

QIAquick Gel Extraction Kit

- Extrakce fragmentů DNA (70 bp – 10 kb) z agarózových gelů po enzymatických reakcích
- Princip: Pro vazbu DNA se používá centrifugační kolonka s membránou ze silika materiálu
 - vazba DNA při vysokých koncentracích solí
 - eluce při nízkých koncentracích solí
 - odstranění enzymů, primerů, nukleotidů, solí, agarózy, etidiumbromidu a dalších nečistot



Postup

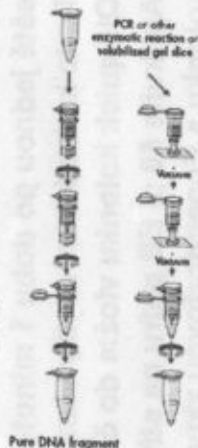
1. Na transiluminátoru při vlnové délce 365 nm vyřízneme sterilním skalpelem bloček agarózy s fragmentem DNA odpovídajícím
 1. Vektoru pBluescript (2961 bp)
 2. Inzertu (500 bp)
- Dodržujeme bezpečnost práce (RUKAVICE, OCHRANNÝ ŠTÍT!)
- Skalpel a špachtle sterilizujeme namočením do deionizované vody a následně do etanolu, který zapálíme a necháme shořet (POZOR NA ODKAPÁVAJÍCÍ HOŘÍCÍ KAPKY!)
- DNA v nezpracovávané části gelu chráníme před degradací působením UV-světla zakrytím vhodnou podložkou
- Minimalizujeme objem gelu ořezáním přebytečné agarózy (neměl by být větší než 400 μ l/400 mg)

Princip

- Bloček gelu je rozpuštěn v pufru, který obsahuje indikátor pH pro optimální vazbu na kolonku



- Roztok se aplikuje na kolonku a po centrifugaci (nebo vakuovou přesávkou) dojde k navázání DNA
- Nečistoty jsou odstraněny promýváním
- DNA je eluována elučním pufrům nebo vodou



Postup

2. Bloček agarózy přeneseme pomocí špachtle do Eppendorf. zkumavky a zvážíme
3. Přidáme 3 objemy pufru QG (např. k 200 mg = 200 μ l přidáme 600 μ l QG)
4. Inkubujeme v termobloku 10 min/50°C
5. V případě potřeby upravíme pH přidáním 10 μ l 3M octanu sodného (roztok musí být žlutý)
6. Roztok přepipetujeme na kolonku a zcentrifugujeme 1 min/ 10000 rpm. V případě, že je objem větší než 800 μ l krok opakujeme.
7. Odstraníme roztok ze sběrné zkumavky a na kolonku přidáme 750 μ l PE, centrifugujeme 1 min/ 10 000 rpm.
8. Odstraníme roztok ze sběrné zkumavky a centrifugujeme znovu 1 min/ 13000 rpm pro odstranění zbytků etanolu
9. Kolonku přemístíme do sterilní Epp. zkumavky a napipetujeme 30 μ l elučního pufru EB na střed membrány, necháme stát 1 min a centrifugujeme 1 min.

QIAGEN kit návod v češtině

- Čistým ostrým skalpelem vyřízněte fragment DNA z agarózového gelu.**
Snažte se odstranit přebytečný agarózový gel.
- Uřčete hmotnost vyříznutého gelu a přidejte 3 objemy pufru QG (100 mg ~ 100 µl).**
Např. ke 100 mg gelu přidejte 300 µl pufru QG. Maximální množství gelu by mělo být 400 mg, v případě většího množství gelu použijte víc kolonek.
- Zahřívejte Eppendorfovu zkumavku s gelem při teplotě 50 °C po dobu 10 minut dokud se gel v pufru nerozpustí. Rozpuštění gelu může urychlit míchání zkumavky na vortexu každé 2-3 minuty.**
Rozpusťte gel úplně, u gelů o koncentraci vyšší než 2% prodlužte dobu zahřívání.
- Po kompletním rozpuštění gelu zkontrolujte barvu pufru – měla by být podobná jako barva výchozího pufru QG (tzn. žlutá).**
Pokud je barva oranžová nebo fialová, přidejte 10 µl 3M octanu sodného. Adsorpce DNA na membránu kolonky je efektivní při pH ≤ 7,5. Pufr QG obsahuje pH indikátor, který je při pH ≤ 7,5 žlutý, při vyšším pH se barva změní na oranžovou nebo fialovou.
- Přidejte 1 objem (vzhledem ke hmotn. gelu) isopropanolu a zamíchejte.**
Např. když agaróza vážila 100 mg, přidejte 100 µl isopropanolu. Isopropanol zvyšuje výtěžek fragmentů větších než 4 kb a menších než 500 bp. U fragmentů s velikostí mezi 500 bp a 4 kb nemá přídavek isopropanolu žádný efekt. V tomto kroku vzorek necentrifugujte.
- Vložte kolonku QIAquick do 2ml sběrné zkumavky.**
- Napipetujte vzorek do kolonky a zcentrifugujte 1 min / ~ 12 000 rpm.**
Dojde k vazbě DNA na membránu kolonky. Maximální objem, který můžete napipetovat, je 800 µl. V případě většího objemu po stočení napipetujte zbytek.
- Vylijte proteklou kapalinu do odpadu a vložte kolonku zpět do stejné sběrné zkumavky.**
- Do kolonky aplikujte 0,5 ml QG pufru a centrifugujte kolonku se sběrnou zkumavkou 1 min / ~ 12 000 rpm.**
Tento krok odstraní zbytky agarózového gelu.
- Do kolonky aplikujte 0,75 ml PE pufru a centrifugujte kolonku se sběrnou zkumavkou 1 min / ~ 12 000 rpm.**
- Vylijte proteklou kapalinu a kolonku se sběrnou zkumavkou centrifugujte ještě jednou po dobu 1 minuty.**
Tento krok odstraní zbytky etanolu z PE pufru.
- QIAquick kolonku vložte do čisté 1,5ml Eppendorfovy zkumavky.**
- Aplikujte 50 µl EB pufru na střed membrány kolonky a centrifugujte kolonku s Eppendorfovou zkumavkou 1 min / ~ 12 000 rpm.**
Dojde k eluci DNA z membrány. V Eppendorfově zkumavce je čistá plazmidová DNA.