

## Instrukcja

# Genomic Midi AX

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

| numer katalogowy | wielkość    |
|------------------|-------------|
| 895-20           | 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

|                                      |          |
|--------------------------------------|----------|
| <b>Skład</b>                         | <b>3</b> |
| <b>Dodatkowy sprzęt i odczynniki</b> | <b>3</b> |
| Niezbędne                            | 3        |
| Opcjonalne                           | 3        |
| <b>Przygotowanie materiału</b>       | <b>4</b> |
| Krew świeża lub mrożona              | 4        |
| Hodowle bakteryjne (Gram- i Gram+)   | 4        |
| Hodowle komórkowe                    | 4        |
| Tkanki świeże                        | 5        |
| <b>Protokół izolacji</b>             | <b>5</b> |
| Biały precipitat jest widoczny       | 6        |
| Biały precipitat nie jest widoczny   | 6        |
| <b>Informacje Bezpieczeństwa</b>     | <b>7</b> |

## 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 | 45 ml       | 15–25 °C       |
| K2 roztwór płuczący   | 110 ml      | 15–25 °C       |
| K3 roztwór elucyjny   | 25 ml       | 15–25 °C       |
| TE bufor              | 60 ml       | 15–25 °C       |
| Izopropanol           | 25 ml       | 15–25 °C       |
| Proteinaza K          | 2 x 1,1 ml  | 2–8 °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)
- 70% etanol
- 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)
- Woda jałowa (nr kat. 003-075, 003-25)

# 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 10<sup>7</sup>** 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**.

4. 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.

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

## Tkanki świeże

1. **50-100 mg** rozdrobnionej tkanki (pociętej na fragmenty lub roztartej w ciekłym azocie) umieścić w probówce 15 ml typu Falcon (nie ma w zestawie).
2. Dodać po **2 ml** buforu **TE**, **2 ml** roztworu lizującego **L1.4** i **100 µl** **Proteinazy K**.
3. 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.

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

## Protokół izolacji

1. 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**.

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

3. Dodać po **2,5 ml** roztworu płuczącego **K2**. Wirować w rotorze uchylnym przez **2 min** przy **3000 RPM**.

4. Ponownie dodać po **2,5 ml** roztworu płuczącego **K2**.  
Wirować w rotorze uchylnym przez **2 min** przy **3000 RPM**.

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

6. Dodać po **550 µl** roztworu elucyjnego **K3**.

7. Inkubować przez **2 min** w **temp. pokojowej**. Wirować w rotorze uchylnym przez **1 min** przy **3000 RPM**.
8. Dodać po **550 µl** roztworu elucyjnego **K3**.  
Wirować w rotorze uchylnym przez **1 min** przy **3000 RPM**. Usunąć kolumnę Spin 100AX.
9. Średnia objętość eluatu powinna wynieść ok. 1,1 ml.  
Eluat przenieść do probówki **2 ml** (nie ma w zestawie).
10. Dodać po **880 µl izopropanolu**. Zamknąć wieczko i wymieszać przez kilkakrotne odwracanie probówki.  
**Jeśli jest widoczny biały precypitat, należy przejść do punktu A.**  
**Jeśli biały precypitat nie jest widoczny, należy przejść do punktu B.**

## A. Biały precypitat jest widoczny

1. Wirować przez **2 min** przy **4000 RPM**. Ostrożnie usunąć supernatant.
2. Dodać po **500 µl 70% etanolu** (nie ma w zestawie).
3. Wirować przez **2 min** przy **4000 RPM**. Ostrożnie usunąć supernatant.
4. Odwrócić probówkę z osadem DNA i suszyć odwróconą do góry dnem przez **10 min** w **temp. pokojowej**.
5. Zawiesić osad DNA w odpowiedniej ilości buforu **TE** (w zestawie) lub **wody jałowej wolnej od nukleaz** (nie ma w zestawie).

W celu przyspieszenia rozpuszczania DNA można inkubować próbkę w temp. 50 °C od czasu do czasu delikatnie wstrząsając.

6. Oczyszczone DNA przechowywać w temp. 4-8 °C lub -20 °C do czasu dalszych analiz.

## B. Biały precypitat nie jest widoczny

1. Przenieść próbkę do nowej probówki wirówkowej dostosowanej do wysokich prędkości wirowania.  
Wirować przez **15 min** przy **12 000-14 000 RPM**. Ostrożnie usunąć supernatant.
2. Dodać po **500 µl 70% etanolu** (nie ma w zestawie).
3. Wirować przez **5 min** przy **12 000-14 000 RPM**. Ostrożnie usunąć supernatant.
4. Odwrócić probówkę z osadem DNA i suszyć odwróconą do góry dnem przez **10 min** w **temp. pokojowej**.
5. Zawiesić osad DNA w odpowiedniej ilości buforu **TE** (w zestawie) lub **wody jałowej wolnej od nukleaz** (nie ma w zestawie).

W celu przyspieszenia rozpuszczania DNA można inkubować próbkę w temp. 50 °C od czasu do czasu delikatnie wstrząsając.

6. Oczyszczone DNA przechowywać w temp. 4-8 °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**

## 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.



**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**

## Izopropanol

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

wersja 2023-1

