

Oprensning af DNA fra prøven ved hjælp af DNeasy PowerSoil Kit

Tidsforbrug

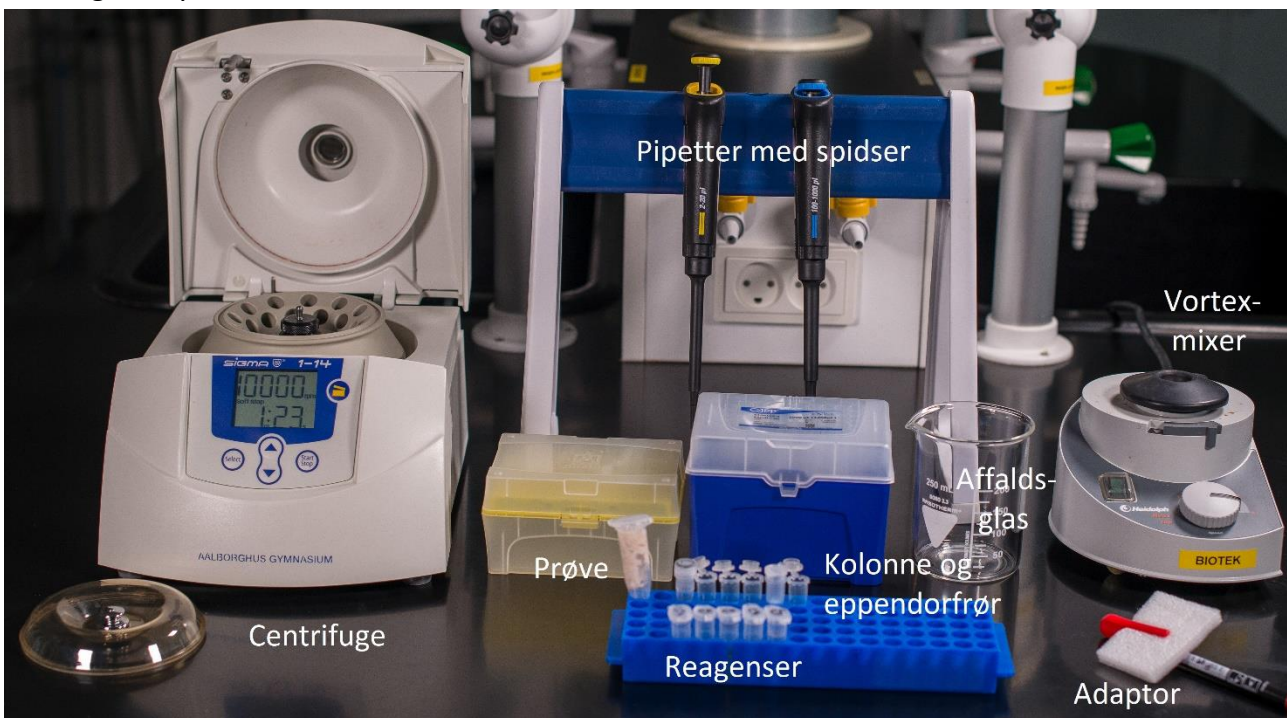
60 minutter

Princip

Der findes flere forskellige kits til oprensning af DNA. Her anvendes DNeasy PowerSoil Kit, som er et allround-kit. Det kan anvendes til fx jordprøver, cellekulturer, surdej mv.

Kittet nedbryder cellevægge, celledembraner og partikler i prøven ved at prøven rystes kraftigt med små metalkugler (powerbeads). Herefter fjernes protein, carbohydrater, humussyrer og andre stoffer ved fældning og centrifugering. Til sidst udfældes DNA med isopropanol i et silika-filter, mens de øvrige urenheder centrifugeres fra. DNA opløses igen i en buffer.

Afhængigt af prøven kan man variere den tid, prøverne rystes med powerbeads, så DNA ikke rives for meget i stykker.



