

GeneMAGNET Blood DNA Purification Kit

Zestaw do szybkiej izolacji DNA z krwi świeżej i mrożonej

○ **kat. nr. E3429**

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
Dodatek 1. Izolacja DNA z próbek krwi pobranych na antykoagulant heparynę.....	5
Dodatek 2. Izolacja DNA z płam krwi	5
Środki ostrożności.....	6

Składniki zestawu	96 izolacji E3429-01	Warunki przechowywania
Proteinase K (20 mg/ml)	1.2 ml	-20°C
Lyse Blood	32 ml	15-25°C
Sol Blood	58 ml	15-25°C
Wash B1	46 ml	15-25°C
Wash B2	70 ml	15-25°C
Wash B3	70 ml	15-25°C
Elution	30 ml	15-25°C
Magnetic Beads	1 ml	2-8°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.
- Etanol 96-100%, rękawiczki, jałowe tipsy, jałowe probówki 1.5-2 ml lub płytki 96 dołkowe o objętości dołków przynajmniej 0.8 ml (próbka krwi pobrana na cytrynian, EDTA) lub 1.0 ml (próbka krwi pobrana na heparynę), worteks, blok grzejny pozwalający na inkubację próbki w temperaturze 65°C (do próbek krwi pobranych na heparynę).

Uwagi wstępne

UWAGA 1 • Przeznaczenie zestawu. Zestaw umożliwia szybką izolację DNA z krwi ludzkiej pobranej na wybrany antykoagulant EDTA-K2, EDTA-K3, cytrynian sodu lub heparynę (Dodatek 1), a także z plam krwi (Dodatek 2). Zestaw do izolacji ręcznej i automatycznej.

UWAGA 2 • Maksymalna ilość użytego materiału. Izolację należy wykonać z próbki o objętości 200 µl krwi. W przypadku próbki o mniejszej objętości, dopełnić próbkę roztworem PBS lub 0.9% NaCl do objętości 200 µl.

UWAGA 3 • Przechowywanie próbek. Krew można przechowywać w obecności antykoagulantów w temperaturze 4°C (do kilku dni) lub w postaci zamrożonej w -20°C (do 4 tygodni) lub -70°C (preferowana temperatura -70°C). Probówki można rozmrozić i zamrozić do 3 razy bez znaczącego wpływu na wydajność i jakość izolacji DNA.

UWAGA 4 • Przechowywanie składników zestawu. Po rozpakowaniu, zestaw należy przechowywać w temperaturze pokojowej, za wyjątkiem Proteinazy K i kuleczek magnetycznych. Proteinazę K należy przechowywać w -20°C. Kuleczki magnetyczne należy przechowywać w 2-8°C.

UWAGA 5 • Dobra praktyka laboratoryjna. Wszelkie roztwory z zestawu do oczyszczania DNA należy przechowywać szczelnie zamknięte, aby uniknąć zmiany stężeń w wyniku parowania.

UWAGA 6 • 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. Do próbki typu Eppendorf 1.5-2 ml dodać 10 µl **Proteinase K** i 200 µl krwi.
 - o *Gdy objętość próbki jest mniejsza niż 200 µl, dopełnić próbkę roztworem PBS lub 0.9% NaCl.*
2. Dodać 80 µl buforu **Lyse Blood**.
3. Dokładnie wymieszać przez pipetowanie lub worteksowanie.
4. Inkubować 20 min w temperaturze pokojowej pipetując lub worteksując co 10 min.
 - o *20 min wystarcza na strawienie próbki, ale czas ten w razie potrzeby można wydłużyć.*
5. Dodać 500 µl buforu **Sol Blood**. Dokładnie wymieszać przez pipetowanie (20 razy) lub worteksowanie (30 s).
6. Bardzo dokładnie zworteksować próbkę z kuleczkami magnetycznymi (**Magnetic Beads**), a następnie dodać 10 µl kuleczek magnetycznych do mieszaniny z roztworem DNA i wymieszać dokładnie próbkę przez worteksowanie lub pipetowanie. Inkubować 5 min w temperaturze pokojowej.

