

Instrukcja

Genomic Mini

Zestaw do izolacji genomowego DNA z różnych materiałów.

numer katalogowy	wielkość
116-50	50 izolacji
116-250	250 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
Przygotowanie materiału	4
Hodowle bakteryjne (Gram- i Gram+)	4
Nasienie	4
Hodowle komórkowe	5
Tkanki świeże	5
Tkanki utrwalone	5
Protokół izolacji	6
Informacje Bezpieczeństwa	7

Skład

składnik	50 izolacji	250 izolacji	przechowywanie
Minikolumny	50 szt.	250 szt.	15–25 °C
Probówki 2 ml	50 szt.	250 szt.	15–25 °C
LT roztwór lizujący	13 ml	60 ml	15–25 °C
A1 roztwór płuczący	50 ml	250 ml	15–25 °C
Bufor Tris (10 mM, pH 8,5)	25 ml	125 ml	15–25 °C
Proteinaza K	1,1 ml	5 x 1,1 ml	4–8 °C

Uwaga: jeżeli w roztworze lizującym LT pojawił się precypitat, należy podgrzać roztwór do temp. 40 °C do momentu rozpuszczenia precypitatu i uzyskania klarowności.

Dodatkowy sprzęt i odczynniki

Niezbędne

- Probówki 1,5 ml typu Eppendorf
- Lizostafyna - 15 U/μl (nr kat. 1007-3, 1007-15) / Lizozym -10 mg/ml (nr kat. 1005-10) / Mutanolizyna - 10 U/μl (nr kat. 1017-5, 1017-10) (do izolacji z hodowli bakteryjnych)
- DTT (nr kat. 2010-5, 2010-25, 2010-10P) (do izolacji z nasienia)
- Inkubator lub termoblok 37 °C, 50 °C, 70 °C (zalecany Thermomixer firmy Eppendorf)
- Worteks
- Mikrowirówka

Opcjonalne

- RNAza (nr kat. 1006-10, 1006-50)
- Woda jałowa (nr kat. 003-075, 003-25)

Przygotowanie materiału

Hodowle bakteryjne (Gram- i Gram+)

1. Przenieść **100 µl** hodowli bakteryjnej do probówki 1,5 ml typu Eppendorf (nie ma w zestawie).

Uwaga: W przypadku większej ilości hodowli (200 µl-1 ml), należy ją odwirować, usunąć supernatant, a osad dokładnie zawiesić w 100 µl buforu Tris.

2. Dla bakterii Gram+ ze względu na budowę ściany komórkowej, zalecamy traktowanie odpowiednimi enzymami naruszającymi strukturę.

dla *Staphylococcus aureus* zalecamy użycie lizostafiny (15 U/µl) (nie ma w zestawie):
do hodowli bakteryjnej dodać po **5 µl lizostafiny** i inkubować przez **10 min** w temp. **37 °C**.

dla *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Listeria* zalecamy użycie
mutanolizyny (10 U/µl) (nie ma w zestawie) lub **mutanolizyny i lizozymu** (10 mg/ml) (nie ma w zestawie):
do hodowli bakteryjnej dodać po **5 µl mutanolizyny** lub **5 µl mutanolizyny i 10 µl lizozymu**.
Całość wymieszać i inkubować przez **20 min** w temp. **50 °C**.

Uwaga: Synergizm działania mutanolizyny i lizozymu prowadzi do zwiększonej wydajności lizy komórek bakterii z rodzaju: *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Listeria*.

3. Dodać po **200 µl** roztworu lizującego LT i **20 µl** proteiny K.
4. Całość wymieszać przez odwracanie probówki. Inkubować przez **20 min** w temp. **37 °C**.

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.

5. Przejsć do punktu 1. protokołu izolacji.

Nasienie

1. Przenieść **100 µl** nasienia do probówki 1,5 ml typu Eppendorf (nie ma w zestawie).
2. Dodać po **10 µl 1M DTT** (nie ma w zestawie).
3. Dodać po **200 µl** roztworu lizującego LT i **20 µl** proteiny K.
4. Całość wymieszać przez odwracanie probówki. Inkubować przez **20 min** w temp. **37 °C**.

