

Instrukcja

Genomic Mini AX Bacteria

Zestaw o zwiększonej wydajności do izolacji genomowego DNA z bakterii.
Procedura z precypitacją DNA.

numer katalogowy	wielkość
060-60	60 izolacji

Produkt przeznaczony wyłącznie do badań naukowych.

Gwarancja

Firma A&A Biotechnology udziela gwarancji na niniejszy produkt.

Firma nie gwarantuje poprawnego działania produktu w przypadku:

- odstępstwa od dostarczonego wraz z produktem protokołu
- braku zalecanego w niniejszym protokole wyposażenia i materiałów
- użycia innych odczynników niż zalecane lub które nie wchodzą w skład produktu
- użycia przeterminowanych odczynników oraz elementów produktu

Spis treści

Skład	3
Dodatkowy sprzęt i odczynniki	3
Niezbędne	3
Opcjonalne	3
Ważne informacje	4
Protokół	4
Informacje dodatkowe	6
Informacje bezpieczeństwa	7

Skład

składnik	60 izolacji	przechowywanie
Kolumny Genomic Mini AX	60 szt.	2–8 °C
Probówki 2 ml	60 szt.	15–25 °C
BS bufor do zawieszania	7 ml	2–8 °C
LS zawiesina lizująca	60 ml	15–25 °C
K1 roztwór równoważący	55 ml	15–25 °C
K2 roztwór płuczący	190 ml	15–25 °C
K3 roztwór elucyjny	70 ml	15–25 °C
PM mieszanina precypitacyjna	55 ml	15–25 °C
Bufor Tris (10 mM Tris-HCl, pH 8,5)	10 ml	15–25 °C
Lizozym	650 µl	-20 °C
Proteinaza K	1,3 ml	4–8 °C

Pojemność minikolumny do oczyszczania DNA wynosi 20 µg.

Dodatkowy sprzęt i odczynniki

Niezbędne

- Probówki 1,5 ml, 2 ml typu Eppendorf
- 70% etanol
- Inkubator lub termoblok 37 °C, 50 °C (zalecany Thermomixer firmy Eppendorf)
- Worteks
- Mikrowirówka

Opcjonalne

- Lizostafyna - 15 U/µl (nr kat. 1007-3, 1007-15) / Mutanolizyna - 10 U/µl (nr kat. 1017-5, 1017-10)
- RNAza (nr kat. 1006-10, 1006-50)
- Woda jałowa (nr kat. 003-075, 003-25)
- Bufor TE (nr kat. 297-100)

Ważne informacje

- Proces oczyszczania DNA na kolumnie można przerwać w dowolnym momencie i kontynuować nawet po upływie 15 godzin bez wpływu na jakość i ilość uzyskanego DNA. Podczas takiej przerwy należy pamiętać o zamknięciu probówki, w której znajduje się kolumna.

Protokół

- Zwirować **0,2-1 ml** nocnej hodowli bakteryjnej. Usunąć supernatant. Osad bakteryjny zawiesić w **100 µl** buforu **BS** do zawieszania bakterii.
- Dodać po **10 µl lizozymu**.

Dla *S.aureus* zalecamy traktowanie lizostafyną (nie ma w zestawie);
Dla *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Listeria* zalecamy traktowanie mutanolizyną rekombinowaną (nie ma w zestawie).

Całość wymieszać i inkubować przez **15 min** w temp. **37 °C**.
- Uwaga:** Zawiesinę lizującą LS należy wymieszać przed użyciem przez kilkakrotne odwracanie butelki.

Dodać po **900 µl** zawiesiny lizującej **LS** i **20 µl** **proteiny K**.
- Próbkę zworteksować i inkubować przez **30 min** w temp. **50 °C**. Podczas inkubacji próbki kilkakrotnie mieszać przez odwracanie probówki.

Inkubację można przeprowadzić w urządzeniu Thermomixer firmy Eppendorf lub jego odpowiedniku przy parametrach ciągłego mieszania 1400 RPM.

Opcjonalne usuwanie RNA: do próbki należy dodać po 5 µl RNAzy (10 mg/ml) (nie ma w zestawie). Całość wymieszać i pozostawić próbkę na 5 min w temp. pokojowej.
- W trakcie inkubacji przygotować kolumny Genomic Mini AX będące w probówkach 15 ml. Nanieść na kolumnę po **800 µl** roztworu równoważącego **K1**. Poczekać, aż roztwór wypłynie z kolumny.
- Po inkubacji próbkę intensywnie worteksować przez **15 s**.
Wirować przez **5 min** przy **10 000-14 000 RPM**.

