A&A BIOTECHNOLOGY
innovating life science

Instrukcja

Genomic Mini AX Plant Spin

Zestaw o zwiększonej wydajności do izolacji genomowego DNA z materiału roślinnego.

numer katalogowy	wielkość
050-100S	100 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 izolacji **4**

Zobojętnianie próbek DNA 6

Test funkcjonalności buforu E 6

Informacje Bezpieczeństwa **7**

Skład

składnik	100 izolacji	przechowywanie
Kolumny Mini AX Spin	100 szt.	2–8 °C
Probówki 2 ml	200 szt.	15–25 °C
LS zawiesina lizująca	100 ml	15–25 °C
W1 pierwszy roztwór płuczący	70 ml	15–25 °C
W2 drugi roztwór płuczący	60 ml	15–25 °C
E bufor elucyjny (nie zawiera EDTA)	20 ml	2–8 °C
N bufor zobojętniający	1 ml	15–25 °C
T roztwór	400 µl	2–8 °C
Proteinaza K	2 x 1,1 ml	4–8 °C

Pojemność kolumny do oczyszczania DNA wynosi 15 µg.

Dodatkowy sprzęt i odczynniki

Niezbędne

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

Opcjonalne

- RNAza (nr kat. 1006-10, 1006-50)

Ważne informacje

- Po użyciu buforu elucyjnego E należy zawsze szczelnie zakręcać pojemnik. Składniki buforu elucyjnego E ulegają rozkładowi przy długotrwałym kontakcie z powietrzem. Bufor elucyjny E należy zawsze przechowywać w temp. 2-8 °C.

Protokół izolacji

1. Przenieść maksymalnie **20 mg** suchej sproszkowanej masy roślinnej lub **100 mg** świeżej / mrożonej rozdrobnionej masy roślinnej do probówki **1,5 ml** typu Eppendorf (nie ma w zestawie).

2. Uwaga: Zawiesinę lizującą LS należy wymieszać przed użyciem przez kilkakrotne odwracanie butelki.

   Dodać po **900 µl** zawiesiny lizującej **LS** i **20 µl proteinazy K**.

3. Próbkę zworteksować i inkubować przez **10 min** w temp. **50 °C**. Podczas inkubacji próbkę należy kilkakrotnie worteksować.

   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.

4. Po inkubacji próbkę intensywnie worteksować przez **2 min** przy **1000-1400 RPM**.

   Ten krok jest kluczowy dla wydajności izolacji DNA.

5. Próbkę wirować przez **5 min** przy **14 000 x g.**

   Na dnie probówki powinien znajdować się zwarty osad stanowiący mieszaninę niezlizowanego materiału oraz drobinek pochodzących z zawiesiny lizującej.

6. Nanieść po **600 µl** supernatantu na kolumnę Mini AX Spin znajdującą się w 2 ml probówce.

7. Wirować przez **30-60 s** przy **8 000 x g**.

8. Wyjąć kolumnę Mini AX Spin z probówki i umieścić ją w **nowej** probówce **2 ml** (w zestawie).

9. Nanieść po **600 µl** pierwszego roztworu płuczącego **W1.**
   Wirować przez **30-60 s** przy **8 000 x g**.

10. Wyjąć kolumnę Mini AX Spin z probówki i umieścić ją w **nowej** probówce **2 ml** (w zestawie).

11. Nanieść po **500 µl** drugiego roztworu płuczącego **W2.**
Wirować przez **30-60 s** przy **14 000-21 000 x g**.

12. Przygotować probówki elucyjne (nie ma w zestawie). Mogą to być jałowe probówki 1,5 ml typu Eppendorf.
Dodać na dno probówki elucyjnej po **5 µl** buforu zobojętniającego **N**.

Zobojętnianie próbek DNA - str. 6.

13. Przenieść kolumnę Mini AX Spin do przygotowanej probówki elucyjnej.

14. Przed użyciem buforu elucyjnego E zalecamy przeprowadzenie testu funkcjonalności - str. 6.

Nanieść po **100-150 µl** buforu elucyjnego **E** na kolumnę Mini AX Spin.
Zostawić na **2 min** w **temp. pokojowej**.

Po użyciu buforu elucyjnego E należy zawsze szczelnie zakręcać pojemnik. Składniki buforu elucyjnego E ulegają rozkładowi przy długotrwałym kontakcie z powietrzem. Bufor elucyjny E należy zawsze przechowywać w temp. od 2-8 °C.

15. Wirować przez **30-60 s** przy **14 000-21 000 x g**.

16. Usunąć kolumnę Mini AX Spin i zamknąć probówkę elucyjną zawierającą DNA.

Zobojętnianie próbek DNA

Bufor elucyjny E jest silnie alkaliczny i po zamrożeniu może powodować degradację DNA. Z tego powodu konieczne jest stosowanie buforu zobojętniającego N. Z naszej praktyki laboratoryjnej wynika, że najwygodniej jest dodać bufor zobojętniający N przed elucją DNA, do pustej probówki elucyjnej.
W trakcie elucji, zawieszone w buforze elucyjnym DNA wymiesza się z buforem zobojętniającym N i ulegnie natychmiastowej neutralizacji. Będzie zawieszone w roztworze 10 mM Tris pH 8,5.
Jeżeli bufor zobojętniający N nie został dodany przed elucją DNA, to można dodać go po zakończonej izolacji - przed zamrożeniem próbek DNA.

Test funkcjonalności buforu E

Bufor elucyjny E ma kluczowy wpływ na wydajność elucji DNA. Jego prawidłowe działanie można sprawdzić za pomocą roztworu T wchodzącego w skład zestawu.

Kiedy przeprowadzić test funkcjonalności:
- Bufor E nie był używany przez min. 2 miesiące.
- Bufor E był przechowywany w temp. pokojowej przez min. 2 tygodnie.
- Fiolka zawierająca bufor E nie została szczelnie zamknięta po użyciu.

Test funkcjonalności:
Przenieść 20 µl buforu E do probówki PCR; dodać po 2 µl roztworu T; całość wymieszać, poczekać 2 min.
Porównać kolor mieszaniny ze zdjęciem przedstawiającym kolory referencyjne.

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 Zatruć 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.

NIEBEZPIECZEŃSTWO

W1 pierwszy 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

E bufor elucyjny

H314 Powoduje poważne oparzenia skóry oraz uszkodzenia oczu.
P280 Stosować rękawice ochronne/ odzież ochronną/ ochronę oczu/ ochronę twarzy.
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.
P310 Natychmiast skontaktować się z Ośrodkiem Zatruć lub lekarzem.

A&A BIOTECHNOLOGY
innovating life science

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

wersja 2023-1