

GeneMAGNET Viral RNA/DNA Purification Kit

Zestaw do oczyszczania wirusowego RNA/DNA z wymazów, płynów ustrojowych, mleka, tkanek i odchodów.

● kat. nr. E3402

EURx Ltd. 80-297 Gdansk Poland
ul. Przyrodników 3, NIP 957-07-05-191
KRS 0000202039, www.eurx.com.pl
orders: email: orders@eurx.com.pl
tel. +48 58 524 06 97, fax +48 58 341 74 23



Spis treści

Uwagi wstępne.....	3
Protokół.....	4
Część I Czynności wstępne.....	4
Część II Przygotowanie próbek z materiałem biologicznym	4
Część III Izolacja DNA/RNA.....	6
Środki ostrożności.....	7

Składniki zestawu	96 izolacji E3402-01	Warunki przechowywania
Sol V	26 ml	15-25°C
Wash RBW	2 x 88 ml	15-25°C
Wash RBW2	88 ml	15-25°C
Proteinase K (20 mg/ml)	2.4 ml	-20°C
RNase-free water	18 ml	15-25°C
Carrier RNA *	2 x 300 µg	15-25°C
Magnetic Beads	1000 µl	2-8°C
Protokół	1	

* Dołączony liofilizat nośnikowego RNA należy zawiesić w 300 µl wody wolnej od RNaz otrzymując stężenie 1 µg/µl.

Wypożyczenie i odczynniki dostarczane przez użytkownika

- Statyw magnetyczny EURx (E0361 na 16 probówek, E0362 na 24 probówki, E0363 na płytce 96 dołkowe). Statywy do zakupienia osobno.
- Rękawiczki, pipety, jałowe tipsy, jałowe probówki 1.5-2 ml lub płytke 96 dołkowe o objętości dołków 800 µl, blok grzejny pozwalający na inkubację próbki w temperaturze 56°C, wortex.
- Alkohol etylowy 96-100%, 0.9% NaCl lub PBS do przygotowania materiału do izolacji.
- BeadTubesDry nr kat. E0358 do izolacji RNA/DNA wirusowego z odchodów.

Uwagi wstępne

UWAGA 1 • Przeznaczenie zestawu. Przeznaczenie zestawu. Zestaw jest przeznaczony do jednoczesnej izolacji RNA i DNA wirusowego. Zestaw umożliwia izolację RNA/DNA z osocza, surowicy lub innych płynów ustrojowych pozbawionych komórek takich jak mleko, a także z wymazów, tkanek i odchodów.

UWAGA 2 • Maksymalna ilość użytego materiału. Izolację należy wykonać z próbki o objętości 200 µl. W przypadku próbki o mniejszej objętości, płyn należy uzupełnić do 200 µl za pomocą 0.9% roztworu NaCl lub PBS (wolny od RNaz/DNaz).

UWAGA 3 • Przechowywanie próbek. Po zebraniu próbki mogą być przechowywane do 5 godzin w temperaturze 2-8°C. W przypadku dłuższego przechowywania próbki należy rozporcjować i zamrozić w -20°C lub -80°C. Właściwym materiałem do izolacji są próbki, które były rozmrożone tylko jeden raz.

UWAGA 4 • Nośnikowe RNA (Carrier RNA). Dodatek nośnikowego RNA (ang. carrier RNA) zwiększa wydajność wiązania wirusowych kwasów nukleinowych do kuleczek magnetycznych. Jest to ważne szczególnie w przypadku gdy próbka zawiera niewiele docelowego materiału genetycznego. Dodatkowo, wprowadzenie dużej ilości nośnikowego RNA zmniejsza prawdopodobieństwo degradacji wirusowych kwasów nukleinowych. Dołączony liofilizat nośnikowego RNA należy zawiesić w odpowiedniej ilości wody zgodnie z instrukcją w „Część I Czynności wstępne” (strona 4). [Carrier RNA: Poly(A) 2 000-10 000 nt.]

