

Laborprotokoll für manuelle Aufreinigung von DNA aus einer 0,5-mL-Probe

Für die Aufreinigung genomischer DNA aus den Probenahme-Kit-Familien Oragene® und ORAcollect®.

Auf unserer Webseite www.dnagenotek.com finden Sie weitere Sprachen und Protokolle.

Das folgende schrittweise Protokoll beschreibt, wie DNA aus einem 500-µL-Aliquot einer Probe aufgereinigt wird.

Reagenzien beinhaltet

- prepIT®•L2P (Katalognummer: PT-L2P)

Ausrüstung und Reagenzien

- Mikrozentrifuge mit einer Schleuderziffer von $15.000 \times g$
- 1,5-mL-Mikroröhren (z. B. Axygen #MCT-150-C)
- Luft- oder Wassermantel-Inkubator bei 50 °C
- Ethanol (95 % bis 100 %) bei Raumtemperatur
- Ethanol (70 %) bei Raumtemperatur
- DNA-Speicherpuffer: TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) oder ähnliche Lösung

Verfahren

Aufreinigungsschritte	Bemerkungen
1. Mischen Sie die Probe im DNA-Genotek-Kit durch Inversion und einige Sekunden leichtes Schütteln.	• So wird sichergestellt, dass dickflüssige Proben ordnungsgemäß durchgemischt werden.
2. Inkubieren Sie die Probe bei 50 °C in einem Wassermantel-Inkubator mindestens 1 Stunde lang oder in einem Luftmantel-Inkubator mindestens 2 Stunden lang. Hinweis: Der Verwendung eines Luftmantel-Inkubators wäre unter Umständen Vorzug zu geben, da die Probenröhrchen gegebenenfalls in einem Wasserbad schwimmen könnten. Wenn ein Wasserbad verwendet werden muss, stellen Sie sicher, dass der Teil des Röhrchens, der die Probe enthält, unter Wasser getaucht bleibt.	<ul style="list-style-type: none"> • Dieser Schritt der Hitzebehandlung ist wichtig, um sicherzustellen, dass die DNA adäquat freigesetzt wird und Nukleasen permanent inaktiviert werden. • Die Inkubation kann zu jedem Zeitpunkt durchgeführt werden, nachdem die Probe entnommen und bevor sie aufgereinigt wird. • Die gesamte Probe muss vor dem Aliquotieren im Originalbehälter inkubiert werden, um Probenhomogenität zu garantieren. • Die Probe kann bei Bedarf auch über Nacht bei 50 °C inkubiert werden. • Die Inkubation in einem Luftmantel-Inkubator erfordert mehr Zeit, da der Temperatureausgleich im Vergleich zum Wassermantel-Inkubator mehr Zeit in Anspruch nimmt.
3. Füllen Sie 500 µL der gemischten Probe in ein 1,5-mL-Mikrozentrifugen-Röhrchen.	• Der Rest der Probe kann bei Raumtemperatur oder gefroren gelagert werden (-15 °C bis -20 °C).
4. Fügen Sie für eine 500 µL Probe dem Mikrozentrifugen-Röhrchen 20 µL (1/25 Vol.) PT-L2P hinzu und vortexen Sie es einige Sekunden.	• Die Probe wird trüb, während Fremdkörper und Inhibitoren präzipitiert werden.
5. 10 Minuten auf Eis inkubieren.	• Stattdessen kann die Inkubation auch bei Raumtemperatur erfolgen; dabei werden jedoch Fremdkörper etwas weniger effektiv entfernt.

