

Vedlegg 1: Prosedyre for DNA isolering

Prosedyren beskriver tillaging av isolert DNA med utgangspunkt i prøvene som ble tatt gjennom vekstforsøket. Eksakt beskrivelse av ulikhetene mellom prepareringen av notprøver, swab-prøver og biofilterprøver blir beskrevet i del 3.2.1. Prosedyren ble utarbeidet av Ann-Kristin Tveten ved instituttet for biologiske fag ved NTNU i Ålesund.

1. Prøvemateriale

- a. For biofilter — tilsett 180 µl buffer ATL til eppendorfrør og fjern 5mmx20mm bit av biofilter og tilsett til buffer. Rist på Tissuelyser 25mz/s i 4 minutt.
 - b. For swab i RNAlater - rist på Tissuelyser 25mz/s i 2 minutter. Sentrifuger 5 min på 13000 rpm - fjern swab og supernatant. Tilsett 180 µl buffer ATL til eppendorfrør.
2. 20 µl proteinase K i eppendorfrør
 3. Inkubering i VWR Digital Heatblock ved ca 56 °C. Inkubering i ca. 60 minutter. Hvert 15. minutt bland rørene for å sjekke lyseringen.
 4. Tilsett 200 µl Buffer AL, og bland ved hjelp av vortex. Inkuber 10 minutt.
 5. Etter inkubering tilsatt 200 µl etanol, og bland på vortex.
 6. Pipetter hele blandingen over i DNeasy mini spin column.
 7. Sentrifuger ved 8000 rpm i 1 minutt.
 8. Plasserte DNeasy mini spin column i nytt samlerør, og tilsett så 500 µl AW1
 9. Sentrifuger på 8000 rpm i 1 minutt.
 10. Plasserte vi DNeasy mini spin column i nye samlerør, tilsett 500 µl AW2
 11. Sentrifuger på 13000 rpm i 3 minutter.
 12. plasserte DNeasy mini spin column i eppendorfrør
 13. Tilsett 120 µL Buffer AE direkte på DNeasy membranen.
 14. Inkuber i romtemperatur i 1 minutt, og sentrifuger på 8000 rpm i 1 minutt.
 15. Tilsett 50 µL Buffer AE direkte på DNeasy membranen.
 16. Inkuber i romtemperatur i 1 minutt, og sentrifuger på 8000 rpm i 1 minutt.