



MICELLULA DNA EMULSION & PURIFICATION KIT



KURZANLEITUNG

KIT VERSION 1.0, JULI 2010. SIEHE AUCH DETAILLIERTE FASSUNG DES PROTOKOLLS.

A

HERSTELLUNG DER EMULSION

1

1. Mischung der Ölphase

- Mischen von 300 µl Oil Surfactant Mixture pro Reaction (50 µl wässrige Phase):
 - 220 µl Emulsion Component 1 (73 % [v/v])
 - 20 µl Emulsion Component 2 (7 % [v/v])
 - 60 µl Emulsion Component 3 (20 % [v/v])
- Durch Vortexen gründlich mischen.
- Auf gestossenem Eis bis zur weiteren Verwendung aufbewahren.



2

2. Mischung der Wasserphase

- 50 µl wässrige Phase pro Reaktion mischen (z.B. ePCR)
Template DNA und Enzym, aber kein BSA werden je nach Reaktionsprotokoll gemischt.
- Ein Aliquot für eine "offene" (nicht emulsierte) Kontrollreaktion entnehmen (optional).
- BSA wird zugefügt. Benötigte Menge: _____.

3

3. Herstellung der Emulsions-Reaktion

- 300 µl Oil Surfactant Mixture (vorgekühlt, 4°C) und 50 µl wässrige Phase mischen.
- Vortexen für 5 Minuten bei 4°C (Vortexer mit Gefäßhalterung benutzen).
- Emulsion auf drei dünnwandige Reaktionsgefäße verteilen ("Triplikate"),
Reaktion nach Protokoll durchführen.

B

BINDESCHRITT - DNA REINIGUNG

4

4. Aufbrechen der Emulsion und DNA-Bindung an die Säulenmatrix

- 40 µl Activation Buffer DX auf die Membran der Säule pipettieren, nicht zentrifugieren.
- Optional: Elutionspuffer auf 80°C erhitzen (siehe Abschnitt D, Elution).
- Alle Triplikate einer Reaktion in einem 2 ml Plastik-Reaktionsgefäß zusammenführen.
- 1 ml 2-Butanol (oder Butanol) zugeben, Emulsion durch Vortexen öffnen.
- 400 µl Puffer Orange-DX je max. 250 µl wässrige Phase / max. 25 µg DNA zufügen.
- Probe und Puffer vollständig mischen.
- Zentrifugation für 1 min bei 11 000 x g (etwa 12 000 rpm).
- Obere, orange gefärbte organische Phase fast vollständig entnehmen und verwerfen.
- Wässrige Phase, Interphase und evtl. geringe verbliebene Reste der organischen Phase auf eine Zentrifugationssäule überführen.
- Zentrifugation für 1 min bei 11 000 x g (etwa 12 000 rpm)



C

WASCHSCHRITT - DNA REINIGUNG

5

5. DNA - Waschung

- Durchfluss abschütten und Säule auf das Sammelgefäß stecken.
- 500 µl Puffer Wash-DX1 auf die Säule geben.
- Säule für 1 min bei 11 000 x g (etwa 12 000 rpm) zentrifugieren.



6

6. DNA - Waschung

- Durchfluss abschütten und Säule auf das Sammelgefäß stecken.
- 650 µl Puffer Wash-DX2 auf die Säule geben.
- Säule für 1 min bei 11 000 x g (etwa 12 000 rpm) zentrifugieren.

7

7. Entfernen von Resten des Waschpuffers

- Durchfluss abschütten und Säule auf das Sammelgefäß stecken.
- Säule für 2 min bei 11 000 x g (etwa 12 000 rpm) trocken zentrifugieren.

D

ELUTIONSSCHRITT - DNA REINIGUNG

8

8. DNA Elution

- Zentrifugationssäule unverschlossen auf ein neues Sammelgefäß (1.5-2 ml) stecken
- 50-150 µl Elutionspuffer (ggf. 80°C) oder Wasser auf die Mitte der Säulenmembran tropfen.
- Säule 2 min bei Raumtemperatur inkubieren.
- Säule bei 11 000 x g (etwa 12 000 rpm) für 1 Minute zentrifugieren.
- Säule vom Sammelgefäß entfernen und verwerfen. Sammelgefäß verschließen.
- Gereinigte DNA kann sofort verwendet werden.
- DNA bei -20°C langfristig bzw. bei +4°C kurzfristig lagern.



DIESE ANLEITUNG STEHT ONLINE BEREIT

WWW.ROBOKLON.DE