

VAJA: MOLEKULARNA DIAGNOSTIKA

1. IZOLACIJA DNA

Postopek:

1) Priprava vzorcev in reagentov

- ◆ pripravimo vodno kopel (56°C)
- ◆ pufroma za spiranje AW1 in AW2 dodamo navedeno količino absolutnega etanola, liofilizirani proteazi dodamo priloženo topilo
- ◆ vzorcu polne krvi in vsem reagentom omogočimo, da se segrejejo na sobno temperaturo

2) Izolacija DNA iz polne krvi

1. v epruveto, ki vsebuje 200 µL polne krvi, dodamo 20 µL proteaze (vorteks!!)
2. v isto epruveto dodamo 200 µL pufru AL in premešamo na vibracijskem mešalniku (15 s)

POZOR! Zaporedje dodajanja reagentov in vzorca lahko tudi spremenimo, vendar v nobenem primeru ne smemo dodati pufru AL direktno k proteazi ali obratno.

3. inkubiramo v vodni kopeli 10 minut pri 56°C
4. dodamo 200 µL absolutnega etanola. Premešamo na vibracijskem mešalniku (15 s) + centrifugiranje
5. vsebino previdno prenesemo v kolono, ki smo jo vstavili v zbirno epruveto. Centrifugiramo 1 minuto pri 6000 g. Kolono nato prenesemo v novo zbirno epruveto, filtrat zavržemo.
6. v kolono odmerimo 500 µL pufru za spiranje AW1 in centrifugiramo 1 minuto pri 6000 g. Kolono nato prenesemo v novo zbirno epruveto, filtrat zavržemo.
7. v kolono odmerimo 500 µL pufru za spiranje AW2 in centrifugiramo 3 minute pri 15000 g. Kolono nato prenesemo v 1,5 mL epruveto, filtrat zavržemo.
8. v kolono odmerimo 200 µL pufru AE ali prečiščene vode. Inkubiramo pri sobni temperaturi 1 do 5 minut, nato centrifugiramo 1 minuto pri 6000 g. Kolono zavržemo, izolat DNA je v filtratu.

3) Ocena količine in kvalitete DNA

- ◆ količino DNA ocenimo z meritvijo absorbance pri 260 nm. Raztopina DNA s koncentracijo 50 µg/mL ima absorbanco pribl. 1.
- ◆ čistoto izolata ocenimo z meritvijo razmerja absorbanc pri 260 in 280 nm
- ◆ kvaliteto (integriteto) DNA ocenimo z elektroforezo na 2% (m/V) agaroznem gelu z vgrajenim etidijevim bromidom. Uporabimo 2 µL izolata DNA in 2 µL nanašalnega pufru z bromfenol modrim. Elektroforeza poteka v 1x TAE pufru 30 minut pri stalni napetosti 100 V. Po končani elektroforezi gele presvetlimo z UV svetlobo valovne dolžine 302 nm in gel fotografiramo.
 - ❖ priprava 2% agaroznega gela z vgrajenim etidijevim bromidom. V erlenmajerico natehtamo 2,3 g agaroze. Dodamo 115 mL pufru TAE, postavimo na tehtnico in stariramo. Pokrijemo z urnim steklom in v mikrovalovni pečici segrevamo toliko časa, da dobimo prozorno raztopino. Pustimo 5 minut, da se raztopina nekoliko ohladi; med tem pripravimo model za gel. Raztopini dodamo 4 µL etidijevega bromida, dobro premešamo in prelijemo v model. Po 30 minutah vzamemo gel iz modela.

Material:

- QIAamp kolona
- Tri zbirne epruvete (2 mL)
- Dve 1,5 mL epruveti
- Pufer AL
- Pufra za spiranje AW1 in AW2
- Pufer AE ali prečiščena voda
- Proteaza in topilo za proteazo
- Absolutni etanol

Aparature:

Rezultati:

Komentar: