

Laboratuvar Teknikleri

Periferik Kandan DNA İzolasyonu

FENOL-KLOROFORM KULLANARAK DNA İZOLASYONU

1. Az Miktarda Kan Örneğinden;

• EDTA içeren tüplere alınmış olan kan örneklerinin 500 µL'si 1-5 mL'lik ependorf tüpüne konulur.

• Kan örneklerinin üzerine son hacim 1 mL olacak şekilde TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA) tamponu ilave edilir ve daha sonra tüpler 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir.

• Üstte kalan sıvı kısım atılır ve üzerine yeniden 1 mL olacak şekilde TE tampon ilave edilir ve yeniden santrifüj edilir. Bu yıkama işlemi üç kez tekrarlanır.

• Son yıkama işleminden sonra üst faz uzaklaştırılır ve pellet üzerine 80 µL %10 sodyum dodesil sülfat (SDS), 90 µL 1 M NaCl ve 10 µg/µL proteinaz-K ilave edilir. Son hacim, TE tamponu kullanılarak 500 µL'ye tamamlanır.

• Örnekler 56°C'de 90 dakika inkübe edilir.

• İnkübasyon sonunda tüplerin üzerine tüpün içindeki hacime eşit miktarda fenol-kloroform (250 µL fenol ve 250 µL kloroform) ilave edilir.

• Tüpler 2500 rpm'de 2 dakika santrifüj edilir.

• Üstte kalan DNA içeren tabaka yeni bir tüpe aktarılır ve üzerine DNA'nın çökmesi için saf etil alkol ilave edilir.

• DNA santrifüj edilerek çöktürüldükten sonra, üzerindeki alkol tamamen uzaklaştırılır ve %70'lik etil alkol ilave edilir.

• Santrifüj edilerek DNA çöktürüldükten sonra alkol uzaklaştırılır ve tamamen kuruması sağlandıktan sonra DNA peletin büyüklüğüne göre 100-500 µL steril distile su içerisinde çözülür.

2. 8-10 mL Kan Örneğinden;

• Her hasta için, 8-10 mL EDTA'lı kan 50 mL'lik etiketlenmiş falkon tüpe boşaltılır. 35-40 mL'ye kadar TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA) ilave edilir. 4000 rpm'de 4 dakika santrifüj edilir.

• Falkon tüpte 5 mL kalacak şekilde fazlası çektirilir veya yavaşça dökülür. Üstüne 25 mL TE eklenir ve karıştırılır. 4000 rpm'de 4 dakika santrifüj edilir.

• Tüpte 5 mL kalacak şekilde fazlası çektirilir ve 15 cc'ye TE ile tamamlanır, karıştırılır. 4000 rpm'de 4 dakika santrifüj edilir.

• Üç yıkamadan sonra, alt taraftaki bulutumsu tabaka ve pelet kalacak şekilde üst kısım atılır. Vorteksenerek peletin çözünmesi sağlanır.

• 1.6 mL %10 SDS 1.8 mL 1M NaCl ilave edilir ve vortekslendiklen sonra üzerine 2.5 mL TE eklenir ve karıştırılır.

• Üzerine 65 mL proteinaz-K (10 mg/mL) ilave edilir.

Yazışma Adresi: Dr. E. BIRBEN

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Allerji ve Astım Ünitesi, ANKARA.

e-posta: esrabirben@yahoo.com

- En az 2 saat 56°C'de Benmari'de bekletilir her 30 dakikada bir karıştırılır veya hücreler yeterince parçalanıp viskoz sıvı oluşmamışsa bir gece boyu 37°C'de inkübe edilir.

- Üzerine 5 mL tris ile satüre edilmiş fenol eklenir ve karıştırılır. Süt beyazı bir renk oluşur.

- Üzerine 5 mL kloroform eklenir ve karıştırılır. Beş dakika +4°C'de buzdolabına konulur.

- 2500 rpm'de 3 dakika santrifüj edilir.

- Pipet yardımıyla üst fazdan alıp 15 mL'lik falkon tüplere aktarılır. Bu kısım su gibi berrak olmalı, kahverengi (fenol) asla karışmamalıdır.

- Falkona aktarılan DNA'yı içeren fazın üstüne 15 mL'ye kadar %100 soğuk etanol ilave edilir. Alt üst edilerek karıştırılır. DNA sarmalları çıplak gözle bile görülebilir hale gelir.

- 10 dakika -20°C'de bekletildikten sonra 4000 rpm'de 4 dakika santrifüj edilir.

- Üstteki alkol uzaklaştırılır ve dipteki DNA üzerine 5 mL %70'lik soğuk alkol eklenir.

- 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir.

- Alkol tamamen uzaklaştırılır.

- Tam olarak kuruduktan sonra üzerlerine 0.5-1 cc distile steril su eklenir. DNA çözülene kadar oda ısısında bekletilir.

3. Tuzla Çöktürme Yöntemi

- 8-12 mL eritrosit lizis solüsyonu üzerine 1 mL tam kan ilave edilir ve alt üst edilir.

- 3000-4500 rpm'de 5 dakika çevrilir.

- Süpernatant dökülür ve üzerine 850 µL nükleli lizis eklenir (istenirse 10 µg/mL proteinaz-K konabilir).

- Vortekslenir (20 dakika süresince her 4 dakikada bir vortekslenir) alternatif olarak 10-15 dakika süreyle pipetaj yapılır veya istenirse bir gece 40-60°C'de inkübe edilir.

- 850 µL kloroform eklenir ve vortekslenir.

- 1.5 mL-2.0 mL'lik ependorf tüpe aktarılır.

- 12.000-13.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilir.

- Süpernatant alınır (üst faz) 1 mL %100 etil alkol içine aktarılır.

- Alt üst edilir ve DNA gözle görülür hale getirilir.

- 13.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilir.

- Süpernatant dökülüp %70'lik alkolde yıkanır ve 13.000 rpm de 3 dakika santrifüj edilir.

- Süpernatant dökülür ve tüpler kurutma kağıdına ters çevrilerek kurutulur.

- Üzerine 200-300 µL steril distile su veya 10 mM Tris eklenir.

- Vortekslenir ve oda ısısında veya 37°C'de 1-2 saat inkübe edilir.

- Tekrar vortekslenir.

- Kullanılınca kadar -20°C'de muhafaza edilir.

4. Gerekli Solüsyonlar

• Eritrosit lizis solüsyonu (hipotonik solüsyonu)

20 x eritrosit lizis tamponu (3.1 M NH₄Cl, 0.2 M KHCO₃, 20 mM EDTA, pH:7.4)

• Nükleli lizis solüsyonu

Tris EDTA, pH: 8.0 1 mL, NaCl, 5 M 8 mL, EDTA, 0.5 M 0.4 mL, dH₂O ile 100 mL'ye tamamlanır.

E. BİR BEN*

* Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Çocuk Allerji ve Astım Ünitesi
ANKARA