UWAGA 5 • Wydajność izolacji. Ilość wirusowych kwasów nukleinowych wyizolowanych z płynów biologicznych lub wymazów jest zwykle poniżej 1 µg i nie nadaje się do pomiaru spektrofotometrycznego. W przypadku ilościowej oceny kwasów nukleinowych otrzymanych przy użyciu poniższego protokołu należy pamiętać, że w próbce jest więcej nośnikowego RNA niż wirusowego RNA/DNA. W przypadku izolacji z tkanek większość kwasów nukleinowych stanowi materiał genetyczny zwierzęcia/człowieka.

UWAGA 6 • Kontrola wewnętrzna. Niektóre komercyjnie dostępne systemy amplifikacji lub procedury walidacyjne wymagają stosowania kontroli wewnętrznej. W takich przypadkach kontrolne DNA/RNA powinno być dodane razem z RNA nośnikowym do buforu lizującego.

UWAGA 7 • Dodatkowe zalecenia. W celu uniknięcia krzyżowego zanieczyszczenia próbek podczas izolacji należy zwracać szczególną uwagę na odpowiednią zmianę końcówek pipet pomiędzy próbkami.

UWAGA 8 • Przechowywanie składników zestawu. Po rozpakowaniu składniki zestawu należy przechowywać w temperaturze pokojowej, za wyjątkiem Proteinazy K którą należy przechowywać w 20°C i Magnetic Beads które należy przechowywać w 2-8°C.

UWAGA 9 • Dobra praktyka laboratoryjna. Wszystkie roztwory z zestawu do oczyszczania RNA/DNA należy przechowywać szczelnie zamknięte, aby uniknąć zmiany stężeń w wyniku parowania.

Protokół

Część I Czynności wstępne

Rozpuścić nośnikowe RNA (**Carrier RNA**). Dodać 300 µl wody wolnej od RNaz (**RNase-free water**) do 300 µg nośnikowego RNA uzyskując stężenie 1 µg/µl. Wymieszać dokładnie przez pipetowanie. Zawieszone nośnikowe RNA podzielić na porcje i przechowywać w -20°C. Unikać rozmrażania/zamrażania porcji więcej niż 3 razy. Używać 5 µl (5 µg) nośnikowego RNA na jedną izolację.

1. Próbkę doprowadzić do temperatury pokojowej.
2. Dodać 5 µl roztworu nośnikowego RNA do 215 µl buforu **Sol V**.
 - Nośnikowe RNA nie rozpuszcza się bezpośrednio w buforze Sol V. Przed dodaniem do buforu Sol V musi być rozpuszczone w wodzie wolnej od RNaz.
 - Podana proporcja dotyczy jednej izolacji. Można przygotować większą objętość mieszaniny proporcjonalnie do ilości przeprowadzanych izolacji.

Część II Przygotowanie próbek z materiałem biologicznym

Wymaz:

Suchą wymazówkę z materiałem biologicznym umieścić w 300 µl 0.9% NaCl lub PBS i inkubować 5 min. Po tym czasie pobrać 200 µl płynu i przenieść do nowej probówki.

- *Procedurę izolacji RNA/DNA z suchej wymazówki można również przyspieszyć przez jednoczesne dodanie do probówki z wymazówką 200 µl 0.9% NaCl, 220 µl Sol V (z dodanym nośnikowym RNA), 20 µl Proteinazy K, zworteksowanie i przejście do Część III pkt. 2.*
- *W przypadku izolacji kwasów nukleinowych z wymazówki przechowywanej w soli fizjologicznej (0.9% NaCl) pobrać bezpośrednio 200 µl płynu i przenieść do nowej probówki. W przypadku mniejszej objętości płyn uzupełnić do 200 µl solą fizjologiczną.*
- *W przypadku izolacji kwasów nukleinowych z wymazówki przechowywanej w podłożu inaktywującym czynniki biologiczne (podłoże typu Viral Transport Medium VTM na bazie guanidyny) pobrać 100 µl podłoża do nowej probówki i uzupełnić 100 µl 0.9% NaCl lub 1x PBS.*

Płyny ustrojowe:

Do izolacji kwasów nukleinowych z krwi, osocza, surowicy czy innych płynów ustrojowych pobrać 200 µl próbki do probówki typu Eppendorf 1.5-2 ml.

