

Tamkan Genomik DNA İzolasyon Kiti

Cat. No. OttoP9510

Teknik destek için bize ulaşabilirsiniz info@ottosci.com

Özet ve Açıklama

Tam Kandan Genomik DNA Ekstraksiyon Kiti, 200 µL'ye kadar tam kan ve periferik kan mononükleer hücrelerinden (PBMC) yüksek kaliteli genomik DNA'nın hızlı ve etkin bir şekilde saflaştırılması için tasarlanmıştır.

Genomik DNA saflaştırma işlemi, silika membranlı spin kolon teknolojisine dayanır. Bu yöntem; tehlikeli fenol/kloroform ekstraksiyonu, zaman alan alkol çöktürme işlemleri veya maliyetli reçine bazlı saflaştırma yöntemlerine duyulan gereksinimi ortadan kaldırır.

Spin kolonlar, optimize edilmiş yüksek tuz konsantrasyonlu koşullar altında DNA'yı seçici olarak bağlar. Yıkama basamaklarıyla kontaminantların uzaklaştırılmasının ardından, kolona bağlı DNA düşük tuz konsantrasyonlu ve hafif alkali koşullarda etkin bir şekilde elüe edilir.

Hücre lizisinin ardından Ana Protokol 30 dakikadan kısa sürede tamamlanabilir ve 30 kb'den büyük fragman boyutlarına sahip saflaştırılmış genomik DNA elde edilir.

Saflaştırılan genomik DNA; PCR, qPCR, Southern blotlama ve enzimatik reaksiyonlar dahil olmak üzere çok çeşitli ileri moleküler biyoloji uygulamalarında doğrudan kullanıma uygundur.

Saklama

- Kit içerisinde bulunan tüm solüsyonlar, şişelerin hava ile temasını önleyecek şekilde sıkıca kapalı tutulması koşuluyla oda sıcaklığında (15–25°C) 12 aya kadar saklanabilir.
- Proteinaz K'nın belirtilen raf ömrü boyunca stabilitesini ve aktivitesini korumak için Proteinaz K Solüsyonu açıldıktan sonra 2–8°C'de saklanmalıdır. (İki günden daha fazla süre bekleyecekse -20°C'ye alınmalıdır)

ÖNEMLİ NOTLAR

- DNA degradasyonunu en aza indirmek için, numunelerin tekrarlayan dondurma–çözme döngülerine maruz kalmasından kaçının. Optimum ekstraksiyon verimi için taze materyal veya alındıktan hemen sonra dondurularak –20°C ya da –80°C'de saklanmış numuneler kullanın.
- Yıkama Solüsyonu 1 (Wash Solution 1) ve Yıkama Solüsyonu 2 (Wash Solution 2) konsantre tamponlar olarak sağlanmaktadır ve kullanımdan önce absolute ethanol (99.9%) ile seyreltilmelidir.

SORUN GİDERME

Problem	Possible Causes and Solutions
DNA Degradasyonu	Numune tekrarlayan dondurma-çözme döngülerine maruz kalmıştır. Tekrarlayan dondurma-çözme döngülerinden kaçının. DNA izolasyonu için taze numune kullanın. Mümkün olduğunda ekstraksiyon işlemini taze materyal kullanarak gerçekleştirin. Uygun olmayan saklama koşulları Tam kan numuneleri 4°C’de en fazla 1–2 gün saklanabilir. Daha uzun süreli saklama için kan numunelerini 200 µL’lik alikotlara ayırın ve –20°C’de saklayın.
RNA Kontaminasyonu	Yüksek düzeyde rezidüel RNA bulunmaktadır. Planlanan uygulama için RNA içermeyen DNA gerekiyorsa, lizis tamponunu eklemeyen önce numuneye 20 µL RNaz A solüsyonu (10 mg/mL) ekleyin.
Enzimatik Reaksiyonların İnhibisyonu	Saflaştırılmış DNA rezidüel etanol içermektedir. Son yıkama basamağından sonra kolonda rezidüel alkol kalması durumunda, kolonu yeni bir toplama tüpüne aktarın ve maksimum hızda ($\geq 20.000 \times g$; ≥ 14.000 rpm) 1 dakika santrifüj edin. Saflaştırılmış DNA rezidüel tuz içermektedir. Tüm yıkama basamaklarının, protokolde belirtilen yıkama sayısı ve hacimlere uygun olarak gerçekleştirildiğinden emin olun.
Düşük DNA Verimi	Lizat hazırlama basamağında aşırı miktarda numune kullanılmıştır. Kullanılan numune miktarını azaltın. Protokolde belirtilen numune hacimlerini aşmayın. Sindirilmemiş başlangıç materyali bulunmaktadır. Proteinaz K sindiriminin 56°C’de gerçekleştirildiğinden emin olun. Gerekirse, tam sindirim sağlanana kadar inkübasyon süresini uzatın. Numune lizat içerisinde yeterince karıştırılmamıştır. Vorteksleme sonrasında içerik tamamen karışmamışsa, pipetaj yaparak lizatı homojenize edin. Etanol eklenmemiştir. Lizata etanol eklendiğinden ve iyice karıştırıldığından emin olun. Ayrıca, kullanımdan önce yıkama tamponlarına etanol eklendiğini doğrulayın.

Yıkama Solüsyonu Hazırlama*Etil Alkol (Mutlak, %99,9) Ekleme Kılavuzu***Yıkama Solüsyonu-1 (WB-1)**

Kit Miktarı	Yıkama Solüsyonu 1 (WB-1)	Etanol (%99,9)	Son Hacim
50 Test	18 mL	11 ml	29 ml
100 Test	36 mL	22 ml	58 ml
250 Test	80 ml	49 ml	129 ml

Yıkama Solüsyonu-2 (WB-2)

Kit Miktarı	Yıkama Solüsyonu-2 (WB-2)	Etanol (%99,9)	Son Hacim
50 Test	17 mL	41 ml	58 ml
100 Test	34 mL	82 ml	116 ml
250 Test	77 ml	180 ml	257 ml

Not: İlk kullanımdan önce, belirtilen hacimde mutlak etanolü yıkama solüsyonu konsantresine ekleyin.

