

Protocol extracție ADN din Spută

1. Se adaugă 250 µl de spută în ZR BashingBead™ Lysis Tubes (0.1 & 0.5 mm).
2. Se adaugă 750 µl de ZymoBIOMICS™ Lysis Solution în ZR BashingBead™ Lysis Tube (0.1 & 0.5 mm).
3. Se adaugă 20 µl de Proteinase K în ZR BashingBead™ Lysis Tubes (0.1 & 0.5 mm) și se incubează la 55°C timp de 30 de minute.
4. Se plasează tubul cu proba orizontal pe un shaker (Genie 2 50 Hz Vortex) și se mixează timp de 40 de minute la 2700 de rotații/min.
5. Se centrifughează ZR BashingBead™ Lysis Tube (0.1 & 0.5 mm) într-o microcentrifugă la 10000 x g timp de 1 minut.
6. Se transferă 400 µl de supernatant în Zymo-Spin™ III-F Filter introdus în tubul de colectare și se centrifughează la 8000 x g timp de 1 minut. Se aruncă Zymo-Spin™ III-F Filter.
7. Se adaugă 1200 µl de ZymoBIOMICS™ DNA Binding Buffer în tubul de colectare și se amestecă bine cu pipeta.
8. Se transferă 800 µl de amestec în Zymo-Spin™ IICR Column introdusă în tubul de colectare și se centrifughează la 10000 x g timp de 1 minut.
9. Se aruncă conținutul tubului de colectare și se repetă pasul 8.
10. Se adaugă 400 µl de ZymoBIOMICS™ DNA Wash Buffer 1 în Zymo-Spin™ IICR Column introdusă în tubul nou de colectare și se centrifughează la 10000 x g timp de 1 minut. Se aruncă conținutul tubului de colectare.
11. Se adaugă 700 µl de ZymoBIOMICS™ DNA Wash Buffer 2 în Zymo-Spin™ IICR Column introdusă în tubul de colectare și se centrifughează la 10000 x g timp de 1 minut. Se aruncă conținutul tubului de colectare.
12. Se adaugă 200 µl de ZymoBIOMICS™ DNA Wash Buffer 2 în ZymoSpin™ IICR Column introdusă în tubul de colectare și se centrifughează la 10000 x g timp de 1 minut.
13. Se transferă Zymo-Spin™ IICR Column într-un tub de 1.5 ml și se adaugă 75 µl de ZymoBIOMICS™ DNase/RNase Free Water în mijlocul coloniței. Se incubează timp de 1 minut, apoi se centrifughează la 10000 x g timp de 1 minut, obținându-se ADNul eluat.
14. Se adaugă 600 µl de ZymoBIOMICS™ HRC Prep Solution în Zymo-Spin™ III-HRC Filter introdus în tubul de colectare. Se centrifughează la 8000 x g timp de 3 minute.
15. Se transferă ADNul eluat la pasul 14 în Zymo-Spin™ III-HRC Filter introdus într-un tub de 1.5 ml și se centrifughează la 16000 x g timp de 3 minute.
16. ADNul obținut se cuantifică și se utilizează în următoarele etape.