

Instrukcja

Genomic Micro AX Tissue Gravity

Zestaw do izolacji genomowego DNA z tkanek i hodowli komórkowych metodą grawitacyjną.

numer katalogowy	wielkość
104-100	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 wchodzi 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
Problem z prędkością przepływu lizatu	6
Zobojętnianie próbek DNA	6
Test funkcjonalności buforu E	6
Technologia Gravity flow	7
Informacje Bezpieczeństwa	7

Skład

składnik	100 izolacji	przechowywanie
Kolumny Micro AXD	100 szt.	2–8 °C
Probówki odbieralnikowe	100 szt.	15–25 °C
LSU bufor lizujący	50 ml	15–25 °C
K1G roztwór równoważący	60 ml	15–25 °C
W1G 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 minikolumny do oczyszczania DNA wynosi 20 µg.

Dodatkowy sprzęt i odczynniki

Niezbędne

- Jałowe probówki 1,5 ml typu Eppendorf
- Inkubator lub termoblok 50 °C (zalecany Thermomixer firmy Eppendorf)
- Wortex, wirówka

Opcjonalne

- DTT (nr kat. 2010-5, 2010-25, 2010-10P) (do izolacji z nasienia)
- Woda jałowa (nr kat. 003-075, 003-25)
- RNAza (nr kat. 1006-10, 1006-50)
- Statyw Gravity flow (nr kat. 008-1)

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. Próbkę materiału do izolacji w ilości:
 - **Tkanki stałe:** maksymalnie **10 mg** rozdrobnionej tkanki przenieść do próbówki typu Eppendorf (nie ma w zestawie).
 - **Hodowle komórkowe:** $0,5 \times 10^6$ zwirować i usunąć supernatant.
 - **Nasienie:** do **10 µl** nasienia dodać po **20 µl 1M DTT** (nie ma w zestawie).

2. Dodać po **400 µl** buforu lizującego **LSU** i **20 µl** **proteinyazy K**.

3. Próbkę wymieszać i inkubować w temp. **50 °C**:
komórki - **10 min**;
tkanki stałe - ok. **1-2 godz.** do czasu całkowitego strawienia.

Podczas inkubacji próbkę 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. Podczas inkubacji przygotować kolumny Micro AXD przez dokładne zamocowanie ich do próbek odbieralnikowych i umieszczenie w pozycji pionowej w statywie.



Zdjęcie poglądowe:
umieszczenie kolumn i próbek odbieralnikowych w statywie Gravity flow.

5. Nanieść po **500 µl** roztworu równoważącego **K1G** na kolumnę **Micro AXD**.
Poczekać, aż roztwór przestanie kapać z kapilary.

Dobłą praktyką jest nanoszenie roztworu K1G na ściankę kolumny tak, aby uniknąć przypadkowego zablokowania przepływu kolumny przez bąbelek powietrza uwieczony między złożem a naniesionym roztworem K1G. Kolumna jest gotowa do użytku, gdy roztwór przestanie kapać z kapilary.

6. Po inkubacji próbkę wortexować przez 2 min przy 1000-1500 RPM.

Jest to kluczowy krok dla wydajności DNA.

Wirować przez 5 min przy 10 000-14 000 RPM.

Na dnie powinien znajdować się zwarty osad stanowiący pozostałości niezliwowanego materiału.

7. Pobrać klarowny supernatant i nanieść go na zrównoważoną kolumnę Micro AXD.

Poczekać, aż lizat przejdzie przez kolumnę Micro AXD pod wpływem sił grawitacji.
Zwykle trwa to do **10 min**.

Prędkość przepływu przez kolumnę uzależniona jest od zawartości DNA w próbce. Im więcej DNA, tym wolniejsza prędkość przepływu.

Rozwiązywanie problemów z prędkością przepływu lizatu - str. 6.

Uwaga: dotyczy punktów 7-9 protokołu izolacji

- W przypadku izolacji DNA z mniejszej ilości prób (do 10) należy obserwować czy lizat w całości przeszedł przez kolumnę. Gdy roztwór przestanie kapać z kapilary, należy przejść do kolejnego punktu protokołu izolacji.
- W przypadku izolacji DNA z większej ilości prób (ponad 10) zalecamy odczekanie do 10 min, zamiast obserwacji procesu w poszczególnych kolumnach.

8. Nanieść po 600 µl pierwszego roztworu płuczącego W1G na kolumnę Micro AXD.

Poczekać, aż roztwór przestanie kapać z kapilary.

9. Nanieść po 500 µl drugiego roztworu płuczącego W2 na kolumnę Micro AXD.

Poczekać, aż roztwór przestanie kapać z kapilary.

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

Nanieść po 60 µl buforu elucyjnego E na kolumnę Micro AXD.

Zostawić na 5 min w temp. pokojowej.

Krok ten ma celu zmniejszenie całkowitej objętości eluatu, ponieważ martwa objętość kolumny wynosi około 60 µl.

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.

11. Przygotować próbówki elucyjne - mogą to być 1,5 ml próbówki typu Eppendorf (nie ma w zestawie).

Nanieść na dno probówek po 5 µl buforu zobojętniającego N.

Zobojętnianie próbek DNA - str. 6.

12. Przenieść kolumny Micro AXD do przygotowanych probówek elucyjnych.**13. Przed użyciem buforu elucyjnego E zalecamy przeprowadzenie testu funkcjonalności - str. 6.**

Nanieść po **120 µl** buforu elucyjnego **E** na kolumnę **Micro AXD**.

Począkać **10 min**, aż bufor wypłynie z kolumny **Micro AXD**.

Po 10 min sprawdzić czy bufor przeszedł przez kolumnę Micro AXD. Jeżeli tak się nie stało, oznacza to bardzo dużą ilość DNA w próbce. W takim przypadku zaleca się odwirowanie próbek z kolumną przez 30-60 s przy 5000 RPM.

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.

14. Usunąć kolumnę Micro AXD, zamknąć probówkę elucyjną. Przechowywać DNA do czasu dalszych analiz.

Problem z prędkością przepływu lizatu

problem	przyczyna	rozwiązanie
wolny przepływ próbki przez kolumnę Micro AXD	bardzo duża ilość DNA w próbce	- kolumnę Micro AXD umieścić w probówce typu Eppendorf i odwirować. - przy kolejnej izolacji należy zmniejszyć ilość badanej próbki o połowę.
pęcherzyki powietrza w drenie próbki odbieralnikowej	niedokładne zamocowanie kolumny Micro AXD na probówce odbieralnikowej	- "dokręcenie" kolumny Micro AXD. - pęcherzyki powietrza można usunąć przez uniesienie próbki z kolumną Micro AXD na 1-2 cm i jej opuszczenie.

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 próbki 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.

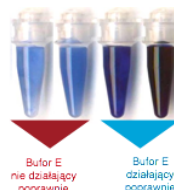
Kiedy przeprowadzić test funkcjonalności:

- 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.

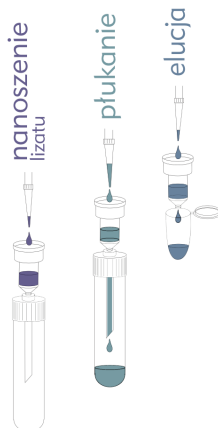
Test funkcjonalności:

Przenieść 20 µl buforu E do próbki PCR; dodać po 2 µl roztworu T; całość wymieszać, poczekać 2 min.

Porównać kolor mieszaniny ze zdjęciem przedstawiającym kolory referencyjne.



Technologia Gravity flow



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

LSU bufor lizujący

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

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 Zatruc 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@aabiotech.com, www.aabiotech.com

