Syngen Soil DNA Midi Kit

Co potrzeba:
- Etanol 96-98%
- Łaźnia na 60°C
- Łaźnia na 70°C
- Lód
- Worteks
- Wirówka na probówki 50 ml od 2500 do 15.000 x g
- Probówki wirówkowe 50 ml na 15.000 x g
- Pipety automatyczne i tipsy, najlepiej z filtrem

Zanim zaczniesz:
- Sprawdź, czy nie wytrąciło się nic w buforze DLS1, jeśli tak, podgrzej go w 60°C przez 10 minut
- Ogrzej bufor elucyjny DE w 60°C przed elucją
- Przygotuj bufor DPZ dodając etanol w ilości podanej na fiolce (zwykle 6 ml)

Procedura:
1. Do probówki 50 ml dodaj maksymalnie 10 g próbki gleby oraz 2 g kulek szklanych i wymieszaj.
2. Dodaj 15 ml buforu DLS1, zworteksuj przez 5 minut i inkubuj w 70°C przez 10 minut, worteksując dwukrotnie podczas inkubacji, aż do całkowitego zhomogenizowania.
3. [Opcja: bakterie G(+)]
   Jeśli izolujesz DNA z bakterii G(+) w próbce, przeprowadź dodatkową inkubację w 95°C przez 5 minut.
4. Doprowadź próbkę do temperatury pokojowej.
   Dodaj 5 ml buforu DLS2, dobrze zworteksuj i inkubuj na lodzie przez 5 minut.
5. Zwiruj przy 2500 x g przez 5 minut w temperaturze pokojowej.
6. Ostrożnie przenieś lizat do czystej probówki 50 ml do wirowania (nie dostarczono).
   Oszacuj objętość lizatu, dodaj taką samą objętość izopropanolu i zworteksuj.
7. Zwiruj przy 15.000 x g przez 30 minut w 4°C.
8. Ostrożnie, uważając na pelet, wylej supernatant i umieść probówkę na 5 minut na ręczniku papierowym wieczkiem do dołu, aby usunąć pozostałości roztworu.
9. Do probówki z peletem dodaj 2 ml wcześniej podgrzanego buforu elucyjnego DE lub ddH_2O.
   Zworteksuj, aby pelet DNA całkowicie się rozpuścił.
10. Dodaj 1 ml dobrze wymieszanego buforu DLS3 do próbki, zworteksuj i inkubuj przez 3 minuty w temperaturze pokojowej. Łatwiej pipetuje się bufor DLS3 tipsem z obciętą końcówką.
11. Zwiruj przy 2500 x g przez 5 minut w temperaturze pokojowej.
    Ostrożnie przenieś sklarowany lizat do nowej probówki 15 ml lub 50 ml i wyrzuć probówkę z osadem.
12. [Opcja: trawienie RNA]
    jeśli potrzebujesz DNA wolne od RNA, dodaj 4 µl RNazy A 100 mg/ml (nie dostarczono), wymieszaj i inkubuj przez 2 minuty w temperaturze pokojowej.
13. Oszacuj objętość lizatu. Dodaj taką samą objętość buforu DWS oraz taką samą objętość etanolu i zworteksuj pulsacyjnie.
14. Umieść kolumnę DS w nowej probówce 50 ml i przenieś całą zawartość lizatu na kolumnę.
    Wiruj przez 2 minuty przy 2500 x g w temperaturze pokojowej. Wylej przesącz.
15. Dodaj na kolumnę 7 ml buforu DPZ.
    Wiruj przez 2 minuty przy 2500 x g w temperaturze pokojowej. Wylej przesącz.
16. Powtórz krok 15
17. Wiruj przez 10 minut z prędkością 2500-4000 x g, żeby wysuszyć membranę w kolumnie.
18. Przenieś kolumnę do probówki elucyjnej 50 ml.
    Dodaj 1-2 ml podgrzanego buforu elucyjnego DE lub ddH2O na sam środek membrany i inkubuj przez 5 minut w temperaturze pokojowej.
19. Wiruj przy 2500 x g przez 2 minuty w temperaturze pokojowej.
    Ostrożnie wysuń kolumnę i zamknij probówkę z wyeluowanym DNA.