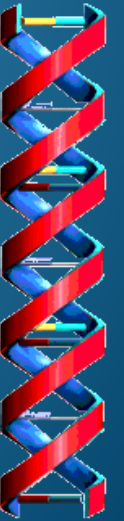
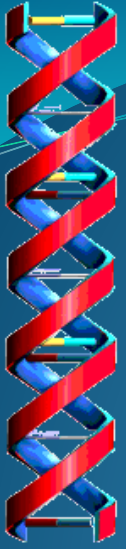


3. HAFTA

DNA İzolasyonu, Miktar ve Kalite Tayini



Organism

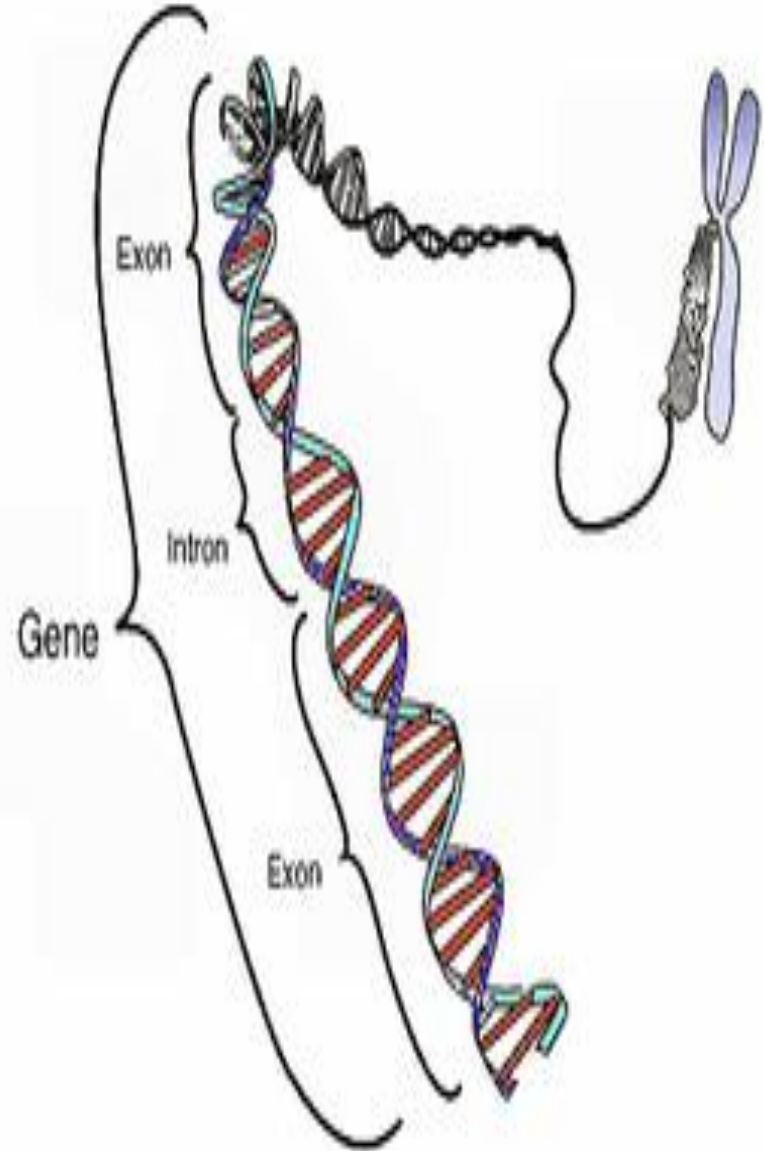
Nucleus

Chromosome

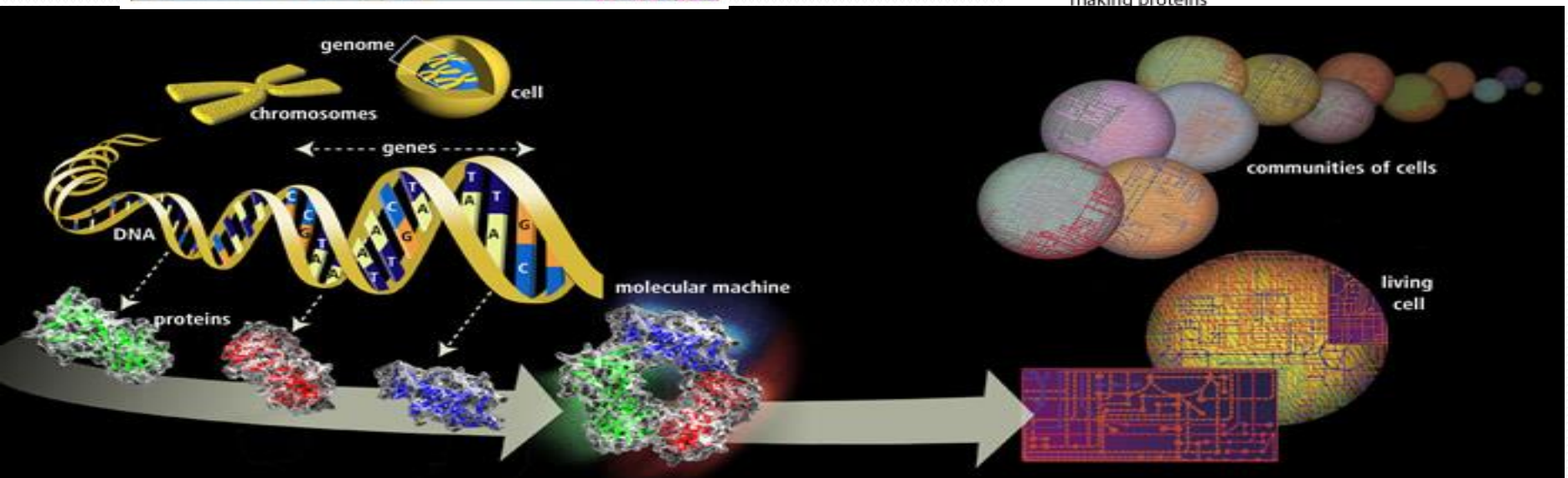
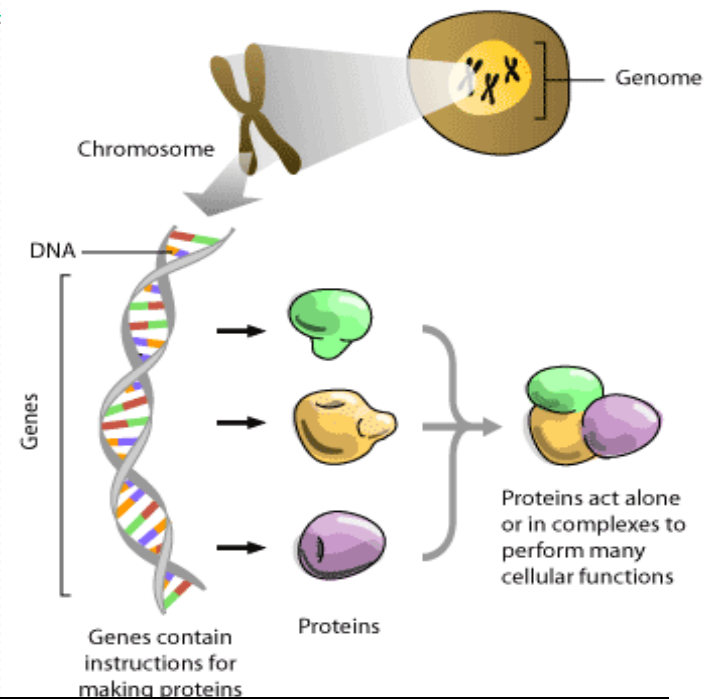
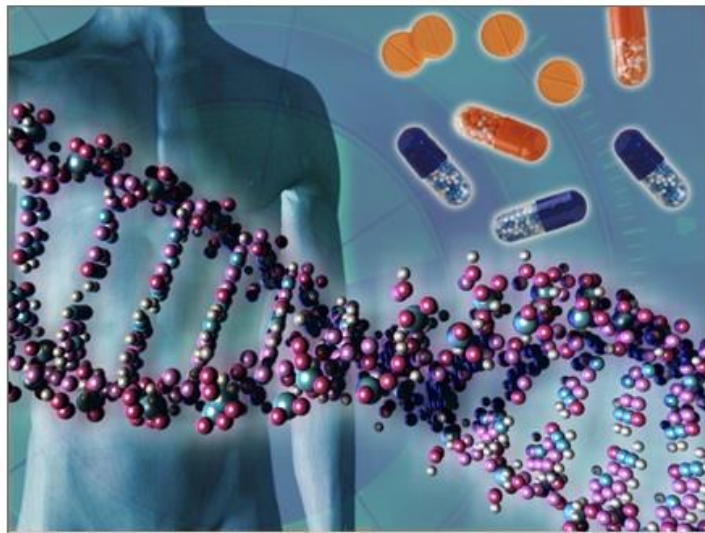
DNA



- **GEN:** Hücredeki kalıtım birimi: bir RNA (ribozomal veya transfer RNA) veya bir polipeptit olabilen işlevsel bir ürün oluşturabilen DNA bölgesidir.



GENOM: Organizmanın haploid hücredeki tüm gen ve gen dışı bölgelerinden oluşan kalıtsal maddenin tamamı



Ökaryotik hücrelerdeki genom büyüklüğünü ve kromozom sayısını gösteren Tablo 1'e bakınız. Örneğin *Saccharomyces cerevisiae* 12MB genom büyüklüğüne 16 kromozom sayısına sahiptir

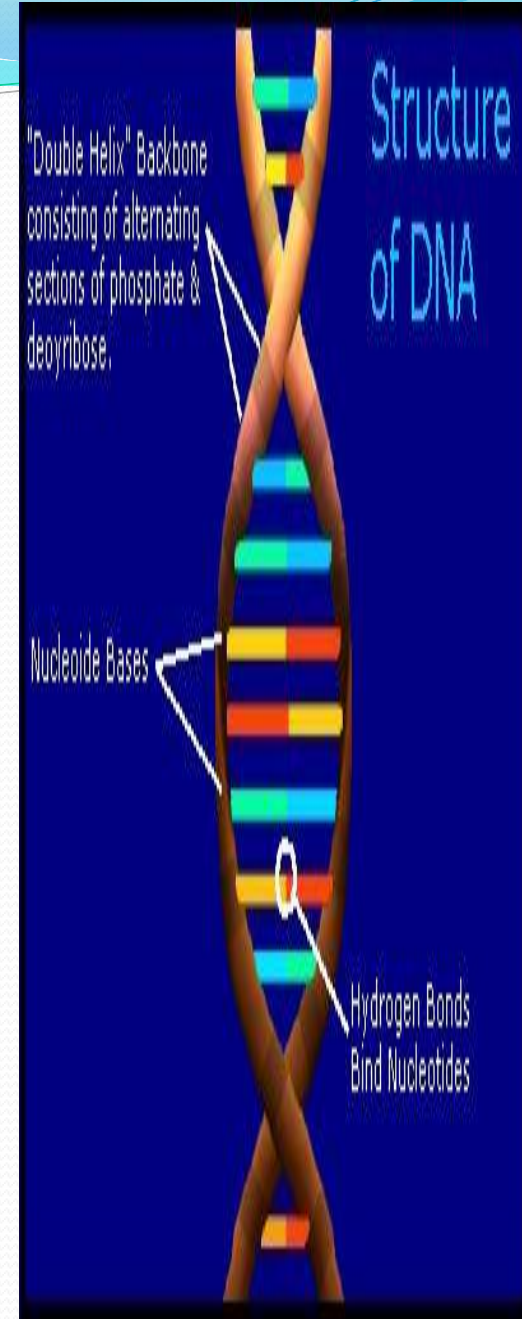
TABLE 4.2 Chromosome Numbers of Eukaryotic Cells

Organism	Genome size (Mb) ^a	Chromosome number ^a
Yeast (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	12	16
Slime mold (<i>Dictyostelium</i>)	70	7
<i>Arabidopsis thaliana</i>	125	5
Corn	5,000	10
Onion	15,000	8
Lily	50,000	12
Nematode (<i>Caenorhabditis elegans</i>)	97	6
Fruit fly (<i>Drosophila</i>)	180	4
Toad (<i>Xenopus laevis</i>)	3,000	18
Lungfish	50,000	17
Chicken	1,200	39
Mouse	3,000	20
Cow	3,000	30
Dog	3,000	39
Human	3,000	23

^a Both genome size and chromosome number are for haploid cells.
Mb = millions of base pairs.

DNA (Deoksiribonükleik Asit):

- ❑ Bir canlının genetik şifresi hücreler içerisinde bulunan DNA (Deoksiribonükleik asit) molekülünde saklıdır.
- ❑ DNA birbirine bağlanmış nükleotidlerden meydana gelmektedir. Her bir nükleotid ise bir baz (A, T, G, C), deoksiriboz şekeri, ve bir fosfat grubundan meydana gelmektedir.
- ❑ Nükleotidler birbirlerine **fosfodiester bağı** ile bağlanmakta ve polinükleotid zincir meydana gelmektedir.
- ❑ DNA molekülü, tek sarmallı DNA'ya sahip bazı virüsler dışında, çift sarmalıdır, birbiri üzerine sarılarak bir heliks oluşturur. Zincirler birbirlerine bazlar arasındaki hidrojen bağları ile tutunurlar.



- Ökaryot hücrelerin DNA'sı prokaryot hücrelerinkinden farklı organize olmuştur.
- Prokaryot genomları genellikle **dairesel DNA** molekülü tek bir kromozomda bulunur.
- Ökaryot genomları her biri bir **doğrusal DNA** molekülü kapsayan çok sayıda kromozomdan oluşur.

- Ökaryotik hücrelerin DNA'sı bu DNA'yı hücre nukleusunda düzenli bir şekilde paketleyen küçük bazik proteinlere sıkıca bağlıdır.
- İnsan hücresinde DNA'nın toplam açılmış uzunluğu 2 m'dir.
- Bu DNA çapı 5-10 mikrometre olan nukleusa sığması için histon proteinlerle paketlenir.

DNA tipleri

- **Genomik (Kromozomal)**
- **Organeller (satellit)**
- **Plazmit(ekstrakromozomal)**
- **Faj/viral**
- **cDNA**

DNA ile çalışırken göz önünde bulundurmanız gereken temel özellikler:

DNA çok dayanıklı bir moleküldür. Hafta sonu boyunca oda ısısında bıraktınız mı? Sorun değil. Genellikle çalışılması en kolay olan biyolojik makromoleküldür.

UNUTMAYIN!!!

Bazı genel kurallar bütün DNA deneylerinde geçerlidir

- Deneyin tüm basamaklarına iyi bilmek. Başka bir şekilde söylemek gerekirse, prosedürünüzün kimyasını bilmeniz gerekir.

- Örneğinizi olabildiği kadar saf elde edin. Şunu aklınızdan çıkarmayın: Herhangi bir safsızlık birçok soruna davetiye çıkarır. Eğer kontaminasyonunuz varsa takip eden aşamalarınızda kötü sonuçlar elde edebilir hatta örneğinizi bile kaybedebilirsiniz.

- Mümkün olduğunca her zaman dikkatli ve sakin olun. Örneğin, her Őeyi soğukta tutun çünkü enzimler fizyolojik sıcaklıklarında daha çok aktiftir (soğuk buz kullanın). Eldiven giyin. DNA'yı hızlı vorteklemeyin ya da kuvvetli bir Şekilde pipetaj yapmayın. Mutlaka nlk giyin. Solüsyonların ve lab ekipmanlarının otoklavlanması. Dnaz'ları inaktive etmek için Lab. da bir Őeyler yemeyin içmeyin.
BİYOĞVENLİK KURALLARINA UYALIM!!!!





DNA izolasyonunda temel prensip

- 3 Basamaktan oluşur.
 - 1) Hücrelerin parçalanması
 - 2) Protein ve diğer kontaminantlardan (RNA veya makromoleküller) uzaklaştırılması için kimyasal veya enzimatik yöntemler
 - 3) DNA /RNA saflaştırılması

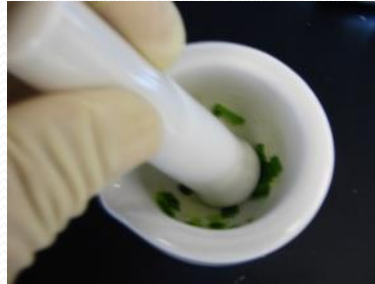
Genomik DNA izolasyonu

1) Hücrelerin parçalanması

Hücre zarının veya duvarının parçalanması (Hücre Lizisi)

FİZİKSEL PARÇALAMA

a) Hücre duvarı/membranı mekanik güç kullanarak parçalanması (parçalayıcı, ultra ses dalgaları(sonikatör))



b) Havan ve eli

Örnek olarak oldukça sert bir doku ile (mısır bitkisi gibi) çalışıyorsanız. İçerisinde sıvı azot bulunan havan ve havan tokmağı kullanmalısınız. Akılda tutmanızda yarar vardır; bu aşama hücreleri lizise etmekten ziyade, bitki hücrelerinin duvarlarını yıkmaya yöneliktir ve böylece hücreler serbest kalır.

Tablo 2: Çeşitli materyallere uygulanabilecek bazı parçalama teknikleri

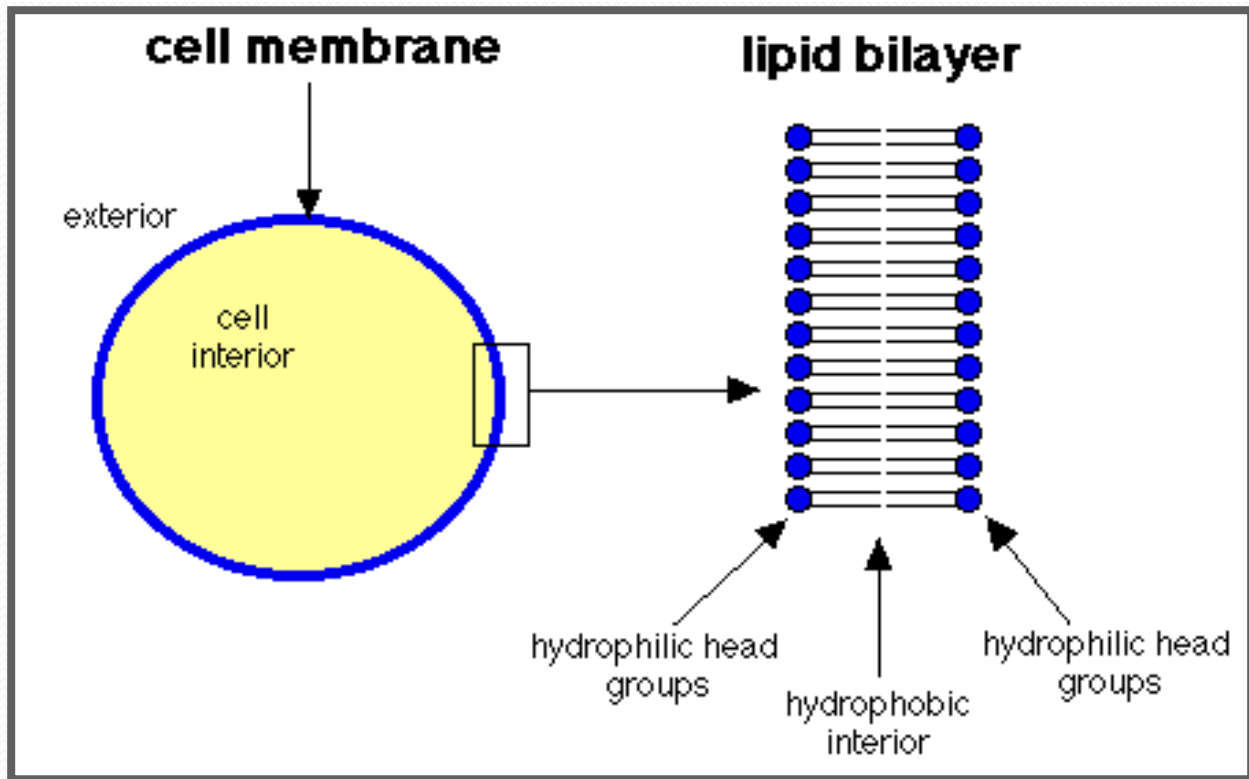
Teknik	Materyal Tipi
Hafif	
Ozmatik Şok	Eritrosit
Enzim Uygulaması	Bakteri, maya
Deterjan Uygulaması	Doku kültürü hücreleri
El homojenizatörü (veya havan)	Karaciger vb. yumuşak dokular
Doğrama (kesme, parçalama)	Kas vb. dokular
Orta şiddette	
Bıçaklı homojenizatör	Hayvansal ve bitkisel dokular
Kum vb. ile ezme	Bitkisel dokular, Bakteri
Yoğun	
Ultrasonikasyon	Hücre süspansiyonları
Bilyeli mil	Hücre süspansiyonları
Manton-Gaulin homojenizatörü	Hücre süspansiyonları

