

GeneMAGNET Soil DNA Purification Kit

Zestaw do izolacji DNA z próbek środowiskowych (ziemi, piasku, kompostu, obornika, odchodów, resztek roślinnych, wody)

● **kat. nr. E3421**

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

Wyposażenie i odczynniki dostarczane przez użytkownika.....	2
Uwagi wstępne.....	3
Protokół.....	3
Środki ostrożności.....	6

Składniki zestawu	96 izolacji Exxxx-01	Warunki przechowywania
Lyse SL	7.2 ml	15-25°C
PR	48 ml	2-8°C
Wash S1	48 ml	15-25°C
Wash S2	130 ml	15-25°C
Elution	24 ml	15-25°C
Magnetic Beads	25 ml	2-8°C
Bead Tube	2 x 50 szt.	15-25°C
Protokół	1	

Wyposażenie i odczynniki dostarczane przez użytkownika

- Statyw magnetyczny EURx (E0361 na 16 probówek, E0362 na 24 probówki, E0363 na płytki 96 dołkowe). Statywy do zakupienia osobno.
- Rękawiczki, pipety, jałowe tipsy, jałowe probówki 1.5-2 ml lub płytki 96-dołkowe o objętości co najmniej 1 ml.
- Wortex pozwalający na wytrząsanie kilku próbek jednocześnie bądź wyspecjalizowane przyrządy, nazywane ang. “bead beater” lub “cell disrupter” (np. FastPrep, Precellys, Disruptor Genie). Pozwala to na uzyskanie większej wydajności izolacji DNA, jednakże w tym wypadku wymagana jest optymalizacja czasu wytrząsania (skrócenie w stosunku do czasu podanego w protokole).
- Alkohol etylowy 96-100%. Opcjonalnie RNaza A (10 mg/ml, polecamy użycie RNazy A EURx nr kat. E1350).

Uwagi wstępne

UWAGA 1 · Przeznaczenie zestawu. Zestaw umożliwia szybką izolację DNA z wielu rodzajów próbek środowiskowych: gleby, osadu, kompostu, gnoju, obornika, odchodów, a także z wody. Próbka środowiskowa wytrząsana jest w probówce ze specjalnie dobranymi kuleczkami szklanymi i buforem wspomagającym liżę i uwolnienie DNA. Przy użyciu odpowiednio dobranego buforu PR wytrąca się związki humusowe (które są silnymi inhibitorami reakcji PCR), a następnie DNA wiąże się z kuleczkami magnetycznymi i podczas 3 etapów płukania ulega dodatkowemu oczyszczeniu. Uzyskany izolat DNA może być bezpośrednio użyty do amplifikacji DNA metodą PCR (bakterie Gram + i Gram-, grzyby, pierwotniaki, glony, nicienie, zwierzęta i rośliny).

UWAGA 2 · Maksymalna ilość użytego materiału. Na jedną izolację należy użyć do 250 mg gleby lub odchodów, albo 1 membranę do 1 cm² po filtrowaniu wody. W razie potrzeby objętość próbek można zwiększyć lub zmniejszyć, dostosowując proporcjonalnie objętości buforów. Np. zmniejszając o połowę objętość, do 300 µl supernatantu po precypitacji buforem PR dodać 125 µl kuleczek magnetycznych, płukanie można wykonać dodając odpowiednio 200 µl i 300 µl Wash S1 i Wash S2. Objętość elucji jest dowolna, ale kuleczki magnetyczne powinny swobodnie rozтворzyć się w buforze Elution. Przy zwiększaniu objętości buforów należy zwrócić uwagę na ograniczenia spowodowane pojemnością próbki oraz zachować proporcje odczynników do oczyszczania DNA.

UWAGA 3 · Przechowywanie składników zestawu. Po rozpakowaniu, składniki zestawu należy przechowywać w temperaturze pokojowej, za wyjątkiem buforu PR i kuleczek magnetycznych, które należy przechowywać w temperaturze 2-8°C.

UWAGA 4 · Dobra praktyka laboratoryjna. Wszystkie roztwory z zestawu do oczyszczania DNA należy przechowywać szczelnie zamknięte, aby uniknąć zmiany stężeń w wyniku parowania.

UWAGA 5 · Elution jest buforem o niskiej zawartości soli, w składzie nie zawiera chelatorów jonów metali (np. EDTA), które mogą hamować reakcje enzymatyczne. DNA rozpuszczone w buforze Elution może być wykorzystane do trawienia enzymami restrykcyjnymi, kinazowania, ligacji, sekwencjonowania metodą Sangera lub NGS itd. DNA można też wymyć z kolumnki z użyciem Tris-HCl, wody lub TE.