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.

5. Przejsć do punktu 1. protokołu izolacji.

Hodowle komórkowe

1. Przenieść **1 x 10⁶** hodowli komórkowych do probówki 1,5 ml typu Eppendorf (nie ma w zestawie). Odwirować i usunąć supernatant.
2. Osad zawiesić w **100 µl** buforu **Tris**.
3. Dodać po **200 µl** roztworu lizującego **LT** i **20 µl** **proteiny K**.
4. Całość wymieszać przez odwracanie probówki. Inkubować przez **20 min** w temp. **37 °C**.

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.

5. Przejść do punktu 1. protokołu izolacji.

Tkanki świeże

1. **10-15 mg** rozdrobnionej tkanki (pociętej na fragmenty lub rozartej w ciekłym azocie) umieścić w probówce 1,5 ml typu Eppendorf (nie ma w zestawie).
2. Dodać po **100 µl** buforu **Tris**, **50 µl** roztworu lizującego **LT** i **20 µl** **Proteiny K**.
3. Całość wymieszać przez worteksowanie. Inkubować w temp. **50 °C** do całkowitego strawienia tkanki. Próbkę należy mieszać od czasu do czasu przez worteksowanie.
4. Próbkę intensywnie worteksować przez **20 s**.

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.

5. Dodać po **150 µl** roztworu lizującego **LT** i wymieszać próbkę.
6. Przejść do punktu 1. protokołu izolacji.

Tkanki utrwalone

1. Przenieść tkankę do probówki 1,5 ml typu Eppendorf (nie ma w zestawie).
2. Odpłukać płyn utrwalający przez kilkakrotne dodanie buforu Tris, wirowanie i usuwanie supernatantu. Z tkanek będących w blokach parafinowych należy usunąć parafinę przez płukanie w ksylenie (nie ma w zestawie), a następnie w etanolu (nie ma w zestawie).
3. Dalej postępować jak w przypadku "tkanek świeżych".

Dla tkanek utrwalonych zalecamy używanie zestawu Xpure FFPE micro (nr kat. 091-50) - zestaw do izolacji genomowego DNA z tkanek utrwalonych w parafinie. Szybka deparafinizacja bez ksyleny i heksanu.

Protokół izolacji

Przestawić termoblok na 70 °C i umieścić w nim bufor elucyjny Tris, który będzie wykorzystywany w punkcie 10. protokołu izolacji.

1. Inkubować próbki przez **5 min** w temp. **70 °C**.
2. Próbkę intensywnie worteksować przez **20 s**, następnie wirować przez **3 min** przy **10 000-15 000 RPM**.
3. Supernatant nanieść na minikolumny. Wirować przez **1 min** przy **10 000-15 000 RPM**.
4. Dodać po **500 µl** roztworu płuczącego **A1**.
5. Wirować przez **1 min** przy **10 000-15 000 RPM**.
6. Przenieść minikolumny do **nowych** probówek 2 ml (w zestawie).
7. Dodać po **400 µl** roztworu płuczącego **A1**.
8. Wirować przez **2 min** przy **10 000-15 000 RPM**.
9. Przenieść minikolumny do **nowych** probówek 1,5 ml (nie ma w zestawie).
10. Na złoża na dnie minikolumn nanieść po **200 µl** buforu **Tris** lub wody jałowej wolnej od nukleaz (nie ma w zestawie) uprzednio ogrzanych do temp. 70 °C.

Uwaga: Jeżeli spodziewamy się małej ilości DNA, to możemy zmniejszyć ilości buforów elucyjnych (buforu Tris lub wody jałowej) do 100 µl, w ten sposób zwiększając stężenie DNA.
11. Inkubować przez **2 min** w temp. **pokojoyej**.
12. Wirować przez **1 min** przy **10 000-15 000 RPM**.
13. Usunąć minikolumny, a oczyszczone DNA znajdujące się w probówkach przechowywać w temp. +4 °C lub -20 °C do czasu dalszych analiz.

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

LT roztwór 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

A1 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.



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