Aufreinigungsschritte	Bemerkungen
6. Bei Raumtemperatur und 15.000 × g 5 Minuten zentrifugieren.	<ul style="list-style-type: none"> • Eine längere Zentrifugation (bis zu 15 Minuten) kann bei der Reduzierung von Trübungen (hoher A₃₂₀-Wert) in der endgültigen DNA-Lösung von Vorteil sein.
7. Übertragen Sie den klaren Überstand mit einer Pipettenspitze vorsichtig in ein frisches Mikrozentrifugen-Röhrchen. Entsorgen Sie das Pellet, das die Fremdkörper enthält.	<ul style="list-style-type: none"> • Das Pellet enthält Trübungsfremdkörper. Bei versehentlichem Anstoßen bzw. Schütteln sollte das Röhrchen erneut zentrifugiert werden.
8. Fügen Sie 500 µL des Überstands 600 µL 95-% bis 100-% Ethanol (Raumtemperatur) bei. Durch 10-maliges Umdrehen vorsichtig mischen.	<ul style="list-style-type: none"> • Bei der Mischung mit Ethanol wird die DNA abgesondert. Je nach DNA-Menge in der Probe kann die DNA als Klumpen aus DNA-Fasern oder als feiner Bodensatz in Erscheinung treten. • Auch wenn kein Klumpen sichtbar ist, wird die DNA durch sorgfältige Durchführung der nächsten Schritte gewonnen.
9. Lassen Sie die Probe bei Raumtemperatur 10 Minuten stehen, damit sich die DNA vollständig absetzen kann.	<ul style="list-style-type: none"> • Eine Inkubation bei -20 °C wird nicht empfohlen, da Fremdkörper gegebenenfalls gemeinsam mit der DNA co-präzipitiert werden.
10. Platzieren Sie das Röhrchen in bekannter Ausrichtung in der Mikrozentrifuge. Bei Raumtemperatur und 15.000 × g 2 Minuten lang zentrifugieren.	<ul style="list-style-type: none"> • Platzieren Sie beispielsweise alle Röhrchen in der Mikrozentrifuge so, dass das Verbindungsstück zwischen Deckel und Röhrchen vom Zentrum des Rotors weg zeigt. Nach der Zentrifugation kann die Position des Pellets lokalisiert werden (selbst wenn es so klein ist, dass es kaum sichtbar ist). Es wird sich in diesem Fall an der Spitze des Röhrchens unterhalb der Deckelverbindung befinden.
11. Entfernen Sie mit einer Pipette vorsichtig den Überstand und entsorgen Sie ihn. Achten Sie darauf, das DNA-Pellet nicht zu beschädigen.	<ul style="list-style-type: none"> • Dieses Pellet enthält DNA. Kommt es zu einem Verlust des Pellets, geht die DNA verloren. • Ein Drehen des Röhrchens, sodass das Pellet sich an der oberen Wand befindet, erlaubt Ihnen, eine Pipettenspitze sicher entlang der unteren Wand entlangzubewegen und den gesamten Überstand zu entfernen. • Der Überstand enthält gegebenenfalls Fremdkörper und sollte so vollständig wie möglich entfernt werden. • Übermäßiges Trocknen des Pellets kann dazu führen, dass die DNA sich nicht mehr so leicht löst.
12. Ethanol-Wäsche: Fügen Sie vorsichtig 250 µL 70-% Ethanol hinzu. 1 Minute bei Raumtemperatur stehen lassen. Entfernen Sie das Ethanol vollständig, ohne das Pellet zu beschädigen.	<ul style="list-style-type: none"> • Es ist wichtig, das Ethanol vollständig aus der Probe zu entfernen. Ethanolreste können das Ergebnis der Probe beeinträchtigen. • Achten Sie darauf, das DNA-Pellet nicht zu beschädigen. • Das DNA-Pellet ist gegebenenfalls recht klein. • Sollte sich das Pellet ablösen, zentrifugieren Sie die Probe 5 Minuten lang bei 15.000 × g. • Nach dem Entfernen des 70-% Ethanols kann das Röhrchen in Intervallen zentrifugiert werden, um das restliche Ethanol zu entfernen.

Aufreinigungsschritte	Bemerkungen
13. Fügen Sie 100 µL TE-Lösung (siehe Seite 1) hinzu, um das DNA-Pellet aufzulösen. Vortexen Sie die Mischung mindestens 5 Sekunden lang.	<ul style="list-style-type: none"> • Wenn eine höhere DNA-Konzentration gewünscht wird, sollten 50 µL TE verwendet werden. • Hinweis: Große Mengen hochmolekularer DNA brauchen unter Umständen sehr lange, bis sie vollständig hydrieren (sich auflösen). • Eine unvollständige Hydratation der DNA ist die Ursache für ungenaue Schätzungen der DNA-Konzentration und kann zum Versagen nachgelagerter Anwendungen wie PCR führen.
14. Um die komplette Rehydratation der DNA (Pellet und Abstrich) sicherzustellen, inkubieren Sie über Nacht bei Zimmertemperatur gefolgt von Vortexen bzw. 1 Stunde lang bei 50 °C mit gelegentlichem Vortexen.	<ul style="list-style-type: none"> • Eine unvollständige Rehydratation der DNA ist die Ursache für ungenaue Schätzungen der DNA-Konzentration und kann zum Versagen nachgelagerter Anwendungen wie PCR führen.
15. Lageroptionen der komplett rehydrierten DNA: a) empfohlen in TE, in Aliquoten bei -20 °C für Langzeitlagerung, oder b) in TE bei 4 °C für bis zu 2 Monate	<ul style="list-style-type: none"> • Ein Einfrieren der aufgereinigten DNA in TE führt dazu, dass die DNA präzipitiert. Achten Sie beim Auftauen einer gefrorenen, aufgereinigten DNA-Probe sorgfältig auf eine Rehydratation, wie in Schritt 14 beschrieben.

Quantifizierung von DNA

Fluoreszenzmethode

Untersuchungen, bei denen fluoreszierende Farbstoffe verwendet werden, sind spezifischer als eine Absorption bei 260 nm, um die Menge doppelsträngiger DNA (dsDNA) in einer DNA-Probe zu quantifizieren. Wir empfehlen die Verwendung fluoreszierender Farbstoffe wie PicoGreen® oder SYBR® Green I, um dsDNA zu quantifizieren, da es so zu weniger Beeinträchtigungen durch Verunreinigung mit RNA kommt. Ein kostengünstiges Protokoll, das SYBR Green I verwendet, wird in PD-PR-075, *DNA quantification using SYBR Green I Dye and a micro-plate reader*¹ beschrieben. Alternativ können gängige Kits wie das Quant-iT™ PicoGreen dsDNA Assay Kit (Kat.-Nr. Q-33130) von Invitrogen verwendet werden. Unabhängig vom Protokoll wird empfohlen, die aufgereinigte DNA mit TE-Lösung (1:50) zu verdünnen und bei der Quantifizierungsuntersuchung 5 µL zu verwenden.