KİMYASAL YÖNTEMLER

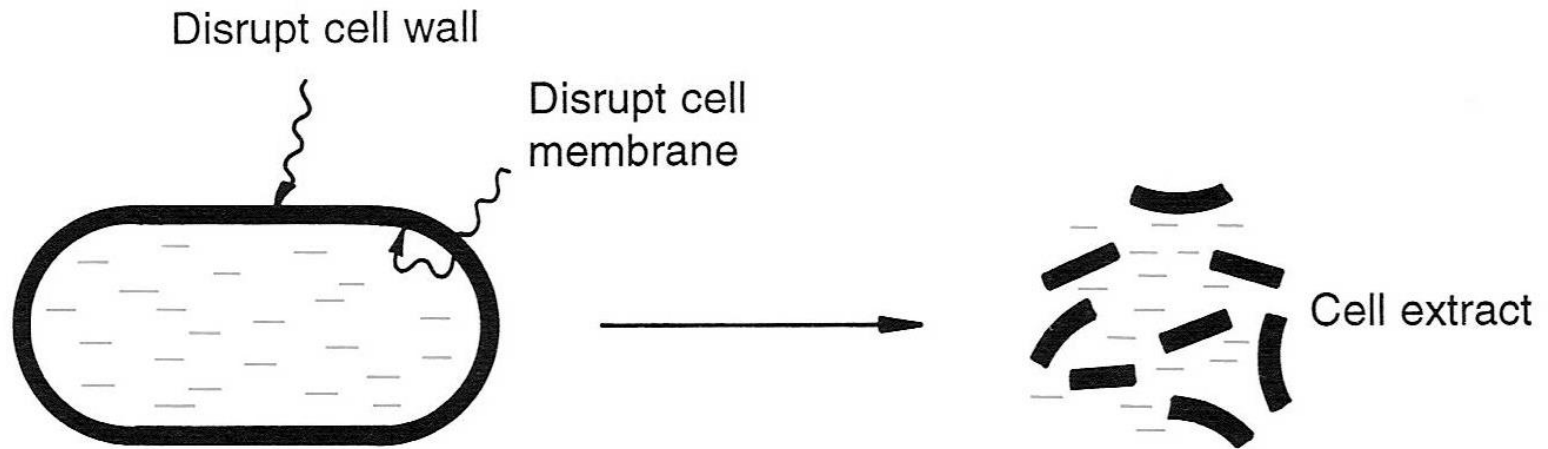
- Hücre duvarı/membranı hedef alarak bozulmasını sağlamak
- Hücre duvarı = lizozim, EDTA veya her ikisi beraber
- Hücre membranı = deterjanlar (SDS)

- Genellikle tüm metotlarda hücrelerin birbirinden ayrılması ve lizis basamağı benzerdir.
 - SDS, alkali, ısıtma olabilir
- Proteinlerden uzaklaştırılması da enzimatik olabilir proteinaz K kullanılır.
- Ayrıca DNA izolasyonunda RNAaz, RNA izolasyonunda DNAaz kullanılabilir.

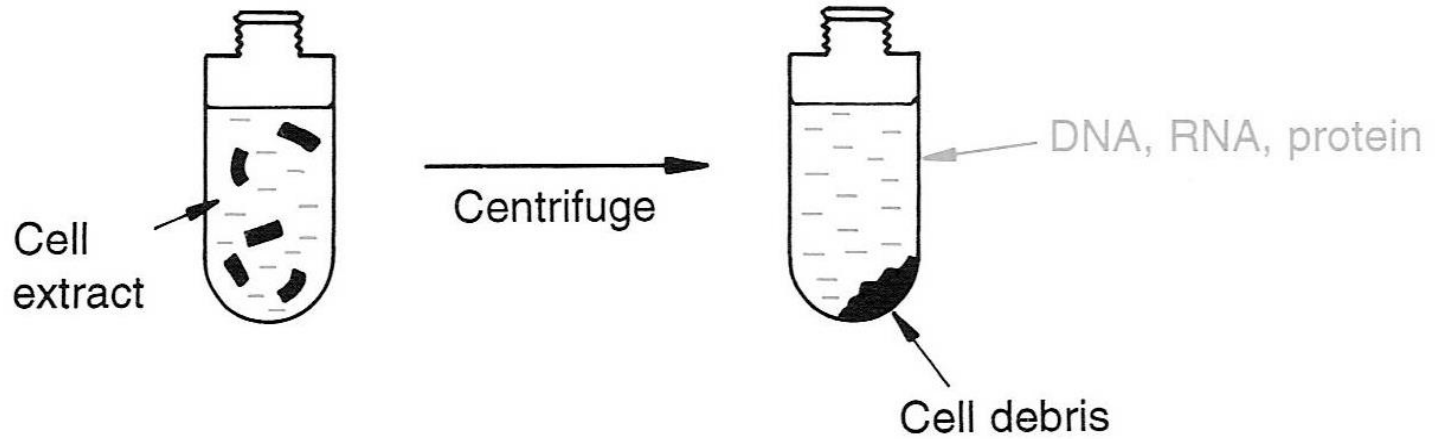
- **Tris** (tamponlama maddesi pH 6-8)
- **EDTA** Dnase aktivitesi için gerekli kofaktörler olan divalent katyonları şelatlar (nükleazları kapatma yolu)
- **NaCl** fizyolojik şartlarda (genellikle 100-150 mM olması gerekir). İstenmeyen çökelmeleri önler.



(a) Cell lysis



(b) Centrifugation to remove cell debris



2) Protein ve diğer kontaminantlardan (RNA veya makromoleküller) uzaklaştırılması için kimyasal veya enzimatik yöntemler

DNA ekstraksiyonu (Fenol/kloroform ile)

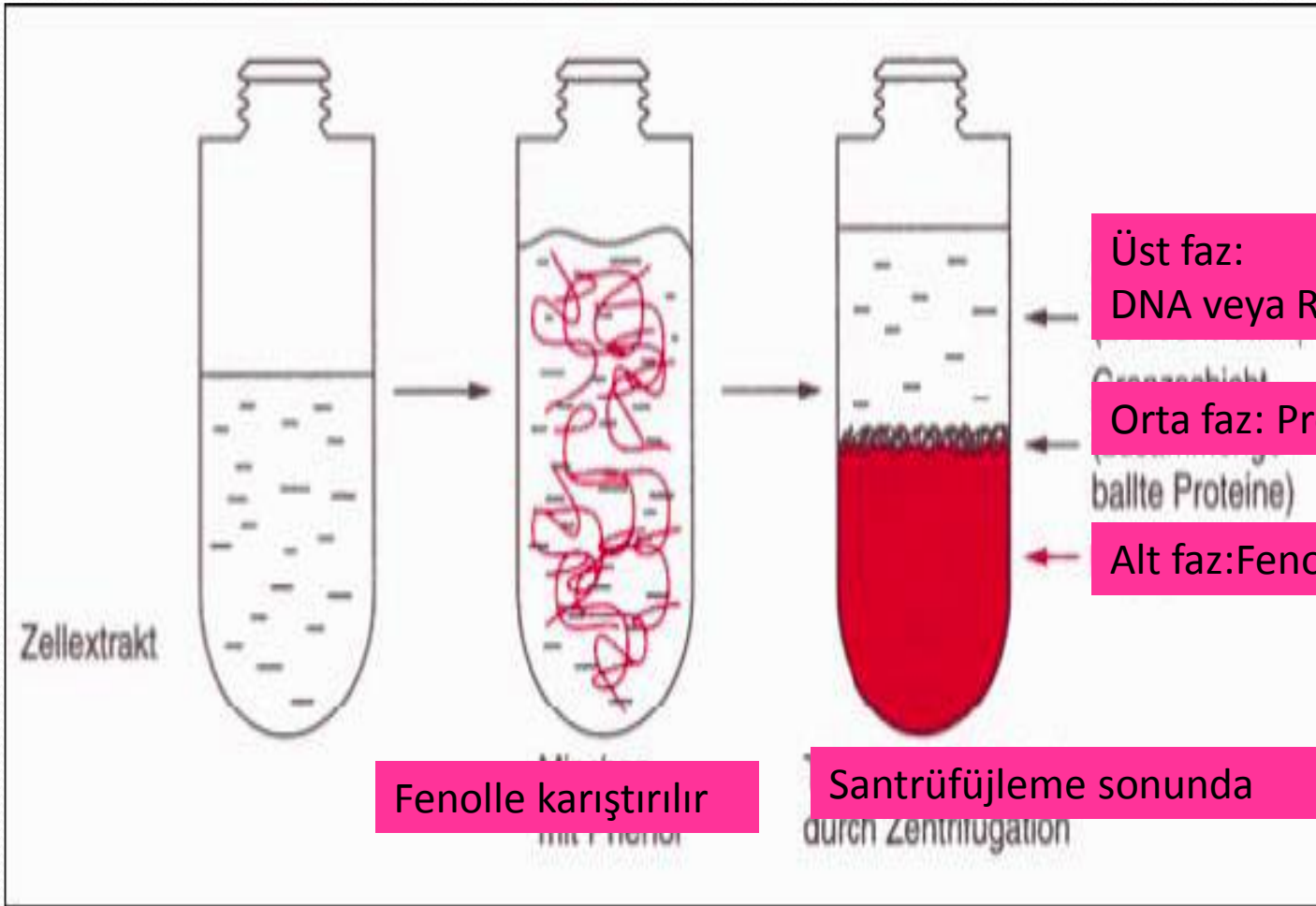
•Dikkat!!!! Fenol oldukça tehlikelidir. Yanıcıdır. (Eğer vücudunun %'5 ni kaplarsa öldürücüdür)

Ancak az miktarlarda ve çeker ocak içerisinde kullanılmalıdır.