Protokół

1. Dodać 250 mg próbki ziemi lub do 100 mg odchodów do próbki **Bead Tube**.
 - *Probówka Bead Tube zawiera 750 µl roztworu i kulki szklane umożliwiające dokładne zawieszenie i liżę próbki ziemi.*
 - *Zestaw pozwala na izolację DNA z maksymalnie 250 mg ziemi lub 100 mg odchodów. Zależnie od typu materiału, może być wymagana optymalizacja wagi próbki użytej do izolacji, np. w przypadku ziemi, która silnie chłonie wodę, należy zmniejszyć wagę próbki do 100-150 mg. W przypadku bardzo wysuszonych odchodów, szczególnie zwierząt roślinożernych, należy zmniejszyć wagę próbki do 50 mg.*
 - *Opcjonalnie, jeżeli konieczne jest uzyskanie DNA wolnego od RNA, dodać 5 µl RNazy A (10 mg/ml).*

- W przypadku izolacji DNA z filtrów do wody, po filtracji wody wyjąć membranę z obudowy, pociąć na drobne kawałki lub luźno umieścić w probówce Bead Tube. Do filtrowania wody można użyć dowolnego typu membrany, o dowolnej porowatości, także 0,45 μm i 0,22 μm . Objętość przefiltrowanej wody zależy od użytego filtra, liczby bakterii i cząstek stałych w próbce.
- 2. Wymieszać przez kilkukrotne odwrócenie próbówki.
- 3. Dodać 60 μl buforu **Lyse SL** i wymieszać przez kilkukrotne odwrócenie próbówki.
 - Komponenty buforu Lyse SL mogą tworzyć precypitat w temperaturze poniżej 20°C. W przypadku pojawienia się precypitatu, roztwór należy podgrzać w temperaturze 37°C, aż do całkowitego wyklarowania.
- 4. Probówki **Bead Tubes** przymocować do wortexu w pozycji horyzontalnej. Użyć w tym celu specjalnego adaptera lub alternatywnie przymocować próbówki za pomocą mocnej taśmy klejącej. Wortexować przez 10 min z maksymalną prędkością.
 - Do wytrząsania probówek Bead Tubes można użyć wyspecjalizowanych przyrządów, nazywanych ang. "bead beater" lub "cell disrupter" (np. FastPrep, Precellys, Disruptor Genie), co pozwala na uzyskanie większej wydajności izolacji DNA. W tym wypadku wymagana jest optymalizacja czasu wytrząsania.
 - W niektórych przypadkach podniesienie wydajności lizy można uzyskać poprzez zamrożenie próbki. W tym celu, po etapie wortexowania, należy zamrozić próbkę w -70°C. Następnie po rozmrożeniu dodatkowo wortexować próbkę przez 5 min. Proces zamrażania/rozmarzania można powtórzyć do 3 razy.
- 5. Wirować przez 2 min z maksymalną prędkością. Przenieść 400 μl supernatantu do nowej próbówki typu Eppendorf o objętości 1.5 ml.
 - W przypadku, gdy niemożliwe jest pobranie 400 μl supernatantu z nad osadu, należy zmniejszyć wagę próbki.
- 6. Dodać 400 μl buforu **PR**. Wortexować przez 5 sekund i inkubować przez 5 min w lodzie (0-4°C).
 - Bufor PR umożliwia precypitację organicznych i nieorganicznych substancji, m.in.: związków humusowych, białek, pozostałości komórkowych.
- 7. Wirować przez 1 min z maksymalną prędkością.
- 8. Przenieść 600 μl klarownego (niezmąconego) supernatantu do nowej próbówki typu Eppendorf o objętości 1.5 ml.
- 9. Bardzo dokładnie zwortexować buteleczkę z kuleczkami magnetycznymi (**Magnetic Beads**), a następnie dodać 250 μl kuleczek magnetycznych do mieszaniny z roztworem DNA i wymieszać dokładnie próbkę przez wortexowanie lub pipetowanie. Inkubować 5 min w temperaturze pokojowej.
 - Kuleczki magnetyczne zawieszane są w buforze wiążącym DNA.
 - Ewentualnie przełożyć próbkę do dołka płytki 96-dołkowej o objętości dołków co najmniej 1.0 ml.

