



**A&A BIOTECHNOLOGY**  
innovating life science

## Instrukcja

# Bead-Beat Micro AX Gravity

Uniwersalny zestaw o zwiększonej wydajności do izolacji genomowego DNA z różnych materiałów metodą grawitacyjną. Procedura z lizą mechaniczną.

numer katalogowy	wielkość
106-20	20 izolacji
106-100	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 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>Ważne informacje</b>	<b>4</b>
<b>Protokół izolacji</b>	<b>4</b>
Problem z prędkością przepływu lizatu	6
Zobojętnianie próbek DNA	6
Test funkcjonalności buforu E	6
<b>Technologia Gravity flow</b>	<b>7</b>
<b>Informacje Bezpieczeństwa</b>	<b>7</b>

## Skład

składnik	20 izolacji	100 izolacji	przechowywanie
<b>Kolumny Micro AXD</b>	20 szt.	100 szt.	2–8 °C
<b>Probówki odbieralnikowe</b>	20 szt.	100 szt.	15–25 °C
<b>Probówki z kuleczkami cyrkonowymi</b>	20 szt.	100 szt.	15–25 °C
<b>LSU bufor lizujący</b>	24 ml	120 ml	15–25 °C
<b>K1G roztwór równoważący</b>	12 ml	55 ml	15–25 °C
<b>W1G pierwszy roztwór płuczący</b>	14 ml	70 ml	15–25 °C
<b>W2 drugi roztwór płuczący</b>	12 ml	60 ml	15–25 °C
<b>E bufor elucyjny</b> (nie zawiera EDTA)	5 ml	20 ml	2–8 °C
<b>N bufor zobojętniający</b>	500 µl	1 ml	15–25 °C
<b>T roztwór</b>	100 µl	400 µl	2–8 °C
<b>Proteinaza K</b>	600 µl	2 x 1,1 ml	2–8 °C

Pojemność minikolumny do oczyszczania DNA wynosi 20 µg.

## Dodatkowy sprzęt i odczynniki

### Niezbędne

- Jałowe probówki 1,5 ml typu Eppendorf
- Beadbeater (np. Mini-Beadbeater firmy BioSpec, FastPrep-24 firmy MP Biomedicals)
- Inkubator lub termoblok 50 °C (zalecany Thermomixer firmy Eppendorf)
- Worteks, wirówka

### Opcjonalne

- DTT (nr kat. 2010-5, 2010-25, 2010-10P) (do izolacji z hodowli drożdży)
- 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:
  - **Bakterie, pleśnie i drożdże z hodowli płynnych: 1-2 ml** hodowli wirować przez 5 min przy 10 000-12 000 RPM i usunąć supernatant.
  - **Bakterie, pleśnie i drożdże z hodowli stałych: do 100 mg**
  - **Fragmety roślin: do 100 mg**
  - **Fragmety tkanek: do 20 mg**
  - **Biologiczne próbki środowiskowe: do 200 mg**
  - **Inne materiały biologiczne: do 50 mg**

2. Dodać po 1 ml buforu lizującego LSU i 20 µl proteinazy K.

W przypadku izolacji DNA z drożdży zalecamy dodanie 10 µl 1M roztworu DTT (nie ma w zestawie).

3. Przenieść mieszaninę do próbówki z kuleczkami cyrkoniowymi. Próbkę umieścić w urządzeniu Beadbeater i przeprowadzić proces wytrząsania przy **maksymalnej sile** przez 30-60 s.

4. Próbkę inkubować przez 15-30 min w temp. 50 °C. Podczas inkubacji próbkę należy kilkakrotnie worteksować.

Zalecamy prowadzenie inkubacji w urządzeniu Thermomixer firmy Eppendorf lub jego odpowiedniku przy parametrach ciągłego mieszania przy 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.

5. 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.

6. 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 uwięziony między złożem a naniesionym roztworem K1G. Kolumna jest gotowa do użytku, gdy roztwór przestanie kapać z kapilary.

7. Po inkubacji próbkę wirować przez 5 min przy 12 000 RPM.

8. 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 8-10 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.

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

Poczekać, aż roztwór przestanie kapać z kapilary.

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

Poczekać, aż roztwór przestanie kapać z kapilary.

11. 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.

12. 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.

13. Przenieść kolumny Micro AXD do przygotowanych probówek elucyjnych.

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

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

Poczekać **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 próbki 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.

15. Usunąć kolumnę Micro AXD, zamknąć próbkę 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 próbówce 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, zawieszony w buforze elucyjnym DNA wymiesza się z buforem zobojętniającym N i ulegnie natychmiastowej neutralizacji. Będzie zawieszony 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.

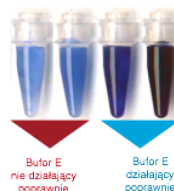
**Kiedy przeprowadzić test funkcjonalności:**

- 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.

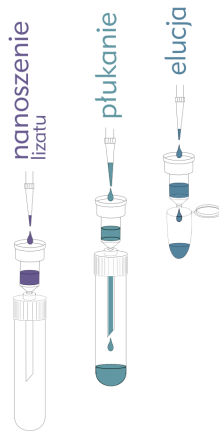
**Test funkcjonalności:**

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.  
 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

wersja 2023-1