Na dnie probówki powinien znajdować się zwarty osad stanowiący mieszaninę niezlizowanego materiału oraz drobinek pochodzących z zawiesiny lizującej.
- Pobrać supernatant i w całości nanieść na zrównoważoną kolumnę Genomic Mini AX. Poczekać, aż lizat wypłynie z kolumny.

Kolumna pracuje grawitacyjnie. Szybkość przepływu zależy od ilości oraz wielkości cząstek DNA. Duża ilość DNA powoduje spowolnienie przepływu, a przy znacznym przeładunku kolumny może dojść nawet do całkowitego jej zablokowania. W takim przypadku należy wirować kolumny wraz z probówkami w rotorze uchylnym przez 1 min przy 3000-4000 RPM. Wirowanie można przeprowadzić zarówno po naniesieniu próbek (pkt 7) jak i podczas płukania roztworem płuczącym K2 (pkt 8 i 9) i przy elucji roztworem elucyjnym K3 (pkt 10).

8. Nanieść po **1,5 ml** roztworu płuczącego **K2** na kolumnę Genomic Mini AX. Poczekać, aż roztwór wypłynie z kolumny.
9. Ponownie nanieść po **1,5 ml** roztworu płuczącego **K2** na kolumnę Genomic Mini AX. Poczekać, aż roztwór wypłynie z kolumny.
10. Nanieść po **100 µl** roztworu elucyjnego **K3** bezpośrednio na membranę kolumny Genomic Mini AX. Poczekać, aż eluat wypłynie z kolumny.
Uwaga: Krok ten ma na celu zmniejszenie całkowitej objętości eluatu, gdyż martwa objętość kolumny wynosi 100 µl.
11. Przenieść kolumnę Genomic Mini AX do probówki precypitacyjnej **2 ml** (w zestawie).
Uwaga: Kolumna posiada odpowiednie żeberka pozwalające na łatwe umieszczenie jej w probówce.
12. Nanieść po **1 ml** roztworu elucyjnego **K3** na kolumnę Genomic Mini AX. Poczekać, aż eluat wypłynie z kolumny. Usunąć kolumnę Genomic Mini AX.
13. **Uwaga:** Mieszanina precypitacyjna PM zawiera dodatkowo wzmacniacz precypitacji, dlatego przed użyciem należy ją wymieszać przez kilkakrotne odwracanie butelki.

Do eluatów dodać po **800 µl** mieszaniny precypitacyjnej **PM**.
14. Wymieszać i wirować przez **10 min** przy **10 000 RPM**.

Na dnie powinien być widoczny jasnoniebieski osad DNA.
15. Ostrożnie zlać supernatant, tak aby nie usunąć niebieskiego osadu DNA.

Uwaga: W trakcie zlewania supernatantu łatwo wylać osad DNA. Dla bezpieczeństwa zaleca się wylewać supernatant do przygotowanej probówki, tak aby można było go odzyskać.
16. Dodać po **500 µl 70% etanolu** (nie ma w zestawie).
Całość wymieszać i wirować przez **3 min** przy **10 000 RPM**.

Na dnie powinien być widoczny jasnoniebieski osad DNA.
17. Ostrożnie zlać supernatant, tak aby nie usunąć niebieskiego osadu DNA.

Uwaga: W trakcie zlewania supernatantu łatwo wylać osad DNA. Dla bezpieczeństwa zaleca się wylewać supernatant do przygotowanej probówki, tak aby można było go odzyskać..
18. Odwrócić probówkę z osadem DNA i suszyć odwróconą do góry dnem przez **5 min** w **temp. pokojowej**.

Uwaga: Jeżeli na ściankach probówki wciąż znajdują się resztki alkoholu, należy je osuszyć przy pomocy patyczków higienicznych.

19. Zawiesić osad DNA w odpowiedniej ilości buforu **Tris** (w zestawie), buforu **TE** lub **wody jałowej wolnej od nukleaz** (nie ma w zestawie).

Niebieska barwa osadu umożliwia śledzenie procesu rozpuszczania DNA.

20. Oczyszczone DNA przechowywać w temp. -20 °C do czasu dalszych analiz.

Informacje dodatkowe

Przerwa w procesie izolacji. Proces oczyszczania DNA na kolumnie można przerwać w dowolnym momencie i kontynuować nawet po upływie 15 godzin bez wpływu na jakość i ilość uzyskanego DNA. Podczas takiej przerwy należy pamiętać o zamknięciu probówki, w której znajduje się kolumna.