Absorptionsmethode

Wenn Sie die DNA durch Absorption quantifizieren möchten, empfehlen wir, dass Sie die aufgereinigte Probe zunächst mit RNase behandeln, um verunreinigende RNA zu verdauen, und dann die RNA-Fragmente durch Präzipitation der DNA mithilfe von Ethanol entfernen. Ein detailliertes Protokoll wird in PD-PR-040, *RNA removal by double-RNase digestion*² beschrieben. Bitte beachten Sie, dass DNA aus einer Speichelprobe im Vergleich zu DNA aus Blutproben üblicherweise weitaus mehr RNA enthält. Stellen Sie sicher, dass die mit Alkohol präzipitierte DNA vollständig aufgelöst ist, bevor Sie den Absorptionswert ermitteln.

Konversionsfaktor: Eine Absorption von 1,0 bei 260 nm entspricht einer Konzentration von 50 ng/µL (50 µg/mL) für pure dsDNA.

Stellen Sie sicher, dass die Absorptionswerte innerhalb des linearen Bereichs des Spektralphotometers liegen. Verdünnen und messen Sie die Proben, die außerhalb des linearen Bereichs liegen, erneut. Schlagen Sie für weitere Informationen in Ihrer Gerätedokumentation nach.

Methode:

1. Verdünnen Sie ein 10- μ L-Aliquot aufgereinigter RNase-behandelter DNA mit 90 μ L TE (Verdünnung 1/10). Durch leichte Auf- und Abbewegungen mit der Pipette mischen. Warten Sie, bis die Blasen verschwunden sind.
2. Verwenden Sie TE in der (leeren) Referenzzelle.
3. Messen Sie die Absorption bei 320 nm, 280 nm und 260 nm.
4. Kalkulieren Sie die korrigierten A_{280} - und A_{260} -Werte, indem Sie die Absorption bei 320 nm (A_{320}) von den 280- und A_{260} -Werten subtrahieren.
5. DNA-Konzentration in ng/ μ L = korrigiertes $A_{260} \times 10$ (Verdünnungsfaktor) $\times 50$ (Konversionsfaktor).
6. Verhältnis A_{260}/A_{280} : Teilen Sie das korrigierte A_{260} durch das korrigierte A_{280} .

Beispiel

1. Nehmen Sie an, das gemessene A_{320} entspricht = 0,025; A_{280} = 0,175 und A_{260} = 0,295.
2. Die DNA-Konzentration der nicht verdünnten Probe entspricht:
 $(A_{260} - A_{320}) \times 10$ [Verdünnungsfaktor] $\times 50$ [Konversionsfaktor]
 $= (0,295 - 0,025) \times 10 \times 50$
 $= 0,270 \times 10 \times 50$
 $= 135 \text{ ng}/\mu\text{L}$ oder $135 \mu\text{g}/\text{mL}$

Das korrigierte A_{260}/A_{280} -Verhältnis entspricht:

$$\begin{aligned} & (A_{260} - A_{320}) \div (A_{280} - A_{320}) \\ & = (0,296 - 0,025) \div (0,175 - 0,025) \\ & = 0,270 \div 0,150 \\ & = 1,80 \end{aligned}$$

Literatur

1. DNA quantification using Fluorescence/DNase (F/D) assay. Replaced by DNA quantification using SYBR Green I dye and a micro-plate reader (DNA-Quantifizierung mittels Fluoreszenz/DNase (F/D)-Probe. Ersetzt durch DNA-Quantifizierung mittels SYBR-Green-I-Farbe und Mikroplattenleser). DNA Genotek. PD-PR-075.
2. RNA removal by double-RNase digestion (RNA-Entfernung durch doppelte RNase-Verdauung). DNA Genotek. PD-PR-040.

Der Technische Support steht Ihnen montags bis freitags von 9 bis 17 Uhr zur Verfügung:

- Gebührenfrei (Nordamerika): 1.866.813.6354, Option 6
- Alle sonstigen Länder: 613.723.5757, Option 6
- E-Mail: support@dnagenotek.com

Oragene[®]-DNA und ORAcollect[®]-DNA werden in den USA nicht vertrieben.

Oragene[®]-DISCOVER wird ausschließlich zu Forschungszwecken verwendet, nicht bei diagnostischen Verfahren.

Manche Produkte von DNA Genotek stehen möglicherweise nicht in allen geografischen Regionen zur Verfügung.

*Oragene, preplT und ORAcollect sind eingetragene Handelsmarken von DNA Genotek Inc. Alle anderen hierin aufgeführten Marken und Namen sind Eigentum ihrer jeweiligen Inhaber.

Alle DNA-Genotek-Protokolle, -Informationsschriften und -Anwendungshinweise sind im Support-Bereich unserer Website unter www.dnagenotek.com verfügbar.