Eğer üzerinize dökülürse paniklemeysin. Hemen soğuk su ile durulayın.



- Organik ekstraksiyon geleneksel metotlardandır.
- Fenol proteinleri denatüre edici bir ajandır.
- Ham ekstrakt elde edildikten sonra fenol/Kloroform/İzoamil alkol ile karıştırılır. Doğru tuz konsantrasyonu ve pH sağlandığında DNA üst fazda, denatüre edilen protein orta fazda fenol/kloroform/izolamil alkol alt fazda birikir.
- Dezavantajı: Bu prosedürle elde edilen DNA fenol kloroform artıkları içerirse daha sonra basamaklarda enzimatik reaksiyonlarda kullanılamaz .



Kloroform, fenolle genel olarak benzer özelliklere sahiptir (çözücü özellikleri), ayrıca sulu ve organik fazlar arasındaki dayanıklı olmayan bağları stabilize eder. Izoamilalkol de ara fazın stabilizasyonuna katkı sağlar ve aynı zamanda kabarcık oluşumunun önlenmesine yardım eder.

Genellikle bu basamak 2 ya da 3 kez tekrarlanır. Daha fazla tekrar edilmesi, örneği daha temiz hale getirir (her tekrarda ara fazın daha temiz hale geldiğini gözlemleyebilirsiniz). Bu prosedür oldukça güvenilirdir ve DNA verimi fazladır. Bu nedenle halen laboratuvarların çoğunda kullanılmaktadır.

3. DNA'nın Saflaştırılması

3.a. DNA'nın çöktürülmesi

Alkol ve Tuz ile Çöktürme

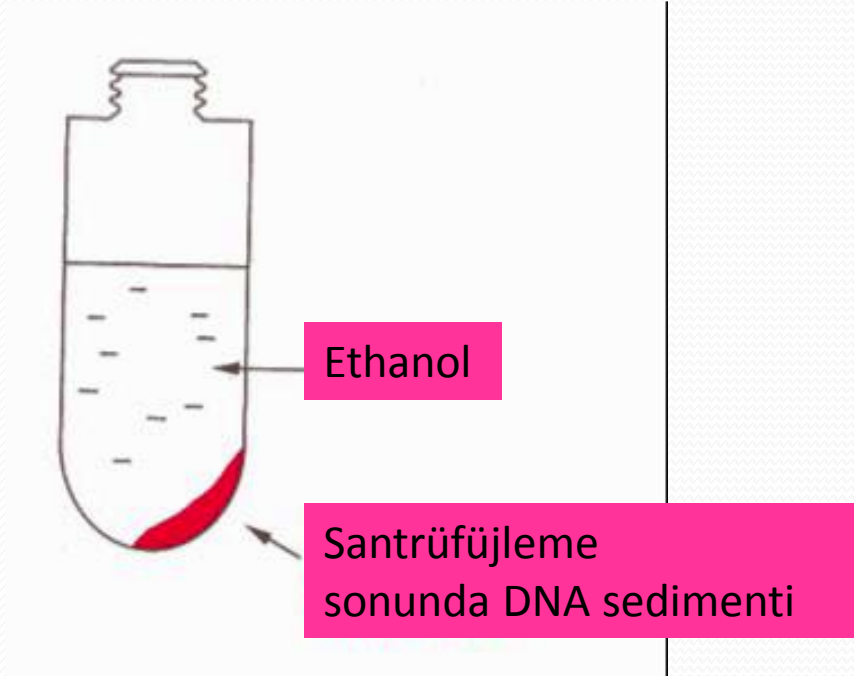
• Hacmin yarısı kadar **amonyum asetat** ekleyin. Etanol varlığında DNA'nın çökmesine yardımcı olur. **NaCl**'de kullanılabilir, ya da tamamen bu basamağı atlayabilirsiniz (DNA konsantrasyonuna bağlı olarak). Tuz DNA'nın negatif yükünün nötralize olmasına yardım eder (böylece çözücü moleküllerden ayrılır-bu durumda çözücü sudur). Tuz aynı zamanda su ile etkileşime girerek DNA'nın çözünürlüğünü zayıflatır. Bu "saltingout" olarak bilinir.

• **%100'lük etanol** kullanılır. Etanol su kadar iyi bir çözücü değildir. %65'den daha çok etanol içeren çözeltilerde DNA çözünmez. Ancak etanolle çöktürmenin etkinliği çok sayıda etkene bağlıdır: sıcaklık, zaman, DNA miktarı.

• Çöktürme basamağı için **izopropanol** de kullanılabilir. Bu çözücü içinde RNA da stabil kalabilir (seçici çöktürme). Bu nedenle bazen bu amaçla da kullanılır. %50'den daha çok izopropanol varlığında DNA çökelti halinde kalır.

DNA **%70'lik etanolle** muamele edilir ve TE çözeltisi içerisinde çözülür. %70'lik etanol yıkamasıyla ortamda bulunan fazla tuz uzaklaştırılır.

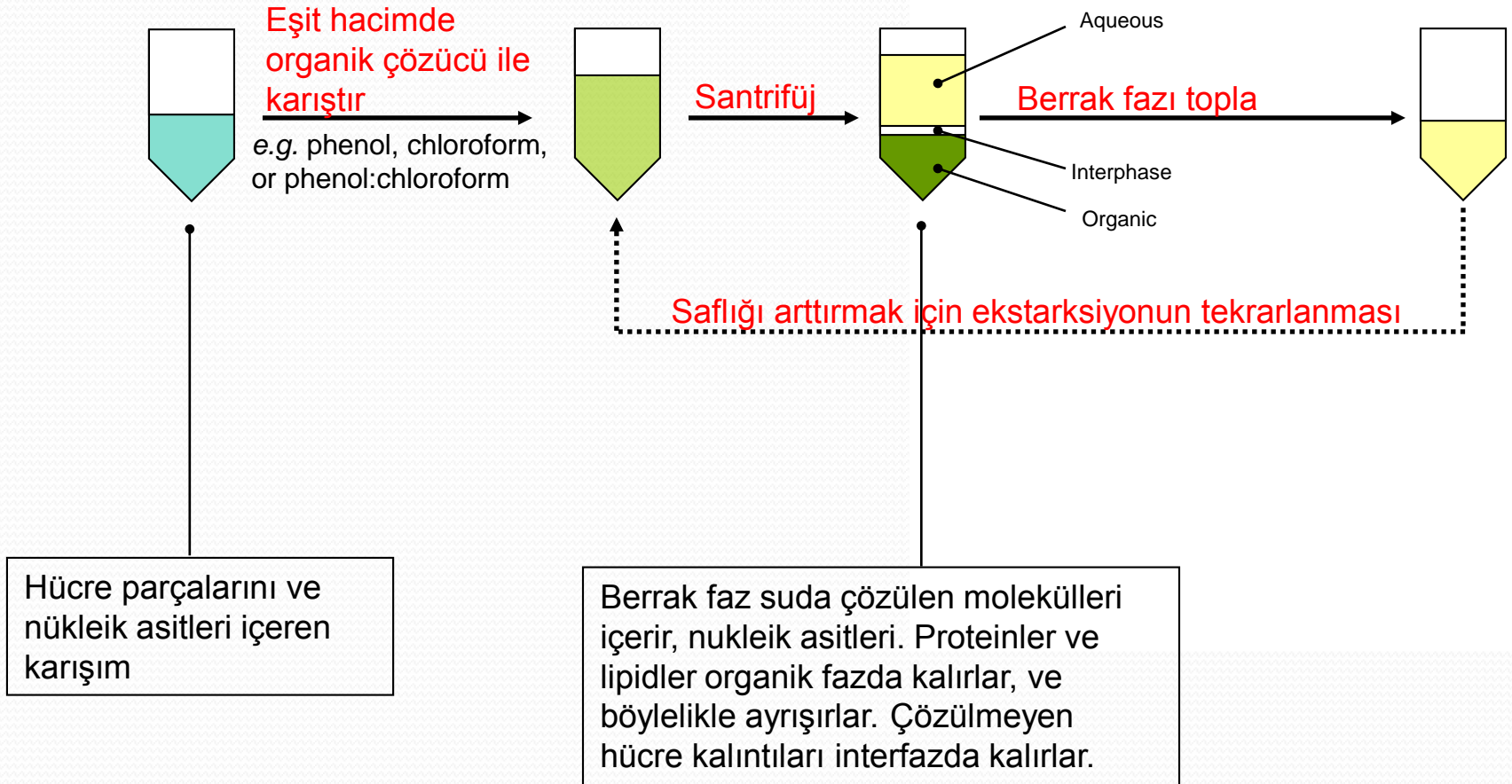
• **ALTERNATİF.** Bazı laboratuvarlarda DNA santrifüj edilerek çöktürülür. Bu az miktarda DNA'nın olduğu durumlarda daha etkili sonuç verir. Ancak %70 etanol ile pellet yine yıkanır ve örnek tekrar spin edilir.