- Uwaga, jeśli objętość mieszaniny jest większa niż objętość dołka płytki 96-dołkowej lub gdy siła magnesu jest zbyt mała, można do dołka nanieść część próbki, płytkę umieścić na magnecie, po separacji kuleczek magnetycznych odciągnąć supernatant i nanieść do dołka płytki resztę mieszaniny powtarzając procedurę separacji kuleczek magnetycznych.
10. Umieścić probówkę/płytkę na statywie magnetycznym i odczekać do momentu całkowitego przyklejenia kuleczek magnetycznych do magnesu (do 3 min).
 11. Trzymając probówkę/płytkę na statywie magnetycznym usunąć roztwór nie naruszając kuleczek magnetycznych.
 12. Przełożyć probówkę/płytkę na zwykły statyw (usunąć magnes), dodać 400 µl buforu płuczącego **Wash S1** do probówki/dołka płytki 96 dołkowej i worteksować lub pipetować przez 10 s.
 13. Umieścić probówkę/płytkę na statywie magnetycznym i odczekać do momentu całkowitego przyklejenia kuleczek magnetycznych do magnesu.
 14. Trzymając probówkę/płytkę na statywie magnetycznym usunąć roztwór nie naruszając kuleczek magnetycznych.
 15. Przełożyć probówkę na zwykły statyw (usunąć magnes), dodać 600 µl buforu płuczącego **Wash S2** do probówki/dołka płytki 96 dołkowej i worteksować lub pipetować przez 10 s.
 16. Umieścić probówkę/płytkę na statywie magnetycznym i odczekać do momentu całkowitego przyklejenia kuleczek magnetycznych do magnesu.
 17. Trzymając probówkę/płytkę na statywie magnetycznym usunąć dokładnie cały roztwór nie naruszając kuleczek magnetycznych.
 18. Przełożyć probówkę na zwykły statyw (usunąć magnes), dodać ponownie 600 µl buforu płuczącego **Wash S2** do probówki/dołka płytki 96 dołkowej i worteksować lub pipetować przez 10 s.
 19. Umieścić probówkę/płytkę na statywie magnetycznym i odczekać do momentu całkowitego przyklejenia kuleczek magnetycznych do magnesu.
 20. Trzymając probówkę/płytkę na statywie magnetycznym usunąć dokładnie cały roztwór nie naruszając kuleczek magnetycznych. Zostawić otwartą probówkę/płytkę na statywie magnetycznym przez 15 min w celu odparowania resztek alkoholu.
 - W buforze Wash S2 znajduje się alkohol, należy upewnić się, że próbka jest sucha zanim przejdzie się do następnego kroku.
 21. Dodać do probówki 50-200 µl **Elution**, worteksować lub pipetować próbkę w celu całkowitego zawieszenia kuleczek magnetycznych w roztworze i inkubować 5 min w temperaturze pokojowej.
 22. Umieścić probówkę/płytkę na statywie magnetycznym. Po separacji kuleczek od roztworu, przenieść roztwór DNA do nowej probówki. DNA jest gotowe do dalszych analiz/manipulacji, może być przechowywane w 2-8°C lub zamrożone w -20°C.

Środki ostrożności

Wash S1



Uwaga

H226 Łatwopalna ciecz i pary.
H302+H332 Działa szkodliwie po połknięciu lub w następstwie wdychania.

H315 Działa drażniąco na skórę.

H319 Działa drażniąco na oczy.



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

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 zatruc/ 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.

Wash S2



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.

- **GeneMAGNET Soil DNA Purification Kit jest przeznaczony do szybkiej izolacji całkowitego DNA z próbek środowiskowych (gleby, osadu, kompostu, gnoju, odchodów, a także z wody). Oczyszczone DNA nie zawiera powszechnie występujących w środowisku naturalnym związków humusowych (silnych inhibitorów reakcji PCR) i może być bezpośrednio użyte do amplifikacji DNA metodą PCR.**

Próbka wytrząsana jest w probówce ze specjalnie dobranymi kuleczkami szklanymi i buforem wspomagającym lizę i uwolnienie DNA. Przy użyciu odpowiednio dobranego buforu PR wytrąca się związki humusowe, a następnie DNA wiąże się z kuleczkami magnetycznymi i podczas 3 etapów

ptukania ulega dodatkowemu oczyszczeniu. Elucję oczyszczonego DNA wykonuje się buforem niskosolnym, np.: zawierającym Tris-HCl, TE lub wodą destylowaną. Oczyszczony preparat DNA jest gotowy do bezpośredniego użytku. Nie wymaga dalszej precypitacji etanolem.

- **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 bufory wiążące i płuczące, projektowane pod kątem optymalnego wykorzystania właściwości nowych kuleczek magnetycznych.**



EURx Ltd. 80-297 Gdansk Poland
ul. Przyrodnikow 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

