

GeneMATRIX Agarose-Out DNA Purification Kit

Uniwersalny zestaw do izolacji DNA z żeli agarozowych

● **kat. nr. E3540**

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





Spis treści

Uwagi wstępne.....	3
Wyposażenie i odczynniki dostarczane przez użytkownika	3
Protokół.....	4
Część I Rozpuszczanie agarozy	4
Część II Wiązanie do membran, płukanie i elucja fragmentów DNA	5
Środki ostrożności.....	6

Składniki zestawu	50 izolacji E3540-01	150 izolacji E3540-02	Warunki przechowywania
Buffer A	1.8 ml	5.4 ml	15-25°C
Orange A	39 ml	117 ml	15-25°C
Wash A1	30 ml	90 ml	15-25°C
Wash AX2	39 ml	117 ml	15-25°C
Elution	6 ml	18 ml	15-25°C
DNA Binding Columns	50 szt.	3 x 50 szt.	15-25°C
Protokół	1	1	

Uwagi wstępne

UWAGA 1 • Przeznaczenie zestawu. Zestaw jest przeznaczony do izolacji fragmentów DNA o wielkości od ok. 100 pz do 10 kpz, zarówno z żeli buforowanych TAE jak i TBE. Możliwa jest izolacja większych fragmentów DNA (10 kpz do ponad 20 kpz). W tym zakresie obserwuje się jednak znacznie obniżoną wydajność izolacji.

UWAGA 2 • Maksymalna ilość użytego materiału. Ogólna pojemność minikolumny to 20 µg DNA. Maksymalna waga fragmentu agarozy przypadającego na jedną minikolumnę to 250 mg. Optymalne wyniki automatycznego sekwencjonowania DNA, oczyszczanego GeneMatrix Agarose-Out, uzyskuje się używając 0.3-0.6 pmola DNA (przykładowo 200-400 ng fragmentu DNA o długości 1 kpz).

UWAGA 3 • Przechowywanie komponentów zestawu. Po rozpakowaniu, zestaw do oczyszczania DNA należy przechowywać w temperaturze pokojowej. W wypadku krystalizacji komponentów przechowywanych buforów, roztwory należy podgrzać do 37°C, aż do całkowitego wyklarowania.

UWAGA 4 • Dobra praktyka laboratoryjna. Roztwory z zestawu do oczyszczania DNA należy przechowywać szczelnie zamknięte, aby uniknąć zmiany stężeń w wyniku parowania. Bufory Orange A oraz Wash A1 po kontakcie z kwasami mogą uwalniać toksyczne gazy. Używać wyłącznie zgodnie z przeznaczeniem; nie dodawać kwasów do pojemników zawierających pozostałości po użyciu zestawu.

Wyposażenie i odczynniki dostarczane przez użytkownika

Mikrowirówka, rękawiczki, pipety, jałowe tipsy, jałowe probówki 1.5-2 ml, skalpel, blok grzejny pozwalający na inkubację próbki w temperaturze 55°C.

Protokół

Część I Rozpuszczanie agarozy

1. Dodać 30 μ l buforu aktywacyjnego **Buffer A** do minikolumny (nie wirować). Pozostawić w temperaturze pokojowej do momentu naniesienia rozpuszczonej agarozy na minikolumnę.
 - o Dodanie buforu aktywacyjnego Buffer A centralnie na powierzchnię membran zapewnia kompletne nasączenie membran buforem aktywacyjnym i uzyskanie maksymalnej wydajności wiązania DNA.
 - o Aktywację należy wykonać przed rozpoczęciem procedury izolacji DNA.
2. Wyciąć prążek DNA z żelu, tak aby jego waga nie przekroczyła 250 mg, a następnie umieścić wycięty fragment żelu w probówce typu Eppendorf.
 - o Prążek należy wycinać w taki sposób, aby uniknąć nadmiaru otaczającej DNA agarozy.
 - o W przypadku, gdy waga fragmentu żelu przekracza 250 mg, należy zawiesić go w odpowiedniej objętości buforu Orange A i nanieść w porcjach na minikolumnę (patrz: Część II protokołu).
 - o Istotne jest, aby bufor do elektroforezy nie był wielokrotnie używany, ze względu na zachodzące zmiany pH, które obniżają wydajność odzysku DNA.
3. Dodać 2.5 objętości buforu **Orange A** do 1 objętości wyciętego żelu (100 mg ~ 100 μ l). Wymieszać kilkakrotnie poprzez odwracanie probówki.
 - o Na przykład, do 100 mg wyciętej agarozy dodać 250 μ l buforu Orange A.
4. Inkubować w bloku grzejnym lub łaźni wodnej w temp. 55°C, mieszając przez 2-krotne odwracanie co 1-2 min, aż do całkowitego rozpuszczenia agarozy. Uzyskanie jednorodnego roztworu o pomarańczowym kolorze świadczy o zakończeniu procesu.
 - o Proces rozpuszczania trwa od 5 do 10 min, zależnie od stężenia agarozy, użytego buforu oraz ilości wyciętego żelu.

