

Instrukcja

Genomic Mini AX Yeast Spin

Zestaw o zwiększonej wydajności do izolacji genomowego DNA z drożdży i grzybów.

numer katalogowy	wielkość
058-100S	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

Skład	3
Dodatkowy sprzęt i odczynniki	3
Niezbędne	3
Opcjonalne	3
Ważne informacje	4
Protokół izolacji	4
Zobojętnianie próbek DNA	6
Test funkcjonalności buforu E	6
Informacje Bezpieczeństwa	7

Skład

składnik	100 izolacji	przechowywanie
Kolumny Mini AX Spin	100 szt.	2–8 °C
Probówki 2 ml	200 szt.	15–25 °C
SP roztwór do sferoplastów	14 ml	2–8 °C
DTT (dithiothreitol)	154 mg	2–8 °C
LS zawiesina lizująca	70 ml	15–25 °C
W1 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
Litykaza	1,1 ml	-20 °C
Proteinaza K	2 x 1,1 ml	4–8 °C

Pojemność kolumny do oczyszczania DNA wynosi 15 µg.

Dodatkowy sprzęt i odczynniki

Niezbędne

- Probówki 1,5 ml typu Eppendorf
- Inkubator lub termoblok 30 °C, 50 °C (zalecany Thermomixer firmy Eppendorf)
- Worteks
- Mikrowirówka

Opcjonalne

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

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.
- Przed rozpoczęciem procesu izolacji należy **przygotować roztwór 1M DTT**. W tym celu do fiolki z DTT należy dodać 1 ml jałowej wody (nie ma w zestawie) i proszek całkowicie rozpuścić. Roztwór należy przechowywać w temp. -20 °C.

Protokół izolacji

1. Zwirować **1 ml** hodowli drożdży lub grzybów i zawiesić w **100 µl** roztworu **SP** do sferoplastów.
2. Dodać po **10 µl** litykazy i **5 µl 1M DTT**.
3. Próbkę zworteksować i inkubować przez **30 min** w temp. **30 °C**.
4. Uwaga: Zawiesinę lizującą LS należy wymieszać przed użyciem przez kilkakrotne odwracanie butelki.
Dodać po **600 µl** zawiesiny lizującej **LS** i **20 µl** **proteiny K**.
5. Próbkę zworteksować i inkubować przez **15 min** w temp. **50 °C**. Podczas inkubacji próbkę należy kilkakrotnie worteksować.

Inkubację można przeprowadzić w urządzeniu Thermomixer firmy Eppendorf lub jego odpowiedniku przy parametrach ciągłego mieszania 1400 RPM.

Opcjonalne usuwanie RNA: do próbek należy dodać po 5 µl RNAzy (10 mg/ml) (nie ma w zestawie). Całość wymieszać i pozostawić próbkę na 5 min w temp. pokojowej.
6. Po inkubacji próbkę intensywnie worteksować przez **2 min** przy **1000-1400 RPM**.

Ten krok jest kluczowy dla wydajności izolacji DNA.
7. Próbkę wirować przez **5 min** przy **14 000 x g**.

Na dnie próbki powinien znajdować się zwarty osad stanowiący mieszaninę niezliwowanego materiału oraz drobinek pochodzących z zawiesiny lizującej.
8. Nanieść po **600 µl** supernatantu na kolumnę Mini AX Spin znajdującą się w 2 ml próbówce.
9. Wirować przez **30-60 s** przy **8 000 x g**.

10. Wyjąć kolumnę Mini AX Spin z próbówki i umieścić ją w **nowej** próbówce **2 ml** (w zestawie).
11. Nanieść po **600 µl** pierwszego roztworu płuczącego **W1**.
Wirować przez **30-60 s** przy **8 000 x g**.
12. Wyjąć kolumnę Mini AX Spin z próbówki i umieścić ją w **nowej** próbówce **2 ml** (w zestawie).
13. Nanieść po **500 µl** drugiego roztworu płuczącego **W2**.
Wirować przez **30-60 s** przy **14 000-21 000 x g**.
14. Przygotować próbówki elucyjne (nie ma w zestawie). Mogą to być jałowe próbówki 1,5 ml typu Eppendorf.
Dodać na dno próbówki elucyjnej po **5 µl** buforu zobojętniającego **N**.

Zobojętnianie próbek DNA - str. 6.
15. Przenieść kolumnę Mini AX Spin do przygotowanej próbówki elucyjnej.
16. Przed użyciem buforu elucyjnego **E** zalecamy przeprowadzenie testu funkcjonalności - str. 6.

Nanieść po **100-150 µl** buforu elucyjnego **E** na kolumnę Mini AX Spin.
Zostawić na **2 min** w **temp. pokojowej**.

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.
17. Wirować przez **30-60 s** przy **14 000-21 000 x g**.
18. Usunąć kolumnę Mini AX Spin i zamknąć próbówkę elucyjną zawierającą DNA.

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 probówki 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.

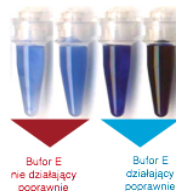
Kiedy przeprowadzić test funkcjonalności:

- 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 probówki 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.



NIEBEZPIECZEŃSTWO

Litykaza.

H334 Może powodować objawy alergii lub astmy lub trudności w oddychaniu w następstwie wdychania.
 P261 Unikać wdychania pyłu.
 P342+P311 W przypadku wystąpienia objawów ze strony układu oddechowego skontaktować się z Ośrodkiem Zatruc lub lekarzem.



UWAGA

DTT (dithiothreitol)

H302 Działa szkodliwie po połknięciu.
 H315 Działa drażniąco na skórę.
 H319 Działa drażniąco na oczy.
 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.



UWAGA

LS zawiesina lizująca

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

W1 pierwszy 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

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

wersja 2023-1

