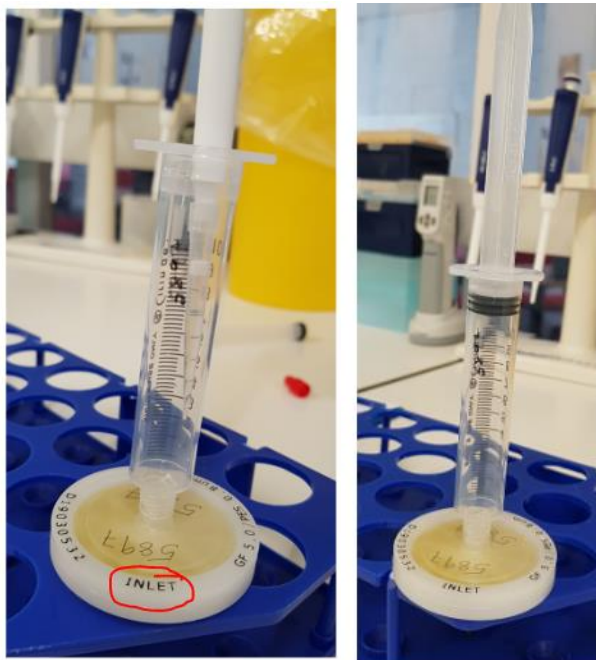


Isolering av DNA fra vannfilter til miljø-DNA-analyser

DNA-ekstraksjon

Dag 1 (følger NatureMetrics-protokoll):

- Lag opp x antall prøver * 130 μ L 10 % Proteinase K (2 mg/ml).
- Proteinase K-løsningen tilsettes på følgende måte:
 1. Dra ut sprøytetempolet og sett sprøyten inn i filter på siden merket "INLET".



2. Bruk 1200 μ L-pipette og tilsett **130 μ L** nederst ved sprøyteåpningen. NB! Ikke putt pipettespissen ned i åpningen slik at det kommer i kontakt med innholdet i filteret.
 3. Putt på plass sprøytetempolet mens sprøyta står i filteret og trykk ned slik at Proteinase K-løsningen tilføres filteret. Trykk forsiktig, men kontrollert.
 4. Fjern sprøyten og legg tilbake i merket etui. Prøv å unngå at det skummer opp når sprøyta fjernes.
 5. Sett på den røde korken, og vri begge korkene (på OUTLET og INLET) godt igjen.
- Filtrene inkuberes over natt ved 56 grader.

Tips og triks:

- Se at det ligger nok 96 % etanol i fryseren dagen før ekstraksjon (1 ml x prøver).
- Merk alle rør som behøves under isolering. **For hver prøve behøves:**
 - 2 stk 15 ml-rør (Catch tubes)
 - NucleoSpin Plant II Midi Column
 - 1.5 mL eppendorf lowbind-rør.

Dag 2:

Husk: merk rør om det ikke ble gjort dagen før og legg AE-buffer i varmeskap.

- Bruk 15.0 ml-rør (catch tube) og fjern begge røde korker på filtret før du plasserer det over røret med "INLET" ned. Ved hjelp av en kobling, vil gårtdagens sprøyte passe i filterets utgang. Press luft inn i filteret ved hjelp av sprøyten slik at lysatet presses ut. Gjenta minst to ganger for å få med alt.
- Tilsett **1000 µL AL-buffer** (Qiagen) og **1000 µL iskald 96% EtOH**. Vortex eller benytt en pasteurpipette og bland **godt** før du går videre.
- Overfør løsningen til NucleoSpin Plant II Midi Column. **Husk: alt må over i kolonna pga. kvantifisering!** Sentrifugeres i 2 min på maks hastighet.
- Vask med **1000 µL AW1-buffer** (Qiagen). Sentrifugeres på maks i **2 min**. Tøm rør før neste steg.
- Vask med **3000 µL AW2-buffer** (Qiagen). Sentrifugeres på maks i **10 min**.
- Overfør kolonnen til collection tube. Se at det ikke sitter igjen buffer i åpningen under kolonnen før du overfører.
- Tilsett **200 µL forvarmet AE-buffer** (Qiagen). Inkuber i **minst 10 min** ved romtemperatur. Sentrifugeres på **maks i 2 min**. OBS! Elueringsvolum kan variere, så sjekk alltid med prosjektet.
- Ta eluatet og **overfør tilbake til kolonnen for å re-eluere**. Inkuber i **minst 10 min** i romtemperatur. Sentrifugeres på maks hastighet i **2 min**.
- Overfør eluatet til 1.5 ml lowbind eppendorfrør