

Tipy a triky pro používání kitů Agencourt®

Skladování

Kity Agencourt uchovávejte v lednici při teplotě +4 až +8°C. Vyhněte se dlouhému stání zásobní suspenze při pokojové teplotě. Pokud budete kit používat po malých dávkách několik měsíců, doporučuje se na počátku rozdělit suspenzi z lahvičky do několika menších alikvotů a ty pak spotřebovávat postupně. Před každým použitím kitu, suspenzi důkladně promíchejte, aby nezůstaly u dna lahvičky sedimenty, a suspenze tak byla zcela homogenní. Nedoporučuje se drastické vortexování, aby se kuličky v suspenzi vzájemně nepoškodily.

Etanol

Etanol musí být nejméně 70% v/v. Při použití menší koncentrace etanolu dochází k uvolňování navázaných nukleových kyselin (NK) z povrchu kuliček. Při přípravě se doporučuje odměřit objem 100% etanolu a vody odděleně. Doplnění objemu etanolu vodou, vede k výsledné nižší koncentraci etanolu. Protože je jakýkoli etanol vyšší koncentrace vysoce hydrofobický, doporučuje se připravovat např. 80% v/v etanol místo 70% v/v. Zásobní roztok etanolu by se měl používat max. týden. Vyhněte se tak nechtěnému vymývání navázaných NK z povrchu kuliček způsobeného zvyšující se koncentrací vody.

Inkubace

Při smíchání výchozího vzorku NK se suspenzí kuliček je důležité celou směs důkladně promíchat pomocí nejlépe pipety opakovaným nasáváním a vypouštěním. Na pipetě se doporučuje nastavit menší objem, než jaký má promíchávaná kapalina. Vortexování směsi v mikrotitračních destičkách bývá neúčinné kvůli viskozitě a malému objemu vzorku.

Pro zvýšení výtěžku NK se doporučuje prodloužit inkubační doby vstupního vzorku se suspenzí kuliček na 5 až 10 min s případným promícháním této směsi během inkubace. Prodloužené inkubační doby při separaci kuliček se doporučují při používání magnetů jiných výrobců.

Eluce

Malé eluční objemy vedou při purifikaci NK k poklesu výtěžku. Minimální eluční objem u 96 jm destiček je 40 μ l u 384 jm formátu 15 μ l. Důležité je opět celou směs důkladně promíchat pomocí pipety opakovaným nasáváním a vypouštěním. Eluční roztok nechte působit nejméně 2 minuty.

Vazba dlouhých fragmentů

Fragmenty NK dlouhé několik kb se mohou na kuličky vázat velmi pevně a obtížně eluovat, pokud se po odstranění etanolu v promývacím kroku nechají kuličky vyschnout. Pro vymytí dlouhých fragmentů se doporučuje po promývání důkladně odstranit zbytky etanolu a okamžitě přidat eluční pufr nebo vodu. Etanol se bude během inkubace z elučního roztoku při delším stání dále odpařovat.

Zjištění výtěžku

Výchozí nepřečištěný vzorek PCR produktů obsahuje primery a volné nukleotidy, které přispívají k vyšší absorpenci při 280 nm. Koncentrace NK se poté jeví vyšší, než ve skutečnosti je. Spektroskopické porovnání vstupního vzorku s eluovaným proto vykazuje nižší výtěžky. Doporučená metoda pro zjištění výtěžku NK je PicoGreen assay nebo srovnání intenzity proužků vstupního vzorku s eluovaným na agarosovém gelu.

Problémy s výtěžkem

Dodržujete výše uvedená doporučení. Ujistěte se, že při odsávání supernatantu zároveň neodebíráte kuličky. Porovnejte koncentrace NK vstupního vzorku, supernatantu ze vzorku, supernatantů etanolového promývání a koncového eluátu. Určíte tak, v kterém kroku dochází k největším ztrátám.