

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

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
Biały precipitat jest widoczny	6
Biały precipitat nie jest widoczny	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	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	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)
- 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 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**.

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 równoważącej, dodając do niej odpowiednie ilości wody lub dowolnego roztworu równoważącego.

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

