

Laboratoriumprotocol voor handmatige zuivering van DNA uit een monster van 0,5 mL

Voor de zuivering van genomisch DNA uit de afnamekits van de serie Oragene® en ORAcollect®.

Bezoek onze website op www.dnagenotek.com voor meer talen en protocollen.

Het volgende protocol beschrijft stap voor stap hoe DNA uit een 500 µL aliquot van een monster moet worden gezuiverd.

Inclusief reagentia

- prepIT®•L2P (catalogus #: PT-L2P)

Apparatuur en reagentia

- Microcentrifuge met een capaciteit van 15.000 × g
- Microbuisjes van 1,5 mL (bijv. Axygen #MCT-150-C)
- Lucht- of waterincubator van 50°C
- Ethanol (95%-100%) op kamertemperatuur
- Ethanol (70%) op kamertemperatuur
- DNA-opslagbuffer: TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) of vergelijkbare oplossing

Procedure

Zuiveringsstappen	Opmerkingen
1. Meng het monster in de DNA Genotek kit door omkeren en enkele seconden voorzichtig te schudden.	<ul style="list-style-type: none">• Hierdoor worden de viskeuze monsters correct gemengd.
2. Incubeer het monster bij 50°C minimaal 1 uur in een waterincubator of minimaal 2 uur in een luchtincubator. Opm: Gebruik van een luchtincubator heeft de voorkeur, omdat de monsterbuisjes in water kunnen gaan drijven. Als een waterbad moet worden gebruikt, controleer dan of de buisjes met monstermateriaal ondergedompeld blijven.	<ul style="list-style-type: none">• Deze warmtebehandeling is essentieel, omdat in deze stap het DNA goed vrijkomt en de nucleasen permanent geïnactiveerd worden.• Deze incubatiestap kan op elk moment worden uitgevoerd nadat het monster is afgenomen en voordat het wordt gezuiverd.• Het hele monster moet voor de juiste homogeniteit van het monster geïncubeerd worden in de oorspronkelijke afnamebuis voordat het in aliquots wordt opgedeeld.• Het monster kan een nacht bij 50°C worden geïncubeerd als dat beter uitkomt.• Een langere periode is nodig in een luchtincubator, omdat homogenisatie door temperatuur in een waterincubator langzamer verloopt.
3. Breng 500 µL van het gemengde monster over in een microcentrifugebuis van 1,5 mL.	<ul style="list-style-type: none">• De rest van het monster kan worden bewaard bij kamertemperatuur of bevroren (-15°C tot -20°C).

Zuiveringsstappen	Opmerkingen
4. Voeg voor een monster van 500 μ L 20 μ L (1/25ste deel) PT-L2P toe in de microcentrifugebuis en meng het enkele seconden door te vortexen.	<ul style="list-style-type: none"> Het monster wordt troebel, omdat onzuiverheden en remmers neerslaan.
5. Incubeer het 10 minuten in ijs.	<ul style="list-style-type: none"> Incubatie op kamertemperatuur is ook mogelijk, maar dat verwijdert de onzuiverheden minder effectief.
6. Centrifugeer bij kamertemperatuur gedurende 5 minuten op 15.000 \times g.	<ul style="list-style-type: none"> Langer centrifugeren (tot 15 minuten) kan de troebelheid (hoog A_{320}) van de uiteindelijke DNA-oplossing verder verminderen.
7. Breng het heldere supernatant voorzichtig met een pipet over in een schoon microcentrifugebuisje. Gooi de pellet met onzuiverheden weg.	<ul style="list-style-type: none"> De pellet bevat troebele onzuiverheden. Als de pellet per ongeluk wordt verstoord, moet de buis weer worden gecentrifugeerd.
8. Voeg aan 500 μ L supernatant 600 μ L 95%-100% ethanol op kamertemperatuur toe. Meng voorzichtig door 10 x om te keren.	<ul style="list-style-type: none"> Tijdens het mengen met ethanol zal het DNA neerslaan. Dit lijkt op een klontje DNA-vezels of op een fijne neerslag, afhankelijk van de hoeveelheid DNA in het monster. Zelfs als geen klontje wordt waargenomen, wordt het DNA verkregen door de volgende stappen zorgvuldig uit te voeren.
9. Laat het monster 10 minuten bij kamertemperatuur staan, zodat het DNA volledig kan neerslaan.	<ul style="list-style-type: none"> Incubatie bij -20°C wordt niet aanbevolen omdat onzuiverheden samen met het DNA kunnen neerslaan.
10. Plaats het buisje in de microcentrifuge in een bekende oriëntatie. Centrifugeer bij kamertemperatuur ca. 2 minuten op 15.000 \times g.	<ul style="list-style-type: none"> Plaats bijvoorbeeld elk buisje in de microcentrifuge zo dat het draaidopje weg van het midden wijst. Na het centrifugeren kan de positie van de pellet worden gevonden (zelfs als deze nauwelijks zichtbaar is); aan het uiteinde van het buisje vlak onder het schroefdoopje.
11. Verwijder het supernatant voorzichtig met een pipet en gooi het weg. Verstoor de DNA-pellet hierbij niet.	<ul style="list-style-type: none"> Deze pellet bevat DNA. Verlies van de pellet betekent verlies van het DNA. Door het buisje zo te draaien dat de pellet aan de bovenkant komt te liggen, kunt u veilig met een pipet langs de onderkant al het supernatant verwijderen. Het supernatant kan onzuiverheden bevatten en moet als het kan volledig worden verwijderd. Buitensporig drogen van de pellet maakt het moeilijker het DNA op te lossen.