Objętość płynu w probówce pozwala na łatwe zorientowanie się na jakim etapie zostało przerwane oczyszczanie:

- ~ 0,5 ml - po zrównoważeniu kolumny;
- ~ 1,5 ml - po przejściu lizatu;
- ~ 3 ml - po pierwszym płukaniu roztworem płuczącym K2;
- ~ 4,5 ml - po drugim płukaniu roztworem płuczącym K2.

Grawitacyjna praca kolumny. Kolumna pracuje grawitacyjnie. Szybkość przepływu zależy od ilości oraz wielkości cząstek DNA. Duża ilość DNA powoduje spowolnienie przepływu, a przy znacznym przeładowaniu kolumny (>20 µg DNA) może dojść nawet do całkowitego jej zablokowania. W takim przypadku należy wirować kolumny wraz z probówkami w rotorze uchylnym przez 1 min przy 3000-4000 RPM. Wirowanie można przeprowadzić zarówno po naniesieniu próbek, jak i podczas płukania roztworem płuczającym K2, a także przy elucji roztworem elucyjnym K3. Przy elucji należy przenieść kolumnę do nowej probówki 15 ml (nie ma w zestawie). Nanieść na kolumnę po 1 ml roztworu elucyjnego K3. Począć 2 min i wirować przez 1 min przy 3000 RPM. Przenieść eluat do probówek precypitacyjnych 2 ml (w zestawie). Następnie przejść do punktu 13. protokołu.

Informacje bezpieczeństwa



NIEBEZPIECZEŃSTWO

Proteinaza K

H315 Działa drażniąco na skórę.
 H319 Działa drażniąco na oczy.
 H334 Może powodować objawy alergii lub astmy lub trudności w oddychaniu w następstwie wdychania.
 H335 Może powodować podrażnienie dróg oddechowych.
 P261 Unikać wdychania pyłu.
 P305+P351+P338 W przypadku dostania się do oczu: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.
 P342+P311 W przypadku wystąpienia objawów ze strony układu oddechowego skontaktować się z Ośrodkiem Zatruc lub lekarzem.



UWAGA

LS zawiesina lizująca

H302 Działa szkodliwie po połknięciu.
 H315 Działa drażniąco na skórę.
 H319 Działa drażniąco na oczy.
 P305+P351+P338 W przypadku dostania się do oczu: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.



UWAGA

K1 roztwór równoważący

H302 Działa szkodliwie po połknięciu.
 H315 Działa drażniąco na skórę.
 H319 Działa drażniąco na oczy.
 P305+P351+P338 W przypadku dostania się do oczu: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.



NIEBEZPIECZEŃSTWO

K2 roztwór płuczący

H225 Wysoce łatwopalna ciecz i pary.
 H319 Działa drażniąco na oczy.
 H336 Może wywoływać uczucie senności lub zawroty głowy.
 P210 Przechowywać z dala od źródeł ciepła, gorących powierzchni, iskrzenia, otwartego ognia i innych źródeł zapłonu. Palenia wzbronione.
 P261 Unikać wdychania par.
 P305+P351+P338 W przypadku dostania się do oczu: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.



NIEBEZPIECZEŃSTWO

K3 roztwór elucyjny

H225 Wysoce łatwopalna ciecz i pary.
 H319 Działa drażniąco na oczy.
 H336 Może wywoływać uczucie senności lub zawroty głowy.
 P210 Przechowywać z dala od źródeł ciepła, gorących powierzchni, iskrzenia, otwartego ognia i innych źródeł zapłonu. Palenia wzbronione.
 P261 Unikać wdychania par.
 P305+P351+P338 W przypadku dostania się do oczu: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.



NIEBEZPIECZEŃSTWO

PM mieszanina precypitacyjna

H225 Wysoce łatwopalna ciecz i pary.
 H319 Działa drażniąco na oczy.
 H336 Może wywoływać uczucie senności lub zawroty głowy.
 P210 Przechowywać z dala od źródeł ciepła, gorących powierzchni, iskrzenia, otwartego ognia i innych źródeł zapłonu. Palenia wzbronione.
 P261 Unikać wdychania par.
 P305+P351+P338 W przypadku dostania się do oczu: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.



A&A BIOTECHNOLOGY
innovating life science

A&A Biotechnology, ul. Strzelca 40, 80-299 Gdańsk
tel. 883 323 761, 600 776 268
info@aabiotech.com, www.aabiotech.com

