

PrepFiler® BTA Forensic DNA Extraction kit

Izolační protokol

Reagencie:

PrepFiler® BTA Forensic DNA Lysis Buffer
1.0 M roztok DL-Dithiothreitolu (DTT)
Proteináza K
PrepFiler® Lysis Buffer
PrepFiler® Magnetic Particles
Isopropanol
PrepFiler® Wash Buffers A a B
PrepFiler® Elution Buffer

Spotřební plastik:

2 ml zkumavky se šroubovacím uzávěrem
1,5 ml zkumavky

Laboratorní vybavení:

Pipety
Špičky s filtrem
Vortex
Mikrocentrifuga
Thermoshaker
16ti jakmový magnetický stojan

Před izolací:

- Inkubujte magnetické částice 37°C po dobu deseti minut, rozsuspendujte a před použitím zkumavku obraťte tam a zpět
- Pokud se v PrepFiler® BTA Forensic DNA Lysis Buffer objeví sraženiny, inkubujte při 37°C po dobu patnácti minut a krátce zvortexujte
- Do PrepFiler® Wash Buffer A přidejte 93 ml 95% etanolu a označte na lahvičce
- Do PrepFiler® Wash Buffer B přidejte 19, 5 ml 95% etanolu a označte na lahvičce

Použitelnost pufrů je 6 měsíců od data ředění.

Postup izolace

1. Zhřejte thermoshaker na 56 °C
2. Do zkumavky nasypete 100 mg kostního prášku.
3. Připravte lyzační směs dle návodu a zvortexujte.

Komponenta	Objem (1 reakce)
PrepFiler® BTA Lysis Buffer	220 µl
1.0 M DTT	3 µl

Proteináza K	7 μ l
--------------	-----------

4. Přidejte lyzační pufr ke vzorku.
5. Pečlivě uzavřete a 5 vteřin centrifugujte, poté velmi jemně zvortexujte.
6. Umístěte do thermoshakeru a při 56 °C a 1100 rpm inkubujte 24 hodin.
7. Nechte zchladnout zkumavky se vzorky na pokojovou teplotu a centrifugujte 90 vteřin na 10 000g. Poté lyzát bez sedimentu přemístěte do čisté mikrozukavky.

Lyzát lze po tomto kroku uchovat dobu jednoho týdne při -80 °C.

8. Přidejte 300 μ l PrepFiler® Lysis Buffer k lyzátu, krátce vortextuje.
9. Zvortexujte Prepfiler® Magnetic Particles. Správnou rozsuspendaci si ověřte otočením zkumavky.
10. Napipetujte 15 μ l magnetických částic do lyzátu, uzavřete zkumavku, a velmi pomalu vortextujte (500 – 1200 rpm) po dobu deseti sekund. Krátce centrifugujte.
11. Přidejte 300 μ l izopropanolu (99,5% , čistota molecular biology grade), velmi pomalu vortextujte (500 – 1200 rpm) po dobu deseti sekund. Krátce centrifugujte.
12. Umístěte do thermoshakeru a při pokojové teplotě a 700 rpm inkubujte deset minut.
13. Pokud nějaké částice ulpěly na stěnách zkumavky, spláchněte je do lyzátu.
14. Vortextujte 10 sekund vzorek na maximum.
15. Umístěte zkumavky se vzorky do magnetického stojanu a deset minut nechte nasedat magnetické částice.
16. Odsajte všechnu vodnou fázi.
17. Promývejte

Prepfiler® Wash Buffer A	Prepfiler® Wash Buffers A	Prepfiler® Wash Buffers B
600 μ l	300 μ l	300 μ l

- a) Zavřete zkumavky a vyndejte z magnetického stojánku.
 - b) Vortextujte 15 sekund a poté krátce centrifugujte.
 - c) Umístěte do magnetického stojánku na 1 minutu
 - d) Odsajte všechnu vodnou fázi.
18. Krátce centrifugujte a umístěte opět zkumavku do stojánku. Nízkoobjemovou pipetou odsajte zbytek tekutiny.
 19. Pokud je stále přítomno reziduum tekutiny, umístěte zkumavku do magnetického stojanu, otevřete víčko a nechce vysušit.
 20. Zahřejte thermoshaker na 70 °C.
Přidejte 50 μ l Prepfiler® Elution Buffer a vortextujte na maximum dokud se pelet nerozsuspenduje.
 21. Umístěte do thermoshakeru a při 70 °C a 900 rpm inkubujte po dobu deseti minut.
 22. Vortextujte na maximum dokud se magnetické částice zcela nezmizí ze stěn zkumavky.
 23. Umístěte do magnetického stojánku, dokud se všechny magnetické částice nenalepí na stěnu.
 24. Odsajte pipetou veškerou tekutinu, která obsahuje izolát do přichystané mikrozukavky.
 25. Uchováváme při -20 °C