Zuiveringsstappen	Opmerkingen
12. Wassen met ethanol: Voeg voorzichtig 250 µL 70% ethanol toe. Laat het 1 minuut bij kamertemperatuur staan. Verwijder alle ethanol zonder de pellet te verstoren.	<ul style="list-style-type: none"> • Het is belangrijk alle ethanol uit het monster te verwijderen. Overdracht van ethanol kan de prestatie van het assay negatief beïnvloeden. • Verstoor de DNA-pellet niet. • De DNA-pellet kan klein zijn. • Als de pellet loskomt, centrifugeer het monster 5 minuten op 15.000 × g. • Nadat de 70% ethanol is verwijderd, kan het buisje gecentrifugeerd worden met de pulse knop om de resterende ethanol te verwijderen.
13. Voeg 100 µL TE-oplossing (zie pagina 1) toe om de DNA-pellet op te lossen. Vortex minimaal 5 seconden.	<ul style="list-style-type: none"> • Als een hogere concentratie DNA vereist is, moet 50 µL TE worden gebruikt. • Opm: grote hoeveelheden DNA met hoog moleculair gewicht kunnen langzaam volledig hydrateren (oplossen). • Onvolledige hydratatie van het DNA kan leiden tot een onnauwkeurige schatting van de DNA-concentratie en het mislukken van latere toepassingen zoals PCR.
14. Incubatie bij kamertemperatuur gedurende een nacht gevolgd door vortexen of gedurende 1 uur bij 50°C met zo nu en dan vortexen zorgt voor een volledige hydratatie van het DNA (pellet en uitstrijkpreparaat).	<ul style="list-style-type: none"> • Onvolledige rehydratatie van het DNA kan leiden tot een onnauwkeurige schatting van de DNA-concentratie en het mislukken van latere toepassingen zoals PCR.
15. Opslagmogelijkheden van het volledig gerehydrateerde DNA: a) Aanbevolen in TE, in aliquots bij 20°C voor langdurige opslag, of b) In TE bij 4°C gedurende maximaal 2 maanden.	<ul style="list-style-type: none"> • Wanneer gezuiverd DNA in TE wordt ingevroren, zal het DNA neerslaan. Bij het ontdooien van een monster bevroren, gezuiverd DNA dient men te letten op rehydratatie, zoals besproken in stap 14.

Kwantificeren van DNA

Door de fluorescentiemethode

Assays die gebruikmaken van fluorescerende kleurstoffen zijn specifiekker dan absorptie bij 260 nm voor het kwantificeren van de hoeveelheid dsDNA (dubbelstrengig DNA) in een DNA-monster. Wij adviseren fluorescerende kleurstoffen zoals PicoGreen® of SYBR® Green I te gebruiken voor het kwantificeren van dsDNA, omdat er minder interferentie is door vervuilend RNA. Een goedkoop protocol met behulp van SYBR Green I wordt beschreven in PD-PR-075, *DNA quantification using SYBR Green I Dye and a micro-plate reader*¹. Men kan ook in de handel verkrijgbare kits zoals Invitrogen's Quant-iT™ PicoGreen dsDNA Assay Kit (cat nr. Q-33130) gebruiken. Wij adviseren voor beide protocollen het gezuiverde DNA 1:50 te verdunnen met TE-oplossing en om 5 µL te gebruiken in de kwantificatie-assay.

Met de absorptiemethode

Als u DNA wilt kwantificeren door absorptie, adviseren wij u eerst het gezuiverde monster met RNase te behandelen om het vervuilende RNA af te breken en vervolgens de RNA-fragmenten te verwijderen door ethanol precipitatie van het DNA. Een gedetailleerd protocol wordt beschreven in PD-PR-040, *RNA removal by double-RNase digestion*². NB: DNA uit een oraal monster bevat aanzienlijk meer RNA dan DNA uit een bloedmonster. Zorg ervoor dat met alcohol neergeslagen DNA volledig oplost voordat de absorptie wordt gelezen.

Omrekeningsfactoren: Een absorptie van 1,0 bij 260 nm komt overeen met een concentratie van 50 ng/ μ L (50 μ g/mL) voor zuiver dsDNA.

Zorg ervoor dat de absorptiewaarden binnen het lineaire bereik van de spectrofotometer valt. Verdun en meet de monsters opnieuw die buiten het lineaire bereik vallen. Raadpleeg de documentatie bij uw toestel voor meer informatie.

Methode:

1. Verdun een 10 μ L aliquot gezuiverd RNase-behandeld DNA met 90 μ L TE (1/10 verdunning). Meng voorzichtig door op en neer te pipetteren. Wacht tot de bubbeltjes verdwijnen.
2. Gebruik TE in de referentie (lege) cel.
3. Meet absorptie bij 320 nm, 280 nm en 260 nm.
4. Bereken gecorrigeerde A_{280} en A_{260} waarden door de absorptie bij 320 nm (A_{320}) af te trekken van de A_{280} en A_{260} waarden.
5. DNA concentratie in ng/ μ L = gecorrigeerd $A_{260} \times 10$ (verdunningsfactor) $\times 50$ (conversiefactor).
6. A_{260}/A_{280} ratio: Deel gecorrigeerd A_{260} door gecorrigeerd A_{280} .

Voorbeeld

1. Veronderstel het volgende: $A_{320} = 0,025$, $A_{280} = 0,175$ en $A_{260} = 0,295$
2. De DNA-concentratie van het onverdunde monster is:
 $(A_{260} - A_{320}) \times 10$ [verdunningsfactor] $\times 50$ [conversiefactor]
 $= (0,295 - 0,025) \times 10 \times 50$
 $= 0,270 \times 10 \times 50$
 $= 135 \text{ ng}/\mu\text{L}$ of $135 \text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$
3. De gecorrigeerde A_{260}/A_{280} ratio is:
 $(A_{260} - A_{320}) \div (A_{280} - A_{320})$
 $= (0,295 - 0,025) \div (0,175 - 0,025)$
 $= 0,270 \div 0,150$
 $= 1,80$

Verwijzingen

- ¹ DNA-kwantificatie met behulp van fluorescentie/DNase (F/D) assay. Vervangen door DNA-kwantificatie met behulp van SYBR Green I kleurstof en een microplaat lezer. DNA Genotek. PD-PR-075.
- ² RNA-verwijdering door dubbele RNase afbreking. DNA Genotek. PD-PR-040.

Technische ondersteuning is beschikbaar van maandag t/m vrijdag (9.00-17.00 EST):

- Gratis nummer (vanuit Noord-Amerika): 1.866.813.6354, keuze 6
- Alle andere landen: 613.723.5757, keuze 6
- E-mail: support@dnagenotek.com

Oragene®-DNA en ORAcollect®-DNA worden niet verkocht in de Verenigde Staten.

Oragene®-DISCOVER is alleen bedoeld voor onderzoeksdoeleinden, niet voor diagnostische procedures.

Sommige DNA Genotek-producten zijn mogelijk niet in alle geografische regio's verkrijgbaar.

*Oragene, prepIT en ORAcollect zijn gedeponeerde handelsmerken van DNA Genotek Inc. Alle overige merken en productnamen in deze documentatie zijn eigendom van hun betreffende fabrikanten.

Alle DNA Genotek producten, technische documentatie en toepassingsaantekeningen, zijn beschikbaar in het onderdeel 'support' van onze website op www.dnagenotek.com.

Verkorte handleiding:

Laboratoriumprotocol voor handmatige zuivering van DNA van een monster van 0,5 mL

Zuiveringsstappen
1. Meng het monster in de DNA Genotek kit door omkeren en enkele seconden voorzichtig te schudden.
2. Incubeer het monster bij 50°C minimaal 1 uur in een waterincubator of minimaal 2 uur in een luchtincubator.
3. Breng 500 µL van het monster over in een microcentrifugebuis.
4. Voeg 20 µL volume PT-L2P toe en meng enkele seconden door te vortexen.
5. Incubeer 10 minuten in ijs.
6. Centrifugeer bij kamertemperatuur (RT) gedurende 5 minuten op 15.000 × g.
7. Breng het grootste deel van het zuivere supernatant voorzichtig met een pipet over in een schoon microcentrifugebuisje. Gooi de pellet weg.
8. Voeg 600 µL 95%-100% ethanol op kamertemperatuur toe aan het heldere supernatant. Meng voorzichtig door 10 x om te keren.
9. Laat het monster 10 minuten bij kamertemperatuur staan, zodat het DNA volledig neerslaat.
10. Plaats het buisje in de centrifuge in een bekende oriëntatie. Centrifugeer 2 minuten op 15.000 × g bij kamertemperatuur.
11. Pipetteer het supernatant voorzichtig weg en gooi het weg. Verstoor de DNA-pellet hierbij niet.
12. Voeg 250 µL 70% ethanol toe en laat het 1 minuut staan bij kamertemperatuur. Verwijder alle ethanol zonder de pellet te verstoren.
13. Voeg 100 µL TE-oplossing toe en vortex het monster ten minste 5 seconden.
14. Incubeer een nacht bij kamertemperatuur of bij 50°C gedurende 1 uur en vortex het zo nu en dan.
15. Bewaren: In aliquots bij -20°C voor langdurige opslag (aanbevolen) of bij 4°C gedurende maximaal 2 maanden.