstraněn, a je opět přidán **Wash buffer [L2]** (500 µl) a set je centrifugován při 13.000 x g 1 min.

4.8. Roztok prošlý filtrem kolonky je odstraněn a kolonka je centrifugována při 13.000 x g 1 min (pro odstranění zbytkového promývacího pufru).

4.9. Kolonka s navázanou DNA je přenesena do nové 1,5 ml zkumavky Eppendorf a do kolonky je vpraven **Elution buffer [L3]** (50 µl). Po dvou minutách je kolonkový set centrifugován při 13.000 x g, 1 min (dojde k vymytí DNA a její kumulaci ve sběrné zkumavce). Při požadavku na účinnější vymytí DNA z kolonky lze vpravit do kolonky ještě dalších 50 µl **elučního pufru** a centrifugaci opakovat. Dalšího zvýšení eluce DNA lze dosáhnout zahřátím elučního pufru na 50°C před jeho vpravením do kolonky.

4.10. Čistá DNA v Eppendorf zkumavce může být použita bezprostředně pro další manipulace nebo skladována při +2 - +8°C nebo -15 to -80°C pro pozdější užití.

Kat. č.	Název výrobku a specifikace	Množství
D201	Column DNA Lego Kit, 200 izolací	1 kit
D202	Column DNA Lego Kit + plasmid supplement, 200 izolací	1 kit
Náhradní komponenty		
D203	DNA bind columns (50) and collection tubes (50)	1 krabička
D204	DNA bind buffer [L1]	60 ml
D205	Wash buffer [L2]	250 ml
D206	Elution buffer [L3]	20 ml
D207	Suspension buffer [P1]	50 ml
D106	RNase A, DNase-free (10 mg/ml)	0,5 ml
D208	Lysis buffer - blue [P2]	50 ml
D209	Neutralization buffer [P3]	10 ml