Mleko:

Do izolacji kwasów nukleinowych z mleka należy 1 ml mleka zwirować 3 min z prędkością 11 000 g, ostrożnie usunąć supernatant nie naruszając osadu (osad może być trudno widoczny) i rozpuścić osad w 200 µl 0.9% NaCl lub PBS.

Tkanki:

W przypadku izolacji kwasów nukleinowych z tkanki należy pobrać 5-10 mg materiału, zhomogenizować w 400 µl 0.9% NaCl lub PBS i pobrać 200 µl próbki do probówki typu Eppendorf 1.5-2 ml.

Odchody:

Odważyć do 30 mg odchodów/kału (objętość do 3 ziaren ryżu) i przenieść do probówki BeadTubeDry (nr kat. E0358). Dodać 500 µl 0,9% NaCl lub PBS i wytrząsać intensywnie. Szklane kuleczki i resztki organiczne osadzić przez krótkie wirowanie z prędkością 500 x g aby otrzymać przejrzysty roztwór. Pobrać 100 µl supernatantu do probówki typu Eppendorf 1.5-2 ml i dodać 100 µl 0.9% NaCl lub PBS. Probówki BeadTubeDry (nr kat. E0358) można zakupić oddzielnie.

Część III Izolacja DNA/RNA

1. Do próbki z materiałem biologicznym dodać 220 μl **Sol V** (z dodanym nośnikowym RNA, patrz „Czynności wstępne”) i 20 μl Proteinazy K.
2. Worteksować kilka sekund, bądź dokładnie wymieszać przez odwracanie próbki. Inkubować 15 min w 56°C.
3. Dodać 250 μl **96-100% alkoholu etylowego** i dokładnie wymieszać.
4. Bardzo dokładnie worteksować próbkę z kuleczkami magnetycznymi (Magnetic Beads), a następnie dodać 10 μl kuleczek magnetycznych do mieszaniny z roztworem DNA i wymieszać próbkę przez worteksowanie przez 1 min.
5. Umieścić próbkę na statywie magnetycznym i odczekać do momentu całkowitego przyklejenia kuleczek magnetycznych do magnesu.
6. Trzymając próbkę na statywie magnetycznym usunąć roztwór nie naruszając kuleczek magnetycznych. Przełożyć próbkę na zwykły statyw (usunąć magnes), dodać 800 μl buforu płuczącego **Wash RBW** do próbki i worteksować przez 10 s.
7. Umieścić próbkę na statywie magnetycznym i odczekać do momentu całkowitego przyklejenia kuleczek magnetycznych do magnesu.
8. Trzymając próbkę na statywie magnetycznym usunąć roztwór nie naruszając kuleczek magnetycznych. Przełożyć próbkę na zwykły statyw (usunąć magnes), dodać 800 μl buforu płuczącego **Wash RBW** do próbki i worteksować przez 10 s.
9. Umieścić próbkę na statywie magnetycznym i odczekać do momentu całkowitego przyklejenia kuleczek magnetycznych do magnesu.
10. Trzymając próbkę na statywie magnetycznym usunąć dokładnie cały roztwór nie naruszając kuleczek magnetycznych.
11. Przełożyć próbkę na zwykły statyw (usunąć magnes), dodać 800 μl buforu płuczącego **Wash RBW2** do próbki i worteksować przez 10 s.
12. Umieścić próbkę na statywie magnetycznym i odczekać do momentu całkowitego przyklejenia kuleczek magnetycznych do magnesu.
13. Trzymając próbkę na statywie magnetycznym usunąć dokładnie cały roztwór nie naruszając kuleczek magnetycznych. Zostawić otwartą próbkę na statywie magnetycznym przez 15-20 min w celu odparowania resztek alkoholu.
 - o W buforze Wash RBW2 znajduje się alkohol, należy upewnić się, że próbka jest sucha zanim przejdzie się do pkt 14.
14. Dodać do próbki 50-100 μl **RNase-free water**, inkubować 2 min mieszając.
15. Umieścić próbkę na statywie magnetycznym. Po separacji kuleczek od roztworu, przenieść roztwór RNA/DNA do nowej próbki. RNA/DNA jest gotowe do dalszych analiz/manipulacji, może być przechowywane w 2-8°C lub zamrożone w -20°C.