- Ham ekstraktadaki protein ve diğer kirleticiler yüksek konsantrasyonda **amonyum asetata** ve **potasyum asetat** kullanılarak çöktürülebilir.
- **Etanol presipitasyonu**yla da nükleik asitler ayrılır.
- Bu yöntemde proteinler ve diğer kirleticilerin uzaklaştırılması çok etkili değildir. Bu nedenle **RNAz** uygulanması ya da tekrarlanan **ethanol** presipitasyonuna ihtiyaç duyulabilir.

Ekstraksiyon/Çöktürme Metodu

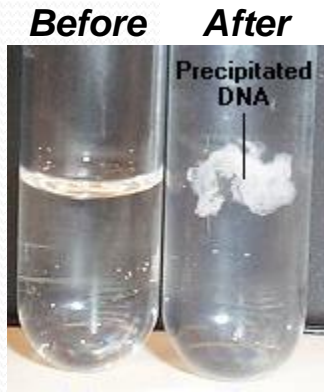
Step 3: Organik ekstraksiyon



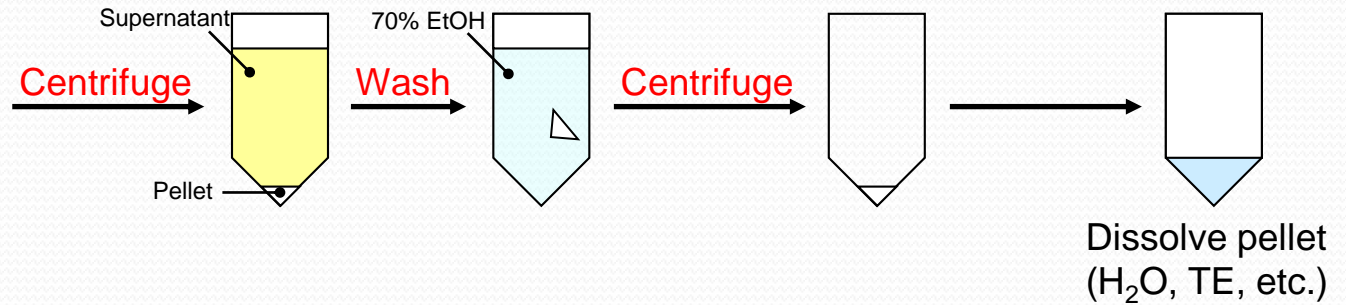
- Fenol proteinleri denature eder ve denature olmuş proteinleri çözer.
- Chloroform da protein denature eden bir ajandır

Ekstraksiyon/Çöktürme Metodu

Step 4: Nükleik Asit Presipitasyonu



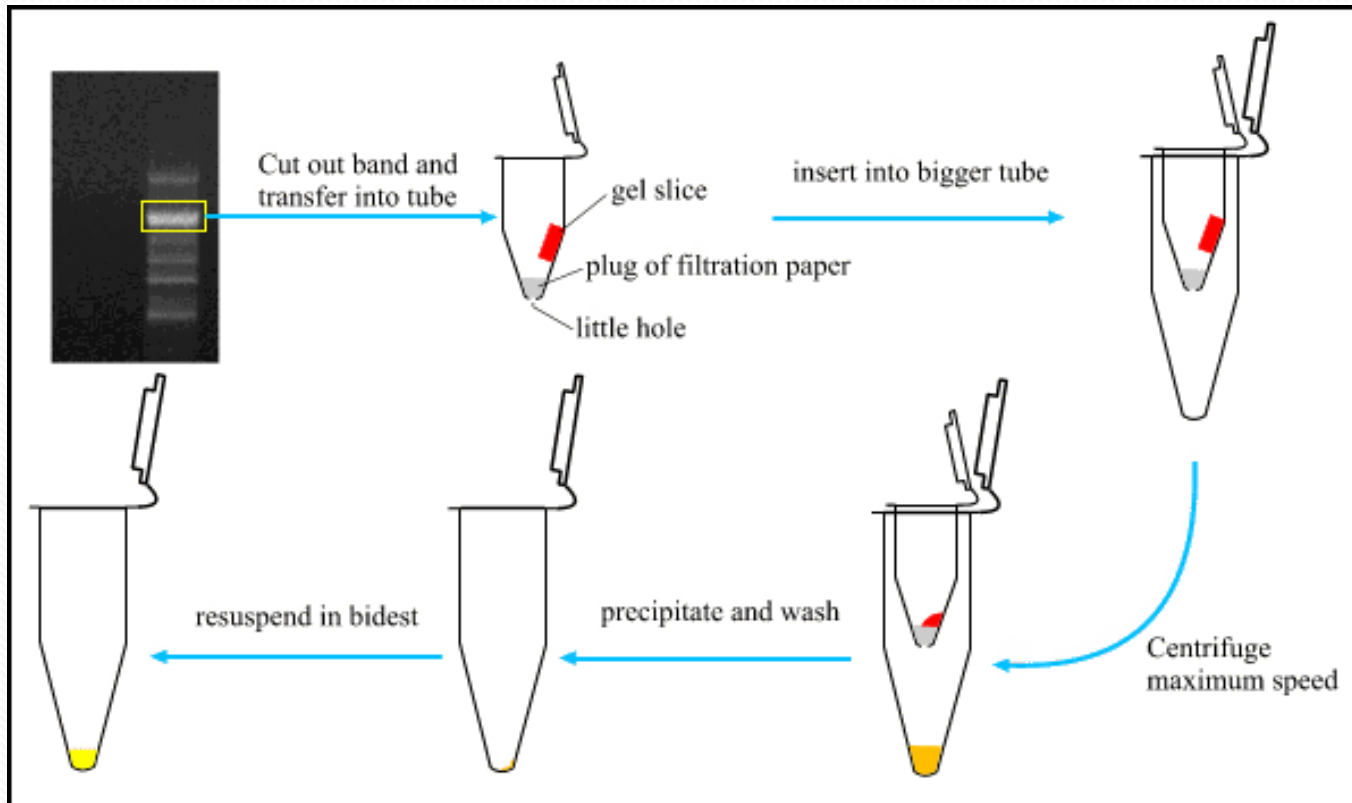
Nükleik asitleri berrak fazdan çöktürmek için alkol ve tuz eklenir.

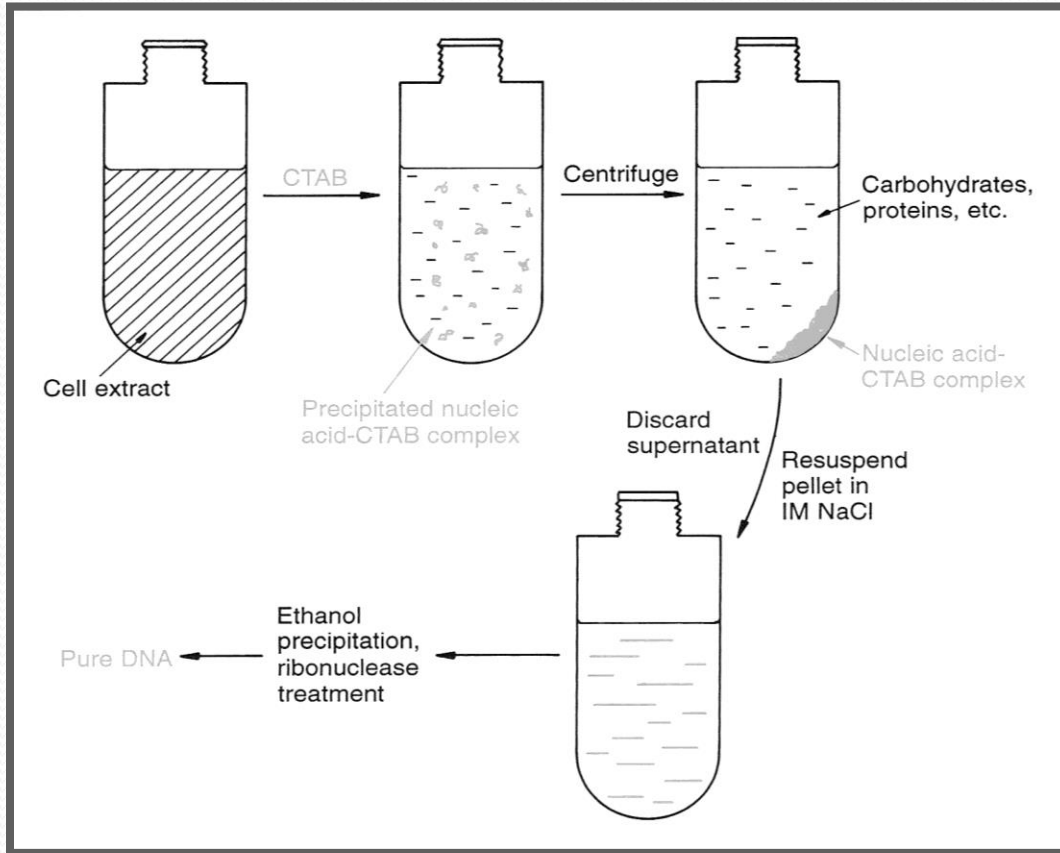


Tuz, su ve DNA molekülleri arasındaki hidrojen bağı kırılır

Ortamda katyonlar varken etanol DNA'da yapısal değişikliğe sebep olur ve çökelti oluşturmasını sağlayarak solusyondan DNA'yı ayırır.

DNA'NIN SAFLAŞTIRILMASI





DNA'sının saflaştırılması

Nükleik asitlerin hücrenin diğer bölümlerinden ayrıştırılması

Nükleik asitlerin hücrenin diğer bölümlerinden ayrıştırılması.