Materialer

- 0,25 g eller 0,25 mL prøve
- DNeasy PowerSoil Kit indeholdende:
 - PowerBead Tubes,
 - 2 mL prøverør,
 - MB Spin-kolonner (indeholder silika-filter, som kan binde DNA)
 - Reagenserne C1-C6:
 - C1 (powerbeads, som ødelægger cellevægge og andre materialer i prøven mekanisk. C1 kan udfælde. I så fald opvarmes den til 60°C til den opløses)
 - C2 (udfælder protein, som kan fjernes med pellet)
 - C3 (udfælder andre forurenende stoffer, herunder humussyrer)
 - C4 (binder DNA til kolonnens silika-filter)

- C5 (isopropylalkohol til udfældning af DNA)
- C6 (buffer til opløsning og opbevaring af DNA).
- Vortexer, gerne en, som kan stilles til konstant rystning
- Adaptor til vortexer: Pen med lommeclip og rundt hoved med skumplastplade med huller (se foto).
- Centrifuge til 2 mL prøverør (10 000 rpm)
- Mikropipetter med pipettespidser (20-200 μ L, 100-1000 μ L)

Fremgangsmåde

Generelt: Brug handsker og skift pipettespids mellem hver afpipettering. Hold orden og opsaml pipettespidser ol. i affaldsglasset.

1. For hver prøve mærkes følgende rør med prøve, rørnummer og gruppenummer (**se foto!**):

- Rør 1: 1 stk. PowerBead rør
- Rør 2: 2 mL prøverør
- Rør 3: 2 mL prøverør
- Rør 4: 2 mL prøverør
- Rør 5: 1 stk. MB Spin-kolonne
- Rør 6: 2 mL prøverør.

2. Tilsæt 60 μ L C1 til **Rør 1: PowerBead-røret**.

3. Tilsæt 0,25 g prøve til PowerBead-røret.

4. Vend røret nogle gange og vortex den til prøven er opløst.

5. Monter PowerBead-røret (evt flere grupper sammen) i vortex-adaptoren. **Se foto!**

6. Sæt adaptoren i vortexeren og vortex prøverne høj hastighed i op til 10 minutter. For jordprøver og fx surdej vælges 10 min. For renkulturer vælges ca. 3 min.

7. Centrifuger rørene ved 10 000 rpm i 30 sek.

8. Overfør 400-500 μ L supernatant til **rør 2** (2 mL prøverør). Der kan være lidt urenheder i supernatanten.

9. Tilsæt 250 μ L C2. Vortex i 5 sek.

10. Centrifuger ved 10 000 rpm i 1 min.

11. Overfør op til 600 μ L supernatant til **rør 3** (nyt 2 mL prøverør). Undgå at få pellet med!

12. Tilsæt 200 μ L C3 og vortex kort.

13. Centrifuger ved 10 000 rpm i 1 min.

14. Overfør op til 750 μ L af supernatanten til **rør 4** (nyt 2 mL prøverør). Undgå pellet!

15. Ryst C4 og overfør 1200 μ L til supernatanten i rør 4. Du kan gøre det ad 2 omgange (2 x 600 μ L). Luk låget forsigtigt og vortex i 5 sek, røret er helt fuldt.

16. Load 675 μ L til **rør 5: MB spin-kolonnen**.



17. Centrifuger ved 10 000 rpm i 1 min. Rør 5 har under kolonnen med filteret et opsamlingsrør. Tag forsigtigt opsamlingsrøret af, og tøm væsken ud af opsamlingsrøret. Monter det igen. **Se foto!**
18. Gentag trin 15 og 16 to gange mere, så hele prøven køres gennem kolonnen.
19. Tilsæt 500 µL C5 til kolonnen.
20. Centrifuger 30 sek. ved 10 000 rpm.
21. Hæld væsken i opsamlingsrøret væk.
22. Centrifuger igen 1 min ved 10 000 rpm
23. Tag forsigtigt MB Spinkolonnen ud af opsamlingsrøret, og placer det i **rør 6** (et rent 2 mL prøverør). Undgå at få C5-dråber på kolonnen. Tør kolonnen kortvarigt ved at lade låget stå åbent, så al C5 (isopropylalkohol) er fordampet. Det er vigtigt, for at DNA efterfølgende kan opløses fra membranen.
24. Afpipetter 50 µL C6 i midten af den hvide filtermembran.
25. Centrifuger 30 sek. Ved 10 000 rpm.
26. Kasser kolonnen (rør 5), **gem rør 6, som nu indeholder DNA'et.**



Note: Opløsning C6 er en buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5). Den kan ved oprensningen erstattes af DNase-frit vand, men er en fordel hvis prøven skal gemmes. Prøven kan anbringes i fryser hvor DNA er stabilt i flere år.

Prøven skal anvendes til PCR, men først skal koncentrationen af DNA måles, så den rette mængde DNA kan afpipetteres til PCR.

Benyt vejledning D til kittet "HS dsDNA" (high sensitivity dobbeltstrenget DNA) for Qubit4 fluorimeter.