Środki ostrożności

Wash RBW



Niebezpieczeństwo

H225 Wysoce łatwopalna ciecz i pary.

H319 Działa drażniąco na oczy.

P210 Przechowywać z dala od źródeł ciepła, gorących powierzchni, źródeł iskrzenia, otwartego ognia i innych źródeł zapłonu. Nie palić.

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.

P337+P313 W przypadku utrzymywania się działania drażniącego na oczy: zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.

P403+P235 Przechowywać w dobrze wentylowanym miejscu. Przechowywać w chłodnym miejscu.



Wash RBW2



Niebezpieczeństwo

H225 Wysoce łatwopalna ciecz i pary.

H319 Działa drażniąco na oczy.

P210 Przechowywać z dala od źródeł ciepła, gorących powierzchni, źródeł iskrzenia, otwartego ognia i innych źródeł zapłonu. Nie palić.

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.

P337+P313 W przypadku utrzymywania się działania drażniącego na oczy: zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.

P403+P235 Przechowywać w dobrze wentylowanym miejscu. Przechowywać w chłodnym miejscu.



Proteinase K



Niebezpieczeństwo

H334 Może powodować objawy alergii lub astmy lub trudności w oddychaniu w następstwie wdychania.

P261 Unikać wdychania par/ rozpylonej cieczy.

P304+P340 W przypadku dostania się do dróg oddechowych: wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić mu warunki do swobodnego oddychania.

P342+P311 W przypadku wystąpienia objawów ze strony układu oddechowego: skontaktować się z ośrodkiem zatrucia/ lekarzem.

Sol V



Uwaga

H302+H332 Działa szkodliwie po połknięciu lub w następstwie wdychania.

H315 Działa drażniąco na skórę.

H319 Działa drażniąco na oczy.

P261 Unikać wdychania par/ rozpylonej cieczy.

P280 Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy.

P301+P312 W przypadku połknięcia: w przypadku złego samopoczucia skontaktować się z ośrodkiem zatrucia/ lekarzem.

P304+P340 W przypadku dostania się do dróg oddechowych: wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić mu warunki do swobodnego oddychania.

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.

P337+P313 W przypadku utrzymywania się działania drażniącego na oczy: zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.

P302+P352 W przypadku kontaktu ze skórą: umyć dużą ilością wody.

P332+P313 W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry: zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.

**DOBÓR ZESTAWU
W ZALEŻNOŚCI OD RODZAJU
IZOLOWANEGO MATERIAŁU**

PRZEWODNIK PO ZESTAWACH DO IZOLACJI KWAŚÓW NUKLEINOWYCH																						
E3651	TISSUE & BACTERIAL DNA	50 150	●	●																		
E3650	TISSUE DNA	50 150		●																		
E3630	SWAB-EXTRACT DNA	25 100																				
E3675	STOOL DNA	50 100																				
E3670	SOIL DNA	50 100																				
E3615	SHORT DNA CLEAN-UP	25 100																				
E3665	QUICK BLOOD DNA	50 150																				
E3600	PLASMID MINIPREP DNA	50 150																				
E3635	AGROBACTERIUM PLASMID DNA	50 150																				
E3695	PLANT & FUNGI DNA	50 150																				
E3620	PCR / DNA CLEAN-UP	50 150																				
E3625	FOOD EXTRACT DNA	25 100																				
E3655	CELL CULTURE DNA	50 150																				
E3660	BONE DNA	25 50																				
E3645	BASIC DNA	50 150																				
E3610	BIO – TRACE DNA	25 100																				
E3680	BACTERIAL & YEAST GENOMIC DNA	50 150																				
E3640	AGAROSE – OUT DNA	50 150																				
E3685	GRAM PLUS & YEAST GENOMIC DNA	25 100																				
E3600	MICELLULA DNA ²	50 150																				

