

DEP-25 DNA Extraction Kit

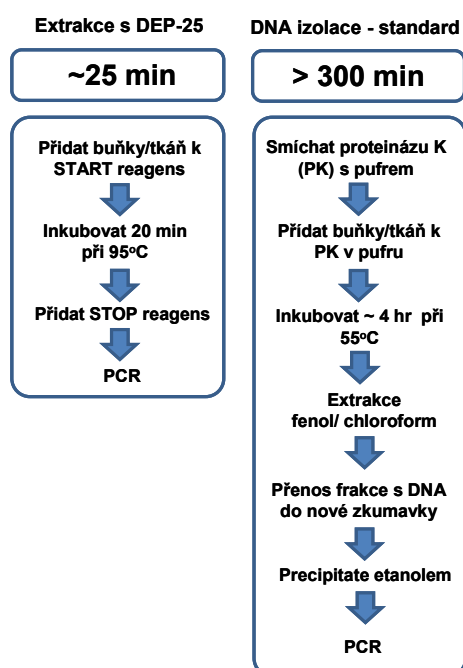
(Katalogové číslo D225, D226, D227)

Popis

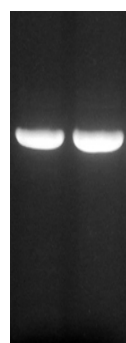
DEP-25 (DNA Extrakce pro PCR do **25** min) je dvousložková souprava pro extrakci genomové DNA různého původu. Hlavní výhodou soupravy je, že extrakce je provedena rychle a v jedné zkumavce. Souprava umožňuje vysokokapacitní extrakci DNA a je zvláště vhodná pro identifikaci genotypů, určování identity buněk a jejich případných kontaminací.

Rychlá, snadná, robustní a spolehlivá extrakce DNA

- DNA z různých buněk a tkání může být připravena do 25 min a nevyžaduje časově náročné enzymatické opracování, purifikaci na koloně nebo fenol/chloroformovou extrakci (**Obr. 1**). Použitelnost metody byla extenzivně testována při genotypizaci různých vzorků (**Obr. 2**).



Obr. 1. Schematické znázornění postupu přípravy genomové DNA ve kvalitě vhodné pro PCR analýzu. Extrakce DNA pomocí DEP-25 zahrnuje 3 jednoduché kroky a trvá ~25 minut. Tato procedura je rychlejší, jednodušší, bezpečnější a lacinější než standardní metoda izolace DNA, která využívá proteinázu K a následnou extrakci pomocí fenolu a chloroformu nebo metody využívající centrifugační kolonky.



Obr. 2. Amplifikace genomové DNA izolované pomocí DEP-25 soupravy (1) nebo standardní DNA izolační metody (2). Pro PCR byly použity oligonukl. primery specifické pro DNA fragment o velikosti 864 párů bází [Nucl. Acids Res., 36(15):e93, 2008]. PCR amplikony byly frakcionovány na agarózovém gelu a barveny ethidium bromidem. Pouze fragmenty očekávané velikosti byly detegovány.

Barevný indikátor

- DEP-25 je složena ze dvou složek, **START-Blue** a **STOP**. START-Blue obsahuje barevný indikátor pro vizuální indikaci správnosti roztoku. Po přidání stejného objemu STOP reagens, roztok se změní na bezbarvý.

Kompletní souprava

- DEP-25 obsahuje veškerá reagens nezbytná pro rychlou extrakci genomové DNA z buněk různého původu, včetně buněčných linií kultivovaných in vitro, vzorků tkání, vlasů, buňkových stěrů, biopsie myších ocásků nebo ušní tkáně.

Široká využitelnost

- DNA izolovaná pomocí DEP-25 je využitelná při genotypizaci pomocí metody PCR a PCR v reálném čase (qPCR). Extrahovaná DNA je kompatibilní jako templát se všemi Master Mixy Top-Bio provenience.

Ekonomická výhodnost

- Souprava obsahuje reagens pro extrakci DNA ve kvalitě pro PCR za zlomek ceny jiných metod nebo komerčních přípravků.

Kat. č.	Název výrobku a specifikace	Množství
D225	DEP-25 DNA Extraction Kit, 100 extrakcí	2x 8ml
D226	DEP-25 DNA Extraction Kit, 400 extrakcí	2x 30ml
D227	DEP-25 DNA Extraction Kit, 1600 extrakcí	2x 120ml



Technické údaje

Komponenty balení

- DEP-25 DNA Extraction Kit se dodává v lahvích obsahujících 2x 8 ml (Kat. č. D225), 2x 30 ml (Kat. č. D226) nebo 2x 120 ml (Kat. č. D227) reagens **START-Blue** a **STOP**.
- Každá souprava obsahuje návod na DNA extrakci v kvalitě pro PCR.

