

Instrukcja

Genomic Mini AX Bacteria+ Spin

Zestaw o zwiększonej wydajności do izolacji genomowego DNA z bakterii gram-dodatnich.

numer katalogowy	wielkość
060-100MS	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 wchodzi 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
BS bufor do zawieszania	25 ml	2–8 °C
L1.4 roztwór lizujący	25 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
Lizozym (50 mg/ml)	1,1 ml	-20 °C
Mutanolizyna	550 µl	-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 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.

Protokół izolacji

1. Zwirować **maksymalnie 1 ml** nocnej hodowli bakteryjnej. Usunąć supernatant. Osad bakteryjny zawiesić w **200 µl** buforu **BS** do zawieszania bakterii.
2. Dodać po **10 µl lizozymu** i **5 µl mutanolizyny**.

Synergizm działania mutanolizyny i lizozymu prowadzi do zwiększonej wydajności lizy komórek bakterii z rodzaju: *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Listeria*.

Całość wymieszać i inkubować przez **20 min** w temp. **50 °C**
3. Dodać po **200 µl** roztworu lizującego **L1.4** i **20 µl** **proteiny K**.
4. Próbkę zworteksować i inkubować przez **10 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 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. Po inkubacji próbkę intensywnie worteksować przez **20 s** przy **1000-1400 RPM**.

Ten krok jest kluczowy dla wydajności izolacji DNA.
6. Próbkę wirować przez **10 s** przy **8 000-14 000 x g**.

Na dnie próbówki powinien znajdować się zwarty osad stanowiący mieszaninę niezlizowanego materiału.
7. Nanieść supernatant na kolumnę Mini AX Spin znajdującą się w 2 ml próbówce.
8. Wirować przez **30-60 s** przy **8 000-14 000 x g**.
9. Wyjąć kolumnę Mini AX Spin z próbówki i umieścić ją w **nowej** próbówce **2 ml** (w zestawie).
10. Nanieść po **600 µl** pierwszego roztworu płuczącego **W1**.

Wirować przez **30-60 s** przy **8 000-14 000 x g**.

11. Wyjąć kolumnę Mini AX Spin z próbówki i umieścić ją w **nowej** próbówce **2 ml** (w zestawie).

12. Nanieść po **500 µl** drugiego roztworu płuczącego **W2**.
Wirować przez **30-60 s** przy **14 000-21 000 x g**.

13. 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.

14. Przenieść kolumnę Mini AX Spin do przygotowanej próbówki elucyjnej.

15. 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.

16. Wirować przez **30-60 s** przy **14 000-21 000 x g**.

17. 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.

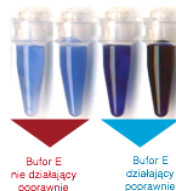
Kiedy przeprowadzić test funkcjonalności:

- 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 Zatruć 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

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 Zatruć 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

