

Instrukcja

Genomic Midi AX Direct

Zestaw o zwiększonej wydajności do izolacji genomowego DNA z różnych materiałów..

numer katalogowy	wielkość
895-20D	20 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
Krew świeża lub mrożona	4
Hodowle bakteryjne (Gram- i Gram+)	4
Hodowle komórkowe	4
Tkanki świeże	5
Protokół izolacji	5
Zobojętnianie próbek DNA	6
Test funkcjonalności buforu E	6
Informacje Bezpieczeństwa	7

Skład

składnik	20 izolacji	przechowywanie
Kolumny Spin 100AX	20 szt.	2–8 °C
Probówki 15 ml	40 szt.	15–25 °C
Kolumna równoważąca	1 szt.	15–25 °C
L1.4 roztwór lizujący	50 ml	15–25 °C
W1G pierwszy roztwór płuczący	70 ml	15–25 °C
W2 drugi roztwór płuczący	40 ml	15–25 °C
E bufor elucyjny (nie zawiera EDTA)	15 ml	2–8 °C
N bufor zobojętniający	1 ml	15–25 °C
T roztwór	400 µl	2–8 °C
TE bufor	50 ml	15–25 °C
Proteinaza K	2 x 1,1 ml	4–8 °C

Pojemność kolumny do oczyszczania DNA wynosi 100 µg.

Dodatkowy sprzęt i odczynniki

Niezbędne

- Probówki 2 ml typu Eppendorf
- Probówki 15 ml typu Falcon
- 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)
- Inkubator lub termoblok 37 °C, 50 °C (zalecany Thermomixer firmy Eppendorf)
- Worteks
- Wirówka z rotorem uchylnym
- Mikrowirówka

Opcjonalne

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

Przygotowanie materiału

Krew świeża lub mrożona

1. Przenieść **2 ml** krwi do probówki 15 ml typu Falcon (nie ma w zestawie).

Uwaga: w przypadku mniejszej ilości krwi niż 2 ml należy dodać buforu TE do całkowitej objętości 2 ml.

2. Dodać po **2 ml** roztworu lizującego **L1.4** i **100 µl** **proteiny K**.
3. Całość wymieszać przez odwracanie probówki. Inkubować przez **20 min** w temp. **50 °C**.

Uwaga: Nie przedłużać inkubacji.

4. Intensywnie worteksować przez **20 s**.
5. Prześć do punktu 1. protokołu izolacji.

Hodowle bakteryjne (Gram- i Gram+)

1. Przenieść **1-5 ml** hodowli bakteryjnej do probówki 15 ml typu Falcon (nie ma w zestawie). Odwirować i usunąć supernatant.
2. Osad zawiesić w **2 ml** buforu **TE**.
3. Dodać po **20 µl** **lizozymu** (10 mg/ml) (nie ma w zestawie) i inkubować przez **15 min** w temp. **37 °C**.

Uwaga:

dla *Staphylococcus aureus* zalecamy użycie lizostafiny (15 U/µl) (nie ma w zestawie).

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).

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

4. Dodać po **2 ml** roztworu lizującego **L1.4** i **100 µl** **proteiny K**.
5. Całość wymieszać przez odwracanie probówki. Inkubować w temp. **50 °C** do osiągnięcia całkowitej klarowności (zwykle ok. 60 min).

Opcjonalne usuwanie RNA: do próbki należy dodać po 10 µl RNAzy (10 mg/ml) (nie ma w zestawie). Całość wymieszać i pozostawić próbkę na 5 min w temp. pokojowej.

6. Prześć do punktu 1. protokołu izolacji.

Hodowle komórkowe

1. Przenieść **1 x 10⁷** hodowli komórkowych do probówki 15 ml typu Falcon (nie ma w zestawie). Odwirować i usunąć supernatant.
2. Osad zawiesić w **2 ml** buforu **TE**.
3. Dodać po **2 ml** roztworu lizującego **L1.4** i **100 µl** **proteiny K**.

- Całość wymieszać przez odwracanie probówki. Inkubować przez **30 min** w temp. **50 °C**.

Opcjonalne usuwanie RNA: do próbki należy dodać po 10 µl RNAzy (10 mg/ml) (nie ma w zestawie). Całość wymieszać i pozostawić próbkę na 5 min w temp. pokojowej.

- Wirować przez **10 min** przy **4000-5000 x g**. Przenieść supernatant do probówki 15 ml (nie ma w zestawie).
- Przejsć do punktu 1. protokołu izolacji.

Tkanki świeże

- 50-100 mg** rozdrobnionej tkanki (pociętej na fragmenty lub roztartej w ciekłym azocie) umieścić w probówce 15 ml typu Falcon (nie ma w zestawie).
- Dodać po **2 ml** buforu **TE**, **2 ml** roztworu lizującego **L1.4** i **100 µl** **proteiny K**.
- Całość wymieszać przez odwracanie probówki. Inkubować w temp. **50 °C** do całkowitego strawienia tkanki (zwykle 2-4 godz.). Od czasu do czasu próbkę worteksować.

Opcjonalne usuwanie RNA: do próbki należy dodać po 10 µl RNAzy (10 mg/ml) (nie ma w zestawie). Całość wymieszać i pozostawić próbkę na 5 min w temp. pokojowej.

- Wirować przez **10 min** przy **4000-5000 x g**. Przenieść supernatant do probówki 15 ml (nie ma w zestawie).
- Przejsć do punktu 1. protokołu izolacji.

Protokół izolacji

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. 4-8 °C.

- Próbkę nanieść na kolumnę Spin 100AX umieszczoną w probówce 15 ml.

Uwaga: W przypadku nieparzystej ilości próbek należy użyć do zrównoważenia kolumny równoważającej, dodając do niej odpowiednie ilości wody lub dowolnego roztworu równoważającego

Wirować w rotorze uchylnym przez **2 min** przy **3000 RPM**.

- Kolumnę Spin 100AX przenieść do **nowej** probówki 15 ml (w zestawie).

- Dodać po **3 ml** pierwszego roztworu płuczącego **W1G**.
Wirować w rotorze uchylnym przez **2 min** przy **3000 RPM**.

- Dodać po **1,5 ml** drugiego roztworu płuczącego **W2**.
Wirować w rotorze uchylnym przez **2 min** przy **3000 RPM**.

- Podczas wirowania przygotować **nowe** probówki 15 ml (w zestawie).
Dodać na ich dno po **10 µl** buforu zobojętniającego **N**.

Zobojętnianie próbek DNA - str. 6.

6. Po wirowaniu, przenieść kolumnę Spin 100AX do próbówki z buforem neutralizującym N.
7. Przed użyciem buforu elucyjnego E zalecamy przeprowadzenie testu funkcjonalności - str. 6.
Nanieść na kolumnę Spin 100AX po **400 µl** buforu elucyjnego E.
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. 4-8 °C.
8. Pozostawić na **2 min** w **temp. pokojowej**.
9. Wirować przez **2 min** przy **3000 RPM**.
10. Usunąć kolumnę Spin 100AX. Eluaty przenieść do **nowej** próbówki typu Eppendorf (nie ma w zestawie).
11. Oczyszczone DNA przechowywać w temp. 4-8 °C lub -20 °C do czasu dalszych analiz.

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 próbówki 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.

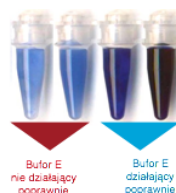
Kiedy przeprowadzić test funkcjonalności:

- 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 próbówki 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 Zatruc lub lekarzem.



UWAGA

L1.4 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.



UWAGA

W1G pierwszy roztwór płuczący

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