Wszystkie zestawy zawierają bufor WASH w formie gotowej do bezpośredniego użytku

1. Dodatkowo wymagany bufor Lyse CT (E0324)
2. Zestaw do tworzenia emulsji i oczyszczania DNA.

**DOBÓR ZESTAWU
W ZALEŻNOŚCI OD RODZAJU
IZOLOWANEGO MATERIAŁU**

EUR _X [®] MOLECULAR BIOLOGY PRODUCTS				IZOLACJA RNA					
				E3700	E3594	E3596	E3598	E3599	E3593
				RNA EXTRA ^{COL} 1	UNIVERSAL BLOOD RNA	HUMAN BLOOD RNA	UNIVERSAL RNA	UNIVERSAL RNA/miRNA	FFPE RNA Purification Kit
				IZOLACJE					
				25 100	25	25	25 100	25 100	25 100
RNA	RNA POWYŻEJ 200 nt	TKANKI ZWIERZĘCE					●	●	
		TKANKI ROŚLINNE					●	●	
		BAKTERIE					●		
		DROŻDŻE					●		
		HODOWLE KOMÓRKOWE					●	●	
		KREW LUDZKA	ŚWIEŻA	●	●	●	●		
			MROŻONA ¹		●				
		KREW ZWIERZĘCA	ŚWIEŻA	●	●				
			MROŻONA ¹		●				
	miRNA LUB CAŁKOWITE RNA	TKANKI ZWIERZĘCE		●				●	
		TKANKI PARAFINA / FORMALINA							●
		TKANKI ROŚLINNE		●				●	
		HODOWLE KOMÓRKOWE		●				●	
		BAKTERIE		●					
		DROŻDŻE		●					
		KREW/LEUKOCYTY		●					
	OCZYSZCZANIE PO REAKCJACH ENZYMATYCZNYCH							●	●
	TRAWIENIE DNazą I NA KOLUMIENCIE					●		●	

Wszystkie zestawy zawierają bufory WASH w formie gotowej do bezpośredniego użytku

1. Mrożone w buforze Lyse Blood (występuje w zestawie).
2. Mieszanina fenolu i soli chaotropowych przeznaczona do izolacji całkowitego RNA.

- **GeneMAGNET Viral RNA/DNA Purification Kit jest przeznaczony do jednoczesnego oczyszczania RNA i DNA wirusowego z wymazów biologicznych, osocza, surowicy oraz innych wolnych od komórek płynów ustrojowych a także tkanek i odchodów.**

Zestaw umożliwia izolację RNA/DNA z płynów ustrojowych świeżych bądź mrożonych o objętości 200 µl. Prosta procedura oparta na czterech krokach (liza, wiązanie, płukanie i elucja) minimalizuje czas izolacji oraz możliwość zanieczyszczenia próbek. Dodatek nośnikowego RNA wspomaga wiązanie nawet niewielkich ilości wirusowych kwasów nukleinowych do kuleczek magnetycznych, które następnie są płukane buforami usuwającymi zanieczyszczenia mające wpływ na wydajność reakcji odwrotnej transkrypcji, PCR czy qPCR. Elucję oczyszczonego RNA/DNA wykonuje się wodą wolną

od RNaz. Oczyszczony preparat RNA/DNA wolny od białek, nukleaz i innych zanieczyszczeń nadaje się do bezpośredniego użytku. Nie wymaga dalszej precypitacji etanolem.

Izolację można wykonywać w probówkach typu Eppendorf o objętości 1,5-2 ml lub na płytkach 96 dołkowych o objętości dołków 800 µl. Podczas izolacji wymagane jest użycie statywu magnetycznego na probówki lub płytki 96 dołkowe do dokupienia osobno.

- **Linia GeneMAGNET opiera się na użyciu pokrytych krzemionką paramagnetycznych kuleczek (Magnetic Beads) do oczyszczania DNA i RNA. W celu osiągnięcia wysokiej wydajności i czystości otrzymanych kwasów nukleinowych, opracowano wyspecjalizowane bufor wiążące i płuczące, projektowane pod kątem optymalnego wykorzystania właściwości nowych kuleczek magnetycznych.**



EURx Ltd. 80-297 Gdansk Poland
ul. Przyrodników 3, NIP 957-07-05-191
KRS 0000202039, www.eurx.com.pl
orders: email: orders@eurx.com.pl
tel. +48 58 524 06 97, fax +48 58 341 74 23