- Ekstraksiyon/Çöktürme metodu

3b. Adsorpsiyon Kromatografi Metodu

Adsorpsiyon: moleküllerin bir yüzeye bağlanması

Temel Prensiip

Lizatın içinde bulunan nükleik asitler bir silika yüzeye bağlanır



Silica yüzey nükleik asitleri bağlı tutup, geri kalan materyali yıkayan bir çözelti ile yıkanır



Silika yüzey DNA veya RNA'yı tutup ağağıya çekecek bağka bir solusyon ile yıkanır ve nükleik asitler elde edilir.

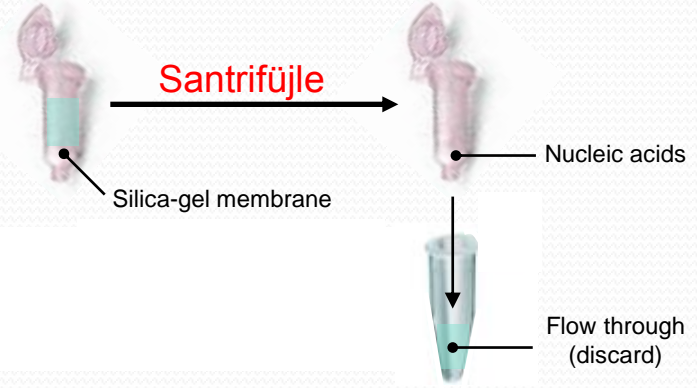
Adsorbsiyon Kromatografi Metodu

Step 1: Lizatı hazırla



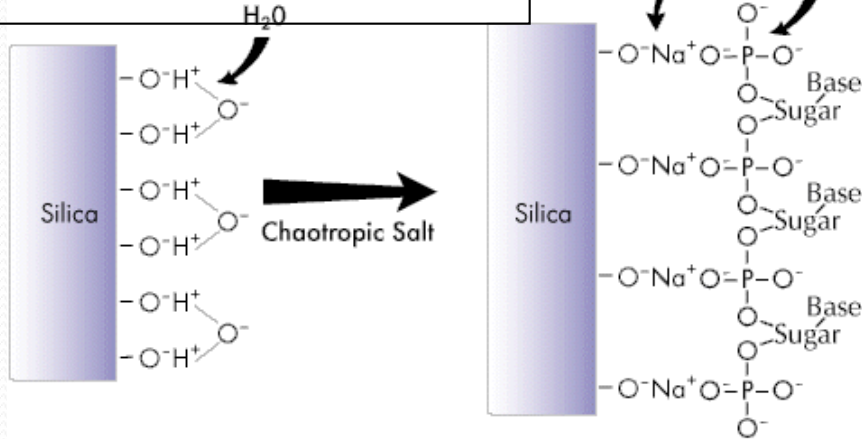
Kolona yükle

Step 2: Silika yüzeye bağla



Ekstraksiyon çözeltisinin içeriği DNA ve RNA'nın silika yüzeye tutunmasını sağlayacaktır.

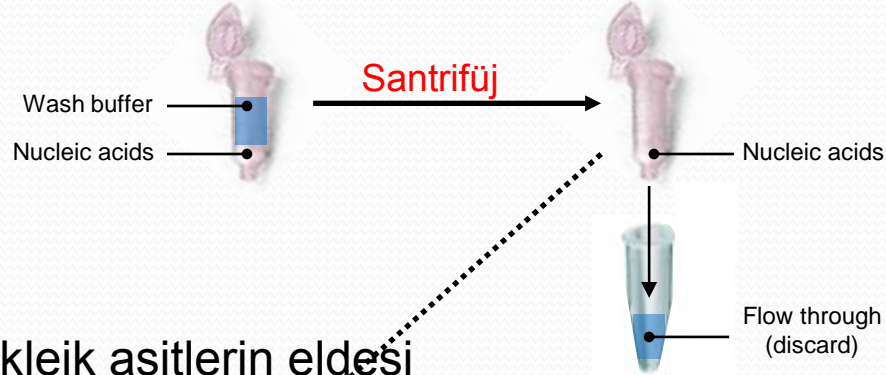
- Düşük pH
- Yüksek iyonik güç
- Tuz



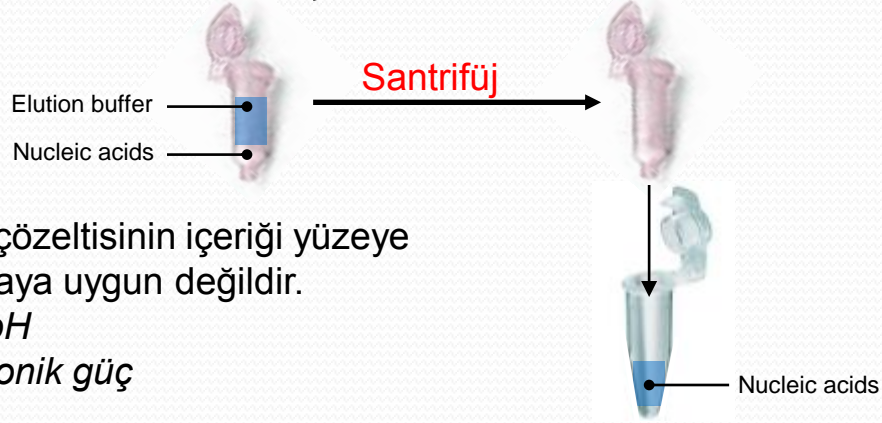
Nükleik asitler membrana bağlanırken kontaminantlar kolondan akar gider.

Adsorbsiyon Kromatografi Metodu

Step 3: Kalan kontaminantların yıkanması



Step 4: Nükleik asitlerin eldesi

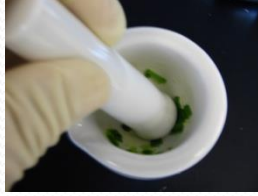


Elüsyon çözeltisinin içeriği yüzeye bağlanmaya uygun değildir.

Yüksek pH

Düşük iyonik güç

DNA Ekstraksiyonu



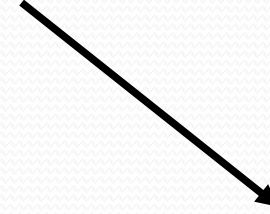
Hücre duvarı
ve
membranının
parçalanması



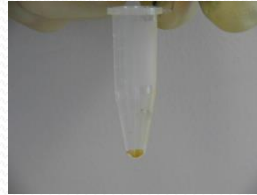
Çözünmüş
DNA'dan sıvı
kısmın
santrifuj ile
ayırımı



izopropanol
kullanarak
DNA'nın
çöktürülmesi



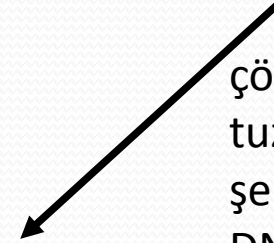
çözünmemiş
tuz ve
şekerlerden
DNA'nın
ayrılması için
santrifuj



DNA
çözünmesi



Etanol ile
DNA
pellet'in
yıkınması ve
kuruması



DNA Miktar Tayinine (Kantitasyon) Genel Bakış Niçin kantitasyon yapılır?

Kantitasyon, miktarın tayin edilmesidir

Kantitasyon yöntemleri

- *Spektrofotometre
- *Slot Blot (Quantiblot)
- *Microplak okuyucu
- *Real Time PCR

DNA Kantitasyonu DNA izolasyonunu takiben, DNA konsantrasyonunun ve diğer maddelerin varlığının belirlenmesi amacıyla yapılır.

Örneđimde ne kadar DNA var?

Neden önemli?

Kantitasyon ekstraksiyonun başarısı hakkında ipucu verir.

Kantitasyonun temel nedeni:

Çoğu PCR yöntemi DNA yeterli düzeydeyse en iyi sonucu verir.

DNA ekstraksiyonun çok az olması:

- DNA amplifikasyonunda başarısızlık ☹
- Allel drop out (tamamlanmamış amplifikasyon) ile sonuçlanır

DNA ekstraksiyonunun çok fazla olması:

- PCR inhibitörlerinin artması

DNA saflığı

- Saflık belirlemede 260/280 nm sonucuna bakılır.
- Saf bir DNA 260/280= 1.8 olmalıdır.

260/280 > 1.8 ise RNA kontaminasyonu

260/280 < 1.8 ise protein kontaminasyonu

DNA Miktar Tayini

- **Spektrofotometrik okumalar:** UV absorbansı kullanılarak DNA/RNA miktarı ve saflığı belirlenebilir. Halkalı yapılar UV dalga boylarını absorbe edebilir. Ancak pek çok molekül halkalı yapı içerir (nükleikasitler, proteinler, organikler, deterjanlar, lipidler, ve liste sürer...)
- Hem DNA hem de RNA halkalı yapıları yaklaşık 260 nm'de güçlü absorbans verir.
- Proteinler, bazı amino asitler fenilalanin, triptofan ve tirozin 280 nm'de maksimum absorbans verir.
- Alt çizgi tuz taneciklerinin miktarı ile ilişkilidir. Kaba hesaplama, pek çok şey UV absorblar. Aynı zamanda pH'a oldukça duyarlıdır, bu nedenle sulandırmada kullanılan TE tamponu ile spektrofotometre kalibre edilmelidir.

260nm'deki absorbansın 280nm'deki absorbansa oranıyla saflık değeri elde edilebilir

•DNA = A_{260}/A_{280} yaklaşık 1.8

•RNA= A_{260}/A_{280} yaklaşık 2.0

•Bunlar saflaştırma ürünleri için iyi sonuçlardır ve aynı zamanda iyi kantitasyon değerine de sahip olacaktır.