KİT İÇERİĞİ

Tamkan Genomik DNA DNA Kat. No.: OttoP9510	250 Test OttoP9510-250	100 Test OttoP9510-100	50 Test OttoP9510-50
Lizis Tamponu (LB)	65 mL	26 mL	13 mL
Proteinase K Tamponu	5 × 1.30 mL	2 × 1.30 mL	1.30 mL
Yıkama Tamponu-1 (WB-1)	80 mL	36 mL	18 mL
Yıkama Tamponu -2 (WB-2)	77 mL	34 mL	17 mL
Spin Kolon	250	100	50
Elüsyon Tamponu (EB)	30 mL	14 mL	10 mL

TAM KANDAN GENOMİK DNA İZOLASYONU ANA PROTOKOL

1	NUMUNE HAZIRLAMA		1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne aşağıdaki bileşenleri belirtilen sırayla ekleyin: a. PK Solüsyonu: 25 µL b. Tam Kan: 200 µL c. LB Solüsyonu (Lizis Tamponu): 250 µL
2	LİZİS		 Tüm bileşenler iyice karışana ve lizat homojen hale gelene kadar 15 saniye vorteksleyin.
3	İNKÜBASYON		 56°C'de 5 dakika inkübe edin.
4	ETANOL EKLEME		 250 µL mutlak etanol (Etil Alkol, %99,9) ekleyin. Lizati pipetaj yaparak iyice karıştırın.
5	BAĞLANMA		 Tüm lizati spin kolona aktarın. 8.000 × g'de 1 dakika santrifüj edin. Akışkan fazı uzaklaştırın ve toplama tüpünü yenisi ile değiştirin.
6	YIKAMA 1 (WB-1)		 500 µL Yıkama Tamponu-1 (WB-1) spin kolona ekleyin. 8.000 × g'de 1 dakika santrifüj edin. Akışkan fazı uzaklaştırın ve toplama tüpünü yenisi ile değiştirin.
7	YIKAMA 2 (WB-2)		 500 µL Yıkama Tamponu-2 (WB-2) spin kolona ekleyin. 8.000 × g'de 1 dakika santrifüj edin. Akışkan fazı uzaklaştırın ve toplama tüpünü yenisi ile değiştirin.
8	İKİNCİ YIKAMA / KURUTMA SANTRİFÜJÜ		 500 µL WB-2 Solüsyonu ekleyin. 8.000 × g'de 2 dakika santrifüj edin. Ardından kolonu temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktararak DNA elüsyonu için hazırlayın.
9	ELÜSYON		 50–100 µL Elüsyon Tamponu (EB) doğrudan spin kolon membranının merkezine ekleyin. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edin.
10	SON SANTRİFÜJ		 8.000 × g'de 1 dakika santrifüj edin.
11	GENOMİK DNA		 Elüat saflaştırılmış genomik DNA'yı içerir ve downstream uygulamalar için hazırdır.

i Tüm santrifüj adımları: **8.000 × g** (yaklaşık 1 dakika = ~10.000 rpm, rotora bağlı olarak değişebilir).

Protokolün Açıklaması**1. Numune Hazırlama**

1,5 mL'lik bir mikrosantrifüj tüpüne aşağıdaki bileşenleri belirtilen sırayla ekleyin:

- a. PK (Proteinaz K) Solüsyonu: 25 µL
- b. Tam Kan: 200 µL
- c. LB Solüsyonu: 250 µL

Not: Bileşenleri a–b–c sırasına göre ardışık olarak ekleyin. EDTA'lı tüpe alınmış tam kan kullanılması önerilir.

2. Lizis

Tüm bileşenler tamamen karışana ve lizat homojen hale gelene kadar 15 saniye vorteksleyin.

3. İnkübasyon

56°C'de 5 dakika inkübe edin.

4. Etanol Ekleme

250 µL mutlak etanol ekleyin.

Lizat homojen hale gelene kadar pipetaj yaparak iyice karıştırın.

5. Bağlama

Lizatın tamamını spin kolona aktarın.

8.000 × g'de 1 dakika santrifüj edin.

Akışkan fazı (flow-through) uzaklaştırın ve toplama tüpünü yenisiyle değiştirin.

6. Yıkama-1

Spin kolona 500 µL Yıkama Tamponu-1 (WB-1) ekleyin.

8.000 × g'de 1 dakika santrifüj edin.

Akışkan fazı uzaklaştırın ve toplama tüpünü yenisiyle değiştirin.

7. Yıkama-2

Spin kolona 500 µL Yıkama Tamponu-2 (WB-2) ekleyin.

8.000 × g'de 1 dakika santrifüj edin.

Akışkan fazı uzaklaştırın ve toplama tüpünü yenisiyle değiştirin.

8. İkinci Yıkama / Kurutma Santrifüjü

Spin kolona 500 µL WB-2 Solüsyonu ekleyin.

8.000 × g'de 2 dakika santrifüj edin.

DNA elüsyonu için spin kolonu temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarın.

9. Elüsyon

50–100 µL EB Solüsyonunu doğrudan spin kolon membranının merkezine ekleyin.

Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edin.

10. Son Santrifüj

8.000 × g'de 1 dakika santrifüj edin.

Elde edilen elüat, saflaştırılmış genomik DNA'yı içerir ve ileri moleküler uygulamalarda (downstream applications) kullanıma hazırdır.