

Instrukcja

Genomic Micro AX Bacteria+ Gravity

Zestaw do izolacji genomowego DNA z bakterii Gram(+) metodą grawitacyjną.

numer katalogowy	wielkość
102-100M	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
Problem z prędkością przepływu lizatu	6
Zobojętnianie próbek DNA	6
Test funkcjonalności buforu E	6
Technologia Gravity flow	7
Informacje Bezpieczeństwa	7

Skład

składnik	100 izolacji	przechowywanie
Kolumny Micro AXD	100 szt.	2–8 °C
Probówki odbieralnikowe	100 szt.	15–25 °C
BS bufor do zawieszania	14 ml	2–8 °C
LSU bufor lizujący	50 ml	15–25 °C
K1G roztwór równoważący	60 ml	15–25 °C
W1G 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	1,1 ml	-20 °C
Mutanolizyna	550 µl	-20 °C
Proteinaza K	2 x 1,1 ml	4–8 °C

Pojemność minikolumny do oczyszczania DNA wynosi 20 µg.

Dodatkowy sprzęt i odczynniki

Niezbędne

- Jałowe probówki 1,5 ml typu Eppendorf
- Inkubator lub termoblok 50 °C (zalecany Thermomixer firmy Eppendorf)
- Wortexs, wirówka

Opcjonalne

- 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. Zwirować maksymalnie **500 µl** nocnej hodowli bakteryjnej. Usunąć supernatant. Osad bakteryjny zawiesić w **100 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 **400 µl** buforu lizującego **LSU** i **20 µl proteiny K**.
4. Próbkę zworteksować i inkubować przez **10 min** w temp. **50 °C**. Podczas inkubacji próbki 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. Podczas inkubacji przygotować kolumny Micro AXD przez dokładne zamocowanie ich do probówek odbieralnikowych i umieszczenie w pozycji pionowej w statywie.



Zdjęcie poglądowe:

umieszczenie kolumn i probówek odbieralnikowych w statywie Gravity flow.

6. Nanieść po **500 µl** roztworu równoważącego **K1G** na kolumnę **Micro AXD**. Począć, 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 worteksować przez 2 min przy 1000-1500 RPM.

Jest to kluczowy krok dla wydajności DNA.

Wirować przez 10 s przy 8000 x g w celu usunięcia resztek materiału z wieczek próbek.

8. Nanieść próbkę na zrównoważoną kolumnę Micro AXD.

Począć, 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.

Począć, aż roztwór przestanie kapać z kapilary.

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

Począć, 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 próbki elucyjne - mogą to być 1,5 ml próbki typu Eppendorf (nie ma w zestawie).

Nanieść na dno próbek po 5 µl buforu zobojętniającego N.

Zobojętnianie próbek DNA - str. 6.

13. Przenieść kolumny Micro AXD do przygotowanych próbek 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 probówkę 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 probówce 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, 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.

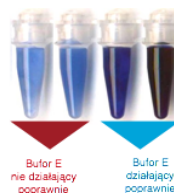
Kiedy przeprowadzić test funkcjonalności:

- 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.

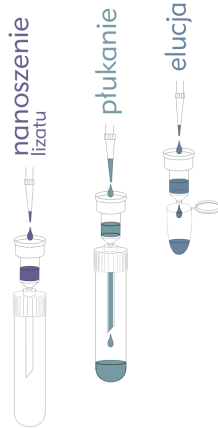
Test funkcjonalności:

Przenieść 20 µl buforu E do 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. 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