Formül

Konsantrasyon = 260nm okuma * Absorbans birimi *

Dilüsyon faktörü

Bir optik yoğunluk birimi ya da 260 nm'de absorbans birimi:

DNA için 50 ug/mL

RNA için 40 ug/mL

DNA Kantitasyonu

- DNA agaroz jelde ayrılır
- Etidyum bromür ile boyanır

Ayrıca DNA miktarını belirlemek için genellikle DNA miktarıyla ilişkili olarak yapıya bağlanan Etidyum bromür ve sybrgreen boyaları da kullanılır. Daha güçlü bir yöntemdir, ancak daha pahalıdır. Etidyum bromürle boyanmış bir jelde bant yoğunlukları karşılaştırılarak DNA fragmentlerinin kantitasyonu yapılabilir, ölçü olarak bir marker kullanılır.

DNA İZOLASYONU



Funguslar için DNA İzolasyon Yöntemi

Gerekli Malzemeler			
Tris-EDTA tamponu (TE), pH8.0	Tris HCl	pH8.0	10 mM
	EDTA	pH8.0	1mM
LiCl 0.4 M			
CTAB			
β -merkaptoetanol			
Kloroform/izoamil alkol 24:1 (v:v)			
Isopropanol			
Etanol (%70)			

1.İzole edilecek olan fungus örneğinden 0.1g alınarak sıvı azotta toz haline gelinceye kadar ezilir.

2.Örneklere 1ml ekstraksiyon tamponu (50 mM Tris-HCl (pH 8), 50 mM EDTA, 10 ml LiCl (4 M), %1 CTAB, %2 PVPP) eklenir.

3.Örnekler 1.5 ml' lik ependorf tüplerine koyulduktan sonra üzerine % 0.2 β -merkaptoetanol eklenir.

DNA Ekstraksiyon Solusyonu (Son konsantrasyon)
50 mM Tris-HCl (pH 8)
50 mM EDTA
10 ml LiCl (0.4 M)
%1 CTAB
%2 PVPP

4.Örnekler 65°C'de 15 dk sıcak su banyosunda inkübe edilir.

5.İnkübasyon periyodunu takiben örnekler oda sıcaklığında soğutulup üzerine 0.5 ml kloroform/izoamil alkol (24:1 [v/v]) eklenerek yavaşça karıştırılır.

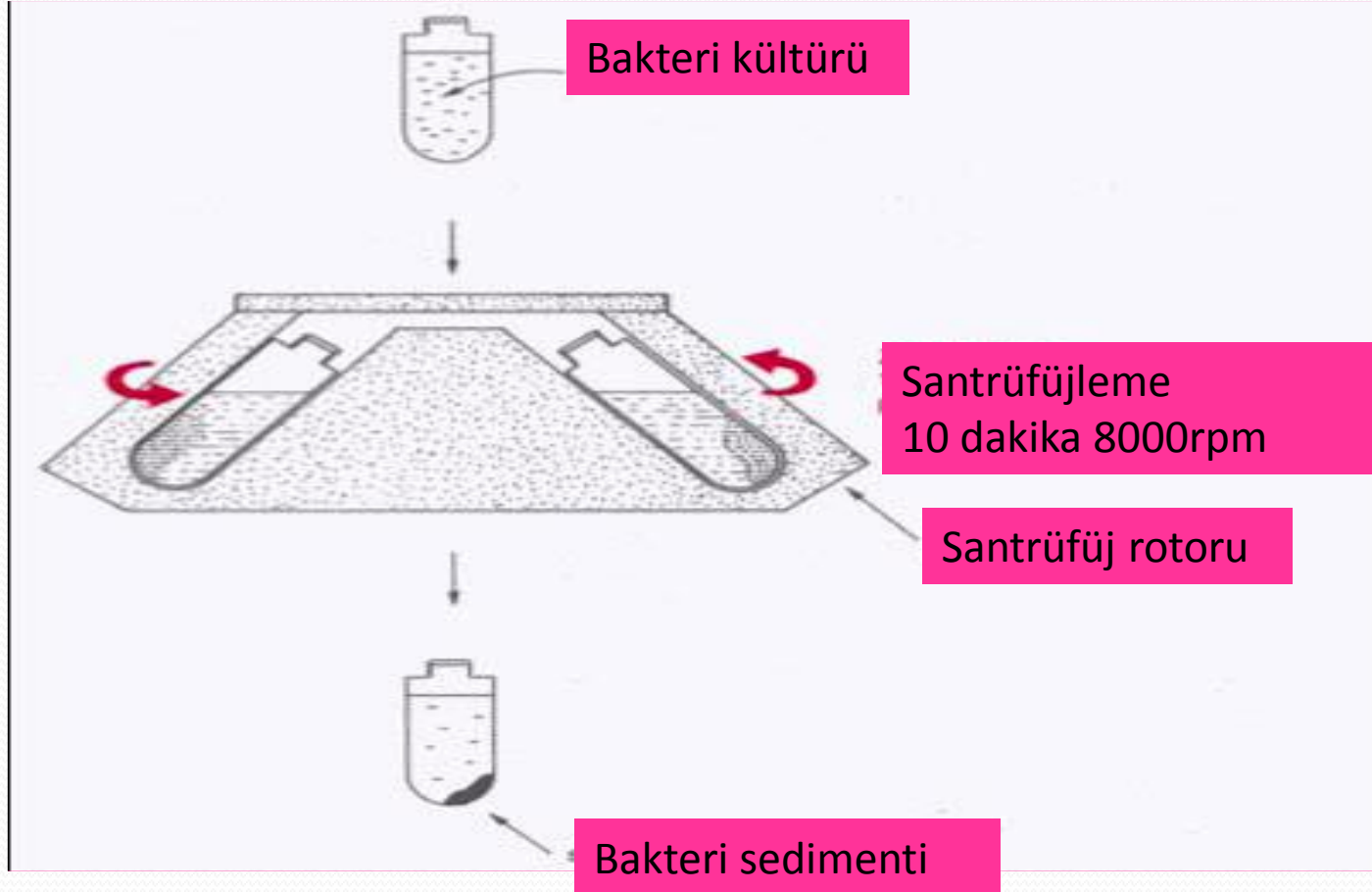
6.Daha sonra örnekler 14,000 rpm'de 2dk santrifüj edilir ve süpernatant temiz bir tüpe transfer edilir.

7.Süpernatanta eşit hacimde isopropanol eklenerek birkaç kez ters düz edilerek karıştırılır. DNA ürününün etkinliğini arttırabilmek için örnekler buz üzerinde 15 dk inkübasyona bırakılır.

- 8.Örnekler 14,000 rpm'de 2 dk santrifüj edilir.
- 9.Süpernatant uzaklaştırılır.
- 10.%70'lik etanol eklenir.
- 11.Örnekler 14,000 rpm'de 1 dk santrifüj edilir.
- 12.Örnekler %70'lik etanol ile tekrar yıkanır ve etanol uzaklaşana kadar oda koşullarında kurutulur.
- 13.Elde edilen pellet TE (Tris - EDTA) tamponu içinde çözülür (30-60 μ l).
- 14.10 mg/ml RNaz eklenerek 37°C' de 30dk bekletilir ve kullanılabileceği kadar -20 °C'de saklanır.

Elde edilen DNA örneklerinin miktar tayinleri (260 nm) ve saflık dereceleri (260 nm/ 280 nm) spektrofotometrik (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer) ölçümler ile belirlenmiş, ayrıca DNA kalitesi etidyum bromür varlığında %1'lik agaroz jelde de görüntülenmiştir.

