

Instrukcja

Genomic Mini AX Streptomyces

Zestaw o zwiększonej wydajności do izolacji genomowego DNA z bakterii rodzaju *Streptomyces*.
Procedura z precypitacją DNA.

numer katalogowy	wielkość
066-60	60 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	4
Informacje dodatkowe	6
Informacje bezpieczeństwa	7

Skład

składnik	60 izolacji	przechowywanie
Kolumny Genomic Mini AX	60 szt.	2–8 °C
Probówki 2 ml	60 szt.	15–25 °C
BS bufor do zawieszania	15 ml	2–8 °C
DTT (dithiothreitol)	154 mg	2–8 °C
LS zawiesina lizująca	100 ml	15–25 °C
K1 roztwór równoważący	55 ml	15–25 °C
K2 roztwór płuczący	190 ml	15–25 °C
K3 roztwór elucyjny	90 ml	15–25 °C
PM mieszanina precypitacyjna	55 ml	15–25 °C
Bufor Tris (10 mM Tris-HCl, pH 8,5)	10 ml	15–25 °C
Lizozym	1,1 ml	-20 °C
Mutanolizyna	1,1 ml	-20 °C
Proteinaza K	1,3 ml	4–8 °C

Pojemność minikolumny do oczyszczania DNA wynosi 20 µg.

Dodatkowy sprzęt i odczynniki

Niezbędne

- Probówki 1,5 ml, 2 ml typu Eppendorf
- 70% etanol
- Inkubator lub termoblok 50 °C (zalecany Thermomixer firmy Eppendorf)
- Worteks
- Mikrowirówka

Opcjonalne

- RNAza (nr kat. 1006-10, 1006-50)
- Woda jałowa (nr kat. 003-075, 003-25)
- Bufor TE (nr kat. 297-100)

Ważne informacje

- Proces oczyszczania DNA na kolumnie można przerwać w dowolnym momencie i kontynuować nawet po upływie 15 godzin bez wpływu na jakość i ilość uzyskanego DNA. Podczas takiej przerwy należy pamiętać o zamknięciu probówki, w której znajduje się kolumna.
- Przed rozpoczęciem procesu izolacji należy **przygotować roztwór 1M DTT**. W tym celu do fiołki z DTT należy dodać 1 ml jałowej wody (nie ma w zestawie) i proszek całkowicie rozpuścić. Roztwór należy przechowywać w temp. -20 °C.

Protokół

1. Zwirować **1-3 ml** nocnej hodowli bakteryjnej. Usunąć supernatant. Osad bakteryjny zawiesić w **200 µl** buforu **BS** do zawieszania bakterii.
2. Dodać po **10 µl lizozymu**, **10 µl mutanolizyny** oraz po **10 µl 1M DTT**.
Całość wymieszać i inkubować przez **30 min** w temp. **50 °C**.
3. **Uwaga:** Zawiesinę lizującą **LS** należy wymieszać przed użyciem przez kilkakrotne odwracanie butelki.
Dodać po **1,5 ml** zawiesiny lizującej **LS** i **20 µl** **proteiny K**.
4. Próbkę zworteksować i inkubować przez **30 min** w temp. **50 °C**. Podczas inkubacji próbki kilkakrotnie mieszać przez odwracanie probówek.

Inkubację można przeprowadzić w urządzeniu Thermomixer firmy Eppendorf lub jego odpowiedniku przy parametrach ciągłego mieszania 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. W trakcie inkubacji przygotować kolumny Genomic Mini AX będące w probówkach 15 ml. Nanieść na kolumnę po **800 µl** roztworu równoważącego **K1**. Poczekać, aż roztwór wypłynie z kolumny.
6. Po inkubacji próbkę intensywnie worteksować przez **15 s**.
Wirować przez **5 min** przy **10 000-14 000 RPM**.

Na dnie probówki powinien znajdować się zwarty osad stanowiący mieszaninę niezliwowanego materiału oraz drobinek pochodzących z zawiesiny lizującej.
7. Pobrać supernatant i w całości nanieść na zrównoważoną kolumnę Genomic Mini AX. Poczekać, aż lizat wypłynie z kolumny.

Kolumna pracuje grawitacyjnie. Szybkość przepływu zależy od ilości oraz wielkości cząstek DNA. Duża ilość DNA powoduje spowolnienie przepływu, a przy znacznym przeładunku kolumny może dojść nawet do całkowitego jej zablokowania. W takim przypadku należy wirować kolumny wraz z probówkami w rotorze uchylnym przez 1 min przy 3000-4000 RPM. Wirowanie można przeprowadzić zarówno po naniesieniu próbek (pkt 7) jak i podczas płukania roztworem płuczącym K2 (pkt 8 i 9) i przy elucji roztworem elucyjnym K3 (pkt 10).