Skladování

- Při teplotě 2-8°C. Krátkodobě (několik dnů) při teplotě do 35°C. Tyto skladovací parametry umožňují transport bez chlazení ("nature friendly").

Čistota a kontrola kvality

- Každá šarže DEP-25 DNA Extraction Kitu je testována z hlediska využitelnosti pro extrakci genomové DNA ve kvalitě pro PCR. Výsledky PCR jsou ověřovány elektroforézou v agarózovém gelu. Po obarvení ethidium bromidem je detegována pouze DNA očekávané velikosti (**Obr. 2**).

Protokol

Materiály, které jsou požadované, ale nejsou součástí dodávky

- Mikrocentrifugační zkumavky (0,2 ml nebo 0,5 ml), zkumavky pro PCR (0,2 ml) nebo 96-jamkové desky pro PCR.
- Pipetovací dávkovače a špičky.
- Teplotní cykler nebo vyhřívaný blok (95°C) pro 0,2 ml zkumavky, 0,5 ml zkumavky nebo 96-jamkové desky pro PCR.

Pokud není uvedeno jinak, jsou všechny úkony prováděny při pokojové teplotě.

1. Do 0,2 ml nebo 0,5 ml zkumavek přenést 10^5 - 10^6 buněk v PBS. Buňky jsou peletovány centrifugací a supernatant je pečlivě odstraněn (odsátím). Alternativně, fragment tkáně (např. 2 - 5 mm zmrzlého nebo čerstvého konce ocásku myši, kousek zmrazené nebo čerstvé ušní tkáně, vlasy nebo 1 - 5 mg jiné tkáně) jsou přeneseny do zkumavek.
2. K buňkám nebo vzorku tkáně přidat 75 μ l DEP-25 **START-Blue** reagens. Kontrolovat, že buňky/tkáně jsou kompletně ponořeny v reagens. V případě použití buňkových stěrů (s využitím pěnové stěrky), vložit konec stěrky do zkumavky s 75 μ l DEP-25 **START-Blue** reagens a uvolnit buňky promícháním.
3. Zahřát vzorky na 95°C po dobu 20 min v cyklu pro PCR nebo v teplotním bloku. Solidní tkáně nebudou v řadě případů úplně solubilizovány; to však neovlivní následné použití extraktu pro genotypizaci.
4. Vzorky ochladit na pokojovou teplotu, přidat 75 μ l DEP-25 **STOP** reagens a obsah promíchat. Po přidání **STOP** reagens, **START-Blue** reagens se změní na bezbarvý roztok.
5. Použít 1 - 2,5 μ l extraktu jak zdroj templátové DNA pro následnou PCR nebo qPCR o objemu 25 μ l. Při požadavku na změnu objemu PCR, přidávat maximálně 1/10 objemu reakční směsi pro PCR.

Poznámky

Skladování - DNA extrakt může být skladován při teplotě $4 \pm 2^\circ\text{C}$ nebo $-20 \pm 5^\circ\text{C}$ po několik měsíců. Pro skladování není nutné odstranit zbytkovou tkáň ze zkumavek.

Velké počty vzorků - extrakce buněk nebo tkání může být provedena v 96-jamkových destičkách pro PCR s využitím PCR cyklerů nastavených na teplotu 95°C.

Rychlý protokol - solubilizace buněk při 95°C může být zkrácena na 10 min. V případě buněčných suspenzí může být inkubace omezena na 5 min.

Maximální výtěžnost - tkáně je vhodné rozdělit na menší fragmenty pro urychlený průnik **START-Blue** reagens k buňkám. To vede k vyšší výtěžnosti templátové DNA. Podobný efekt může být dosažen prodloužením inkubace při 95°C až na 60 min. Optimální doba extrakce závisí na typu tkáně.

DNA extrakce z buňkových stěrů - z důvodu malého objemu roztoků používaných pro DNA extrakci je nutno použít malé stěrové tampony z pěny ("foam tipped swab"). Vatové tampony nejsou vhodné neboť absorbují značné množství **START** reagens, které nelze účinně uvolnit z tamponu.

Změny objemu - DNA extrakce může být provedena i v jiných zkumavkách nebo s jinými objemy reagens. Vždy však je nutné k **START-Blue** reagens přidat stejný objem **STOP** reagens.

Suboptimální PCR - v případě většího počtu buněk nebo tkáně, dochází k uvolnění inhibitorů, které mohou blokovat PCR. Naředění DNA extraktu vodou může problém odstranit. V případě malého počtu buněk je nutno navýšit počet cyklů PCR.