Bakteri hücreleri santrifüjleme ile toplanır



Organizma: *Escherichia coli*

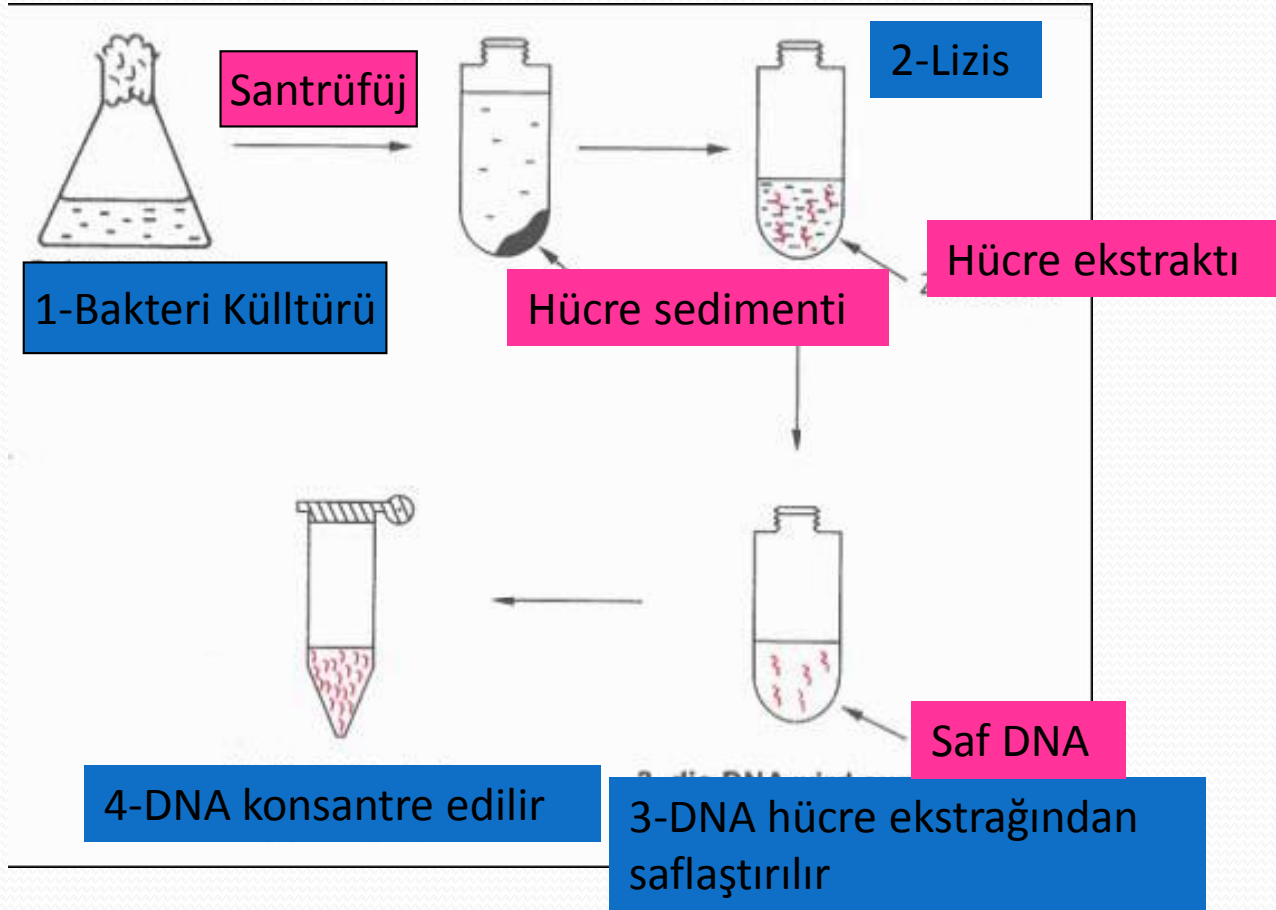
Gerekli Malzemeler

LuriaBertani (LB) besiyeri, pH7.3	Tripton	% 1	
	Maya özütü	% 0.5	
	NaCl	% 1	
Tris-EDTA tamponu (TE), pH8.0	TrisHCl	pH8.0	10 mM
	EDTA	pH8.0	1mM
SDS % 10			
Lizozim			
Proteinaz K 20 mg/ml			
NaCl 5M			
CTAB/NaCl	CTAB	% 10	
	NaCl	0.7 M	
Kloroform/izoamil alkol 24:1 (v:v)			
Fenol			
Fenol/kloroform/izoamil alkol 25:24:1 (v:v:v)			
İzopropanol			
Etanol %70			

Yöntem:

- 1) 5 ml LB besiyerine tek koloniden ekim yapılır. 150 devir/dakika hızda, 37°C’de bir gece boyunca üretilir.
- 2) Bir gecelik 5 ml bakteri kültürünün 1.5 ml’si mikrosantrifüjde (10.000 devir/dakika hızda 5 dakika) çöktürülür.
- 3) Üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra çökelti 567 µl TE tamponu içerisinde mikropipet yardımıyla çözündürülür.
- 4) Çözelti üzerine 30 µl SDS ve 3 µlproteinaz K çözeltileri eklenerek karıştırılır ve 37°C’de 1 saat bekletilir (Bu aşamada hücreler lizis olur ve tüp içerisindeki sıvı saydamlaşır)
- 5) 100 µl 5 M NaCl eklenerek karıştırılır. Daha sonra 80 µl CTAB/NaCl çözeltisi eklenir ve karıştırılıp 65 °C’de 10 dakika tutulur.
- 6) Üzerine eşit hacimde kloroform/izoamil alkol eklenir ve karıştırılır. 10.000 devir/dakika hızda, 5 dakika santrifüjlenir.
- 7) Üst faz temiz bir mikrosantrifüj tüpüne alınır ve eşit hacimde fenol/kloroform/izoamilalkol karışımından eklenerek karıştırılır. 10.000 devir/dakika hızda, 5 dakika santrifüjlenir.
- 8) Üst faz dikkatlice temiz bir mikrosantrifüj tüpüne alınır ve 0.6 hacim izopropanol eklenir. DNA çökünceye kadar karıştırılır.
*Bu aşamada tüp alt üst edilerek yavaşça karıştırılır ve bu anda DNA iplikçikler şeklinde çökeldiği gözle görülebilir.
- 9) DNA, 15.000 devir/dakika hızda 10 dakika santrifüjlenerek çöktürülür.
- 10) Çökelti üzerine 50 µl %70 etanol eklenerek DNA yıkanır ve tüp hızlıca ters çevrilerek alkol uzaklaştırılır.
- 11) Tüp ağzı açık durumda oda sıcaklığında yaklaşık 10-15 dakika veya 60 °C’de birkaç dakika bekletilerek alkol tamamen uçurulur.
- 12) Çökelti üzerine 50-100 µl TE eklenir ve tüpe parmakla yavaşça vurularak DNA çözündürülür.
* İzole edilen DNA -20 °C’de uzun süre saklanabilir.

Bir bakteri hücrelerinden DNA izolasyonu





Viral DNA izolasyonu

TEMEL PRENSİP

Virüs kiti 8/96 viral DNA/RNA' nın arındırılması için dizayn edilmiştir. Silica membran üzerine kurulmuş tercihe göre; 8 kuyulu ve 96 kuyulu kitler mevcuttur.

RNA virüsleri buffer RAV₁ tarafından çok hızlı ve etkili bir şekilde lizis olur. DNA virüslerinin lizis olması daha zordur. Bunun için kit solusyonlarına Proteinaz K eklenir.

Tuz gibi potansiyel PCR inhibitörleri ve metabolitler yıkama adımında ethanolic yıkama tamponu RAW ve RAV₃ tarafından temizlenir.

Nucleospin kit 8 için kit içeriği

	12 x 8 preps	60 x 8 preps
Cat.No.	740643	740643,5
Lizis Tampon RAV1 *	2 x 40 ml	8 x 40 ml
Yıkama Tampon RAW	70 ml	2 x 150 ml
Yıkama Tampon RAV3 (Konsantre)	40 ml	200 ml
H ₂ O, RNAse ücretsiz	30 ml	125 ml
Elution Tampon RE **	2,5 ml	125 ml
Taşıyıcı RNA * () liyofilize	2 x 1 mg	8 x 1 mg
Proteinaz K * () liyofilize	50 mg	3 x 75 mg
Proteinaz Tampon PB	8 ml	15 ml
NucleoSpin [®] Virüs Şeritler (mavi halkalar) Cilt	12	60

Nucleospin kit 96 için kit içeriği

	2 x 96 preps	4 x 96 preps
Cat.No.	740691,2	740691,4
Lizis Tampon RAV1 *	3 x 40 ml	6 x 40 ml
Yıkama Tampon RAW	150 ml	2 x 150 ml
Yıkama Tampon RAV3 * (Konsantre)	100 ml	200 ml
H ₂ O, RNase ücretsiz	65 ml	125 ml
Elution Tampon RE **	75 ml	125 ml
Taşıyıcı RNA * () liyofilize	3 x 1 mg	6 x 1 mg
Proteinaz K * () liyofilize	2 x 50 mg	3 x 75 mg
Proteinaz Tampon PB	8 ml	15 ml
NucleoSpin [®] Virüs Cilt Tabaklar (mavi halkalar)	2	4
Yuvarlak iyi Blok cap Şeriti ile	2	4

Kit seçim rehberi

Kiti seçim rehberi:

	Uygulama	Kiti tavsiyesi
kullanım kılavuzu, santrifüj	low-/medium çıktı	NucleoSpin® 8 Virüs
	Yüksek Verimli	NucleoSpin® 96 Virüs
kullanım kılavuzu, vakum	low-/medium çıktı	NucleoSpin® 8 Virüs
		NucleoSpin® 8 Virüs
		Çekirdek Takımı
	Yüksek Verimli	NucleoSpin® 96 Virüs
		NucleoSpin® 96 Virüs
		Çekirdek Takımı
otomatik kullanım	low-/medium çıktı	NucleoSpin® 8 Virüs
		Çekirdek Takımı
vakum veya santrifüj	Yüksek Verimli	NucleoSpin® 96 Virüs
		Çekirdek Takımı

Kit özellikleri

	NucleoSpin[®] 8 / 96 virüs
Örnek büyüklüğü	100 -150 µl
Kurtarma oranları	>% 90
Analiz sınırı	30-60 cp / ml
Elution hacmi	70-100 µl
Kapasite Cilt	40 mg
Zaman / 6 şerit veya 1 tabak	60 dk
Sütun tipi	8-iyi şeridi veya 96-iyi plaka

Kullanılabilecek numuneler

- 100-150µl plazma
- Serum
- Serbest biyolojik sıvılar
- Doku süspansiyonları
- Dışkı örnekleri
- Sulandırılmış kan örnekleri

Gerekli donanımlar

- Santrifüj
- Vakum

Kit kullanımının (santrifüj altında) protokolü

Standart protokol HCV yada HIV den viral RNA arındırılma işleminde kullanılmasını tavsiye eder. CMV gibi DNA virüsleri de izole edilebilir fakat Proteinaz K eklenmesi önerilir.

İzolasyon prosedürüne başlamadan önce 70 °C 'de buffer ların ve solüsyonların inkübe edilmesi gerekir.

Kit 8 için (santrifüi altında)

1 lizis

100 µl örnek

400 µl Buffer RAV 1

(20 µl proteinaz K)

mix

25 ° C - 70 ° C, 10 dk

2 bağlayıcı DNA ayarlayın
koşullar

400 µl etanol

mix

5 Yıkama silika membran

500 µl RAW

5.600 x g, 2 dak

700 µl RAV3

5.600 x g, 5 dk

700 µl RAV3

X 5.600 g, 15 dk

6 Elution

100 µl RE, 70 ° C

5.600 xg, 2 dak

İsteğe bağlı: repeat elution adım
bir kez

Kit 8 için (vakum altında)

1 lizis

100 µl örnek

400 µl Buffer RAV 1

(20 µl proteinaz K)

mix

25 ° C - 70 ° C, 10 dk

**2 bağlayıcı DNA ayarlayın
koşullar**

400 µl etanol

mix

3 Yük örnekleri

Transfer numunelere

NucleoSpin[®] Virüs

Şeritler Cilt

**Silis için 4 Bind DNA
membran**

-0,2 Bar *, 5 dk

