

## Protokół izolacji

1. Próbkę nanieść na kolumny filtracyjne Filtr 1.

Kolumna z żółtym kółkiem służy do usuwania większych zanieczyszczeń pochodzących z podłoża lub niezliwowanych fragmentów tkanek.



2. Całość wirować 1 min przy 10 000 RPM (9000 x g).



3. Usunąć kolumny filtracyjne Filtr 1. Przesączyć, w którym znajduje się DNA, nanieść na kolumny oczyszczające Spin 10 AX.

Kolumna z niebieskim kółkiem jest właściwą kolumną oczyszczającą.



4. Wirować 1 min przy 8000 RPM (6000 x g).



5. Wylać przesącz i ponownie umieścić kolumny Spin 10 AX w tych samych probówkach.



6. Nanieść na kolumny Spin 10 AX po 600 µl roztworu płuczącego K2. Wirować 1 min przy 8000 RPM (6000 x g).



7. Wylać przesącz i ponownie umieścić kolumny Spin 10 AX w tych samych probówkach.



8. Nanieść na kolumny Spin 10 AX po 600 µl roztworu płuczącego K2.



9. Wirować 1 min przy 8000 RPM (6000 x g).



10. Wylać przesącz i umieścić kolumny Spin 10 AX w nowych 2 ml probówkach typu Eppendorf (w zestawie).



11. Nanieść na kolumny Spin 10 AX po 350  $\mu$ l roztworu elucyjnego K3. Inkubować przez 2 min w temp. pokojowej.



12. Wirować 1 min przy 8000 RPM (6000 x g).



13. Ponownie nanieść na kolumny Spin 10 AX po 350  $\mu$ l roztworu elucyjnego K3. Inkubować przez 1 min w temp. pokojowej. Wirować 1 min przy 8000 RPM (6000 x g).



14. Usunąć kolumny Spin 10 AX, a przesącz, w którym znajduje się DNA, przenieść pipetą (~ 700  $\mu$ l) do nowych 1,5 ml probówek typu Eppendorf (nie ma w zestawie).



15. Dodać po 5  $\mu$ l wzmacniacza precypitacji oraz 600  $\mu$ l izopropanolu. Całość wymieszać i wirować 10 min przy 10 000 RPM (9000 x g).



16. Usunąć supernatanty, uważając aby nie usunąć niebieskich osadów DNA.

17. Dodać po 500  $\mu$ l 70% etanolu. Całość wymieszać i wirować 5 min przy 10 000 RPM (9000 x g).



18. Usunąć supernatanty, a osady DNA suszyć przez odwrócenie probówek przez 10 min w temp. pokojowej.

Jeżeli na ściankach probówki znajdują się resztki alkoholu to należy je osuszyć kawałkiem jałowej waty (doskonale nadają się do tego patyczki higieniczne oraz pałeczki do pobierania wymazów).  
Niebieska barwa osadu umożliwia śledzenie procesu rozpuszczania DNA.

19. Osady zawiesić w buforze TE (w zestawie), wodzie jałowej, wolnej od nukleaz (nie ma w zestawie, nr kat. 003-075, 003-25) lub buforze Tris 10 mM, pH 8,0 (nie ma w zestawie).



20. Oczyszczone DNA przechowywać w temp. 4 °C do czasu dalszych analiz.