8. Nanieść po **1,5 ml** roztworu płuczącego **K2** na kolumnę Genomic Mini AX. Poczekać, aż roztwór wypłynie z kolumny.
9. Ponownie nanieść po **1,5 ml** roztworu płuczącego **K2** na kolumnę Genomic Mini AX. Poczekać, aż roztwór wypłynie z kolumny.
10. Nanieść po **100 µl** roztworu elucyjnego **K3** bezpośrednio na membranę kolumny Genomic Mini AX. Poczekać, aż eluat wypłynie z kolumny.
Uwaga: Krok ten ma na celu zmniejszenie całkowitej objętości eluatu, gdyż martwa objętość kolumny wynosi 100 µl.
11. Przenieść kolumnę Genomic Mini AX do probówki precypitacyjnej **2 ml** (w zestawie).
Uwaga: Kolumna posiada odpowiednie żeberka pozwalające na łatwe umieszczenie jej w probówce.
12. Nanieść po **1 ml** roztworu elucyjnego **K3** na kolumnę Genomic Mini AX. Poczekać, aż eluat wypłynie z kolumny. Usunąć kolumnę Genomic Mini AX.
13. **Uwaga:** Mieszanina precypitacyjna PM zawiera dodatkowo wzmacniacz precypitacji, dlatego przed użyciem należy ją wymieszać przez kilkakrotne odwracanie butelki.

Do eluatów dodać po **800 µl** mieszaniny precypitacyjnej **PM**.
14. Wymieszać i wirować przez **10 min** przy **10 000 RPM**.

Na dnie powinien być widoczny jasnoniebieski osad DNA.
15. Ostrożnie zlać supernatant, tak aby nie usunąć niebieskiego osadu DNA.

Uwaga: W trakcie zlewania supernatantu łatwo wylać osad DNA. Dla bezpieczeństwa zaleca się wylewać supernatant do przygotowanej probówki, tak aby można było go odzyskać.
16. Dodać po **500 µl 70% etanolu** (nie ma w zestawie).
Całość wymieszać i wirować przez **3 min** przy **10 000 RPM**.

Na dnie powinien być widoczny jasnoniebieski osad DNA.
17. Ostrożnie zlać supernatant, tak aby nie usunąć niebieskiego osadu DNA.

Uwaga: W trakcie zlewania supernatantu łatwo wylać osad DNA. Dla bezpieczeństwa zaleca się wylewać supernatant do przygotowanej probówki, tak aby można było go odzyskać..
18. Odwrócić probówkę z osadem DNA i suszyć odwróconą do góry dnem przez **5 min** w **temp. pokojowej**.

Uwaga: Jeżeli na ściankach probówki wciąż znajdują się resztki alkoholu, należy je osuszyć przy pomocy patyczków higienicznych.

19. Zawiesić osad DNA w odpowiedniej ilości buforu **Tris** (w zestawie), buforu **TE** lub **wody jałowej wolnej od nukleaz** (nie ma w zestawie).

Niebieska barwa osadu umożliwia śledzenie procesu rozpuszczania DNA.

20. Oczyszczone DNA przechowywać w temp. -20 °C do czasu dalszych analiz.

Informacje dodatkowe

Przerwa w procesie izolacji. Proces oczyszczania DNA na kolumnie można przerwać w dowolnym momencie i kontynuować nawet po upływie 15 godzin bez wpływu na jakość i ilość uzyskanego DNA. Podczas takiej przerwy należy pamiętać o zamknięciu probówki, w której znajduje się kolumna.

Objętość płynu w probówce pozwala na łatwe zorientowanie się na jakim etapie zostało przerwane oczyszczanie:

- ~ 0,5 ml - po zrównoważeniu kolumny;
- ~ 2 ml - po przejściu lizatu;
- ~ 3,5 ml - po pierwszym płukaniu roztworem płuczącym K2;
- ~ 5 ml - po drugim płukaniu roztworem płuczącym K2.

Grawitacyjna praca kolumny. Kolumna pracuje grawitacyjnie. Szybkość przepływu zależy od ilości oraz wielkości cząstek DNA. Duża ilość DNA powoduje spowolnienie przepływu, a przy znacznym przeładowaniu kolumny (>20 µg DNA) może dojść nawet do całkowitego jej zablokowania. W takim przypadku należy wirować kolumny wraz z probówkami w rotorze uchylnym przez 1 min przy 3000-4000 RPM. Wirowanie można przeprowadzić zarówno po naniesieniu próbek, jak i podczas płukania roztworem płuczącym K2, a także przy elucji roztworem elucyjnym K3. Przy elucji należy przenieść kolumnę do nowej probówki 15 ml (nie ma w zestawie). Nanieść na kolumnę po 1 ml roztworu elucyjnego K3. Począkać 2 min i wirować przez 1 min przy 3000 RPM. Przenieść eluat do probówek precypitacyjnych 2 ml (w zestawie). Następnie przejść do punktu 13. protokołu.

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

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 zawieszina 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

K1 roztwór równoważący

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

PM mieszanina precypitacyjna

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