- 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 magnesie, po separacji kuleczek magnetycznych odciągnąć supernatant i nanieść do dołka płytki resztę mieszaniny powtarzając procedurę separacji kuleczek magnetycznych.
7. Umieścić probówkę/płytkę na statywie magnetycznym i odczekać do momentu całkowitego przyklejenia kuleczek magnetycznych do magnesu (3 min).
 8. Trzymając probówkę/płytkę na statywie magnetycznym usunąć roztwór nie naruszając kuleczek magnetycznych. Przełożyć probówkę/płytkę na zwykły statyw (usunąć magnes), **dodać 400 µl buforu płuczącego Wash B1** do próbki/dołka płytki 96 dołkowej i worteksować lub pipetować przez 10 s.
 9. Umieścić probówkę/płytkę na statywie magnetycznym i odczekać do momentu całkowitego przyklejenia kuleczek magnetycznych do magnesu.
 10. Trzymając probówkę/płytkę na statywie magnetycznym usunąć roztwór nie naruszając kuleczek magnetycznych. Przełożyć probówkę na zwykły statyw (usunąć magnes), **dodać 600 µl buforu płuczącego Wash B2** do próbki/dołka płytki 96 dołkowej i worteksować lub pipetować przez 10 s.
 11. Umieścić probówkę/płytkę na statywie magnetycznym i odczekać do momentu całkowitego przyklejenia kuleczek magnetycznych do magnesu.
 12. Trzymając probówkę/płytkę na statywie magnetycznym usunąć dokładnie cały roztwór nie naruszając kuleczek magnetycznych.
 13. Przełożyć probówkę na zwykły statyw (usunąć magnes), **dodać 600 µl buforu płuczącego Wash B3** do próbki/dołka płytki 96 dołkowej i worteksować lub pipetować przez 10 s.
 14. Umieścić probówkę/płytkę na statywie magnetycznym i odczekać do momentu całkowitego przyklejenia kuleczek magnetycznych do magnesu.
 15. 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 B3 znajduje się alkohol, należy upewnić się, że próbka jest sucha zanim przejdzie się do następnego kroku.
 16. Dodać do próbki 100-200 µl **Elution**, worteksować lub pipetować próbkę w celu całkowitego zawieszenia kuleczek magnetycznych w roztworze i inkubować 5 min w temperaturze pokojowej.
 17. Umieścić probówkę/płytkę na statywie magnetycznym. Po separacji kuleczek od roztworu, przenieść roztwór DNA do nowej próbki. DNA jest gotowe do dalszych analiz/manipulacji, może być przechowywane w 2-8°C lub zamrożone w -20°C.

Dodatek 1. Izolacja DNA z próbek krwi pobranych na antykoagulant heparynę

UWAGA 1 • Dodatek 1 należy używać w celu usunięcia heparyny będącej inhibitorem reakcji PCR, można stosować go też alternatywnie do głównego protokołu do izolacji DNA z próbek krwi pobranych na inny koagulant niż heparyna (EDTA lub cytrynian sodu).

UWAGA 2 • Wymagane użycie bloku grzejnego pozwalającego na inkubację próbki w temperaturze 65°C.

UWAGA 3 • Wymagane użycie probówek/plytek o objętości dołków co najmniej 1.0 ml.

UWAGA 4 • Wymagane użycie 96-100% etanolu do izolacji.

1. Do próbki typu Eppendorf 1.5-2 ml dodać 10 µl **Proteinase K** i 200 µl krwi.
 - o *Gdy objętość próbki jest mniejsza niż 200 µl, dopełnić próbkę roztworem PBS lub 0.9% NaCl.*
2. Dodać 300 µl buforu **Lyse Blood**.
3. Dokładnie wymieszać przez pipetowanie lub worteksowanie.
4. Inkubować 30 min w temperaturze 65°C mieszając co 10 min, a następnie schłodzić do temperatury pokojowej.
5. Dodać 500 µl alkoholu etylowego (96-100%). Dokładnie wymieszać przez pipetowanie lub worteksowanie.
6. Kontynuować od pkt 6 głównego protokołu.

Dodatek 2. Izolacja DNA z plam krwi

1. Wyciąć fragment materiału lub bibuły/papieru poplamiony krwią (nie przekraczać 1 cm²). Pociąć fragment na mniejsze kawałki. Umieścić pocięte skrawki materiału w probówce typu Eppendorf 2 ml. Plamy z podłoża twardych zeskrobać i wsypać do próbki.
2. Dodać 200 µl PBS i inkubować nasączony materiał przez 2 h.
3. Dodać 10 µl **Proteinase K** i kontynuować procedurę od punktu 2 protokołu str. 3.

Środki ostrożności

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 zatruc/lekarzem

Lye Blood



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 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.

EUH208 Zawiera dihydrochlorek etylenodiaminy. Może powodować wystąpienie reakcji alergicznej.

Sol Blood



Niebezpieczeństwo

H226 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.

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.

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



Wash B1

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.

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



Wash B2 / Wash B3

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 Blood DNA Purification Kit jest przeznaczony do szybkiej izolacji całkowitego komórkowego DNA (genomowego i mitochondrialnego) z krwi ludzkiej pobranej na wybrany antykoagulant EDTA-K2, EDTA-K3, cytrynian sodu lub heparynę.**

Opracowano nowy bufor do lizy próbki krwi, uwolnienia DNA ze struktur komórkowych i umożliwienie wiązania DNA do kuleczek magnetycznych.

Zanieczyszczenia usuwane są z roztworu podczas trzech etapów płukania. Elucję oczyszczonego DNA wykonuje się buforem niskosolnym, np.: zawierającym Tris-HCl, TE lub wodą destylowaną. Oczyszczony preparat DNA nadaje się 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 bufor 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

