

Oprensning af DNA fra prøven ved hjælp af DNeasy PowerSoil Kit

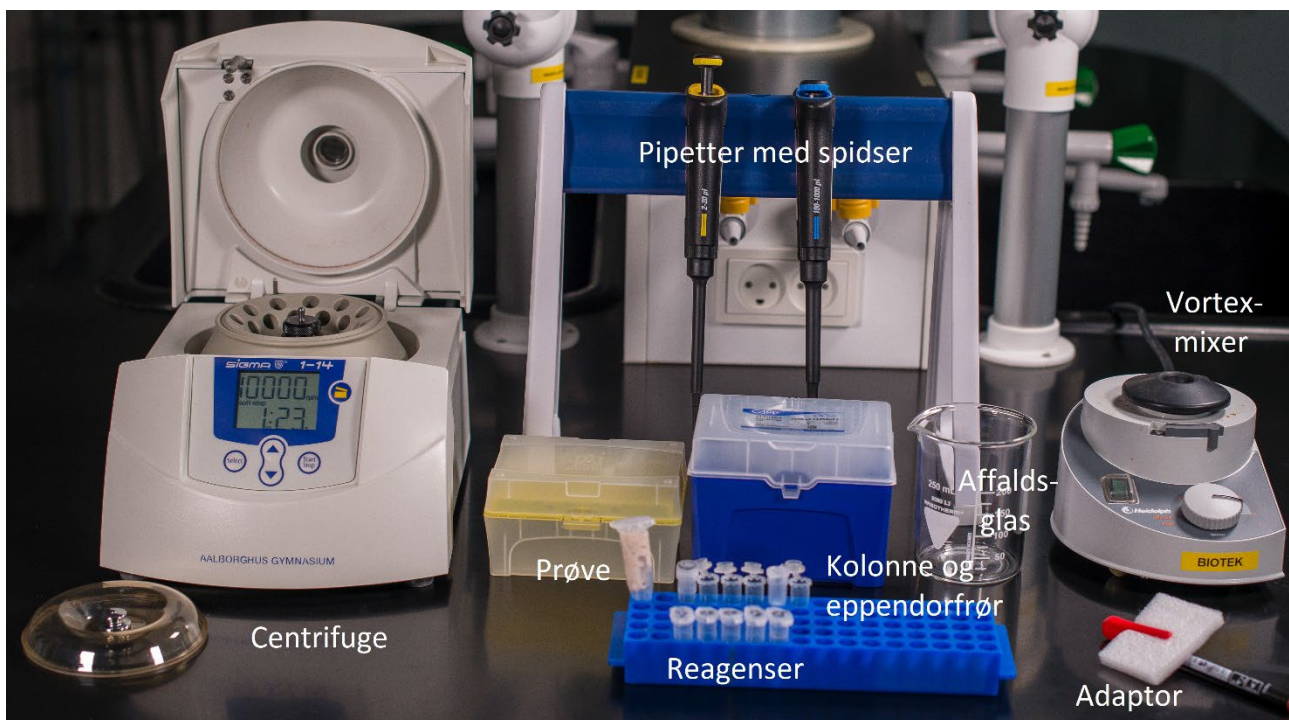
Tidsforbrug

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, cellemembraner 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.



Materialer

- 0,25 g eller 0,25 mL prøve
- Fra DNeasy PowerSoil Kit (antal per prøve der skal analyseres):
 - 1 stk. PowerBead Tubes (indeholder perler, som finder cellevægge mekanisk),
 - 4 stk. 2 mL samlerør (collection tubes),
 - 1 stk. MB Spin-kolonne (indeholder silika-filter, som kan binde DNA)
 - Reagenserne **C1-C6** (volumen per prøve der skal analyseres):
 - 60 μ L **C1** (opløser cellemembran. C1 kan udfælde. I så fald opvarmes den til 60°C til den opløses)
 - 250 μ L **C2** (udfælder protein, som kan fjernes med pellet)
 - 200 μ L **C3** (udfælder andre forurenende stoffer, herunder humussyrer)
 - 1200 μ L **C4** (binder DNA til kolonnens silika-filter). Fordeles evt. i 2 rør.
 - 500 μ L **C5** (isopropylalkohol til udfældning af DNA)

Tekst: Kresten Torp, Fotos: Andreas Vedel

- 50 μ L 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 samlerør (10 000 rpm)
- Mikropipetter med pipettespidser (20-200 μ L, 100-1000 μ L)
- Glas til opsamling af affald og et til kemikalierester.

Fremgangsmåde

Generelt: Brug handsker og skift pipettespids mellem hver afpipettering, så prøven ikke forurenes med DNA. Hold orden og opsaml pipettespidser ol. i affaldsglasset.

Der er mange punkter. Kryds af, som I kommer frem, så I kan huske, hvor langt I er kommet.

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

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

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 10 minutter i vandret position, se foto.

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

8. Overfør 400-500 μ L supernatant (dvs. væsken over bundfaldet) til **rør 2** (2 mL samlerør). Der kan være lidt urenheder i supernatanten.

9. Tilsæt 250 μ L C2. Vortex i 5 sek.

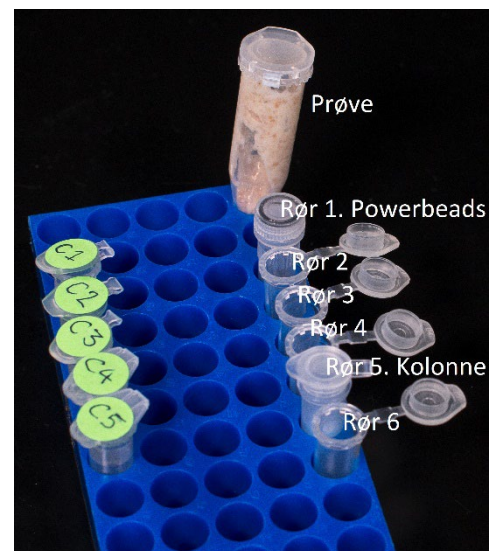
10. Centrifuger ved 10 000 rpm i 1 min.

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



3b Nanopore-sekventering: Oprensning af DNA.

Tekst: Kresten Torp, Fotos: Andreas Vedel

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 spinkolonnen**.
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 fra opsamlingsrøret ud i affaldsglasset. Monter det igen. **Se foto!**
18. Gentag trin 16 og 17 to gange mere, så hele prøven køres gennem kolonnen.
19. Tilsæt 500 μ L C5 til kolonnen.
20. Centrifuger 30 sek. ved 10 000 rpm.
21. Hæld væsken i opsamlingsrøret i affaldsglasset.
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 samlerør). Undgå at få C5-dråber på kolonnen. Tør kolonnen i 2 minutter 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 μ L 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**. Skriv jeres gruppenummer /prøvenummer på røret med en vandfast tusch.



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.