Część II Wiązanie do membran, płukanie i elucja fragmentów DNA

1. Przenieść maksymalnie 700 μ l mieszaniny do kolumny wiążącej umieszczonej w probówce odbierającej. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g. Wylać przesącz.
2. Przenieść pozostałość mieszaniny do tej samej kolumny wiążącej. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g. Wylać przesącz.
3. Dodać 500 μ l buforu płuczącego **Wash A1** do minikolumny i wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
4. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i umieścić minikolumnę z powrotem w probówce odbierającej.
5. Dodać 650 μ l buforu płuczącego **Wash AX2** i wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
6. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i umieścić minikolumnę z powrotem w probówce odbierającej.
7. Wirować przez 1 min z maksymalną prędkością w celu usunięcia resztek buforu płuczącego.
8. Minikolumnę umieścić w nowej probówce typu Eppendorf 1.5–2 ml. Dodać 50–80 μ l buforu **Elution**.
 - o Dodanie buforu eluującego centralnie na powierzchnię membrany zapewnia uzyskanie maksymalnej wydajności odzysku DNA. Należy unikać dotykania ścianek minikolumny mikropipetą, aby nie przenosić śladów DNA pomiędzy kolejnymi minikolumnami.
 - o Do elucji większych fragmentów DNA (powyżej 5 kb) zwiększoną wydajność uzyska się stosując bufor elucyjny podgrzany do 80°C.
 - o Do elucji DNA zaleca się użycie buforu Elution, który sporządzono na bazie ultra-czystej wody ze śladowym dodatkiem czynnika buforującego. Bufor Elution pozwala na uzyskanie najwyższej wydajności elucji oraz nie interferuje z późniejszymi sekwencjonowaniem DNA, ligacją, trawieniem enzymami restrykcyjnymi oraz innymi aplikacjami biologii molekularnej.
 - o Możliwe jest zmniejszenie objętości elucyjnej poniżej 50 μ l (graniczna objętość 20 μ l), powoduje to jednak stopniowe obniżenie wydajności odzysku DNA.
9. Minikolumnę pozostawić na 1 min w temperaturze pokojowej.
10. Wirować minikolumnę przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
11. Usunąć minikolumnę, zamknąć probówkę. DNA jest gotowe do dalszych analiz/manipulacji, może być przechowywane w 2–8°C lub zamrożone w -20°C.

Środki ostrożności

Buffer A



Niebezpieczeństwo

H314 Powoduje poważne oparzenia skóry oraz uszkodzenia oczu.

H318 Powoduje poważne uszkodzenie oczu.

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

P260 Nie wdychać par/rozpylonej cieczy.

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 lekarzem.

Wash A1



Uwaga

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

H412 Działa szkodliwie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki.

P261 Unikać wdychania par/ rozpylonej cieczy.

P273 Unikać uwolnienia do środowiska.

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.

Orange A



Uwaga

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

H412 Działa szkodliwie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki.

P261 Unikać wdychania par/ rozpylonej cieczy.

P273 Unikać uwolnienia do środowiska.

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.

Wash AX2



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 utrzymania się działania drażniącego na oczy: Zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.

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

○ **GeneMATRIX Agarose-Out DNA Purification Kit pozwala na szybkie oczyszczenie liniowych lub kolistych cząsteczek DNA o wielkości od ok. 100 pz do ponad 10 kpz, rozdzielanych na TAE- lub TBE-żelu agarozowym.**

Zabarwiony bufor ułatwia śledzenie postępu rozpuszczania agarozy oraz jednoczesną pracę z wieloma próbkami. Poza usunięciem agarozy z próbki DNA efektywnie usuwane są zanieczyszczenia takie jak: bromek etydydy, RNA, nukleotydy, primery, znaczniki radioaktywne i nieradioaktywne, detergenty, związki buforowe, sole, EDTA, inhibitory restrykcji i ligacji DNA, barwniki, enzymy i inne białka. Dodanie specjalnego buforu wytwarza warunki do selektywnego wiązania DNA do membran GeneMATRIX. Podczas krótkiego wirowania następuje wiązanie DNA do membrany,

natomiast niezwiązana, rozpuszczona agarozą oraz inne zanieczyszczenia pozostają w wycieku z kolumny. Ich śladowe pozostałości na membranie są skutecznie usuwane w trakcie dwóch etapów płukania. Użyte złoże jest zaprojektowane pod kątem skutecznego usuwania inhibitorów restrykcji i ligacji DNA. 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.

○ **GeneMATRIX to syntetyczne membrany nowej generacji wiążące DNA i RNA, wykorzystujące selektywne właściwości wiązania kwasów nukleinowych przez kompozytowy SiO₂. W celu osiągnięcia wysokiej wydajności i czystości otrzymanych kwasów nukleinowych, opracowano wyspecjalizowane buforory wiążące i płuczające, projektowane pod kątem optymalnego wykorzystania właściwości nowych membran.**

Zastosowanie gotowych do użycia membran, umieszczonych w kolumnkach wirowniczych (ang. Spin-format) w połączeniu ze specjalną konstrukcją naszych minikolumn, istotnie poprawia jakość uzyskanego preparatu DNA lub RNA. Celem monitorowania kompletnego wymieszania roztworów oraz ułatwienia procedury izolacji DNA, część roztworów wyznakowano barwnikami.

W efekcie przekazujemy w Państwa ręce zestawy składające się z nowych złoży i buforów reakcyjnych, których użycie gwarantuje szybkie, proste, bezpieczne i jednocześnie wydajne otrzymanie ultraczystych

kwasów nukleinowych. Uzyskane DNA lub RNA nadaje się bezpośrednio do zastosowań w technikach biologii molekularnej, m.in.: trawienia enzymami restrykcyjnymi, defosforylacji/fosforylacji, ligacji, badań oddziaływania białko-DNA, sekwencjonowania, blottingu, translacji in vitro, otrzymywania cDNA, hybrydizacji. Dodatkową zaletą zestawów jest powtarzalność właściwości zarówno membran jak i buforów wiążących, ponieważ przygotowanie komponentów odbywa się w EURx sp. z o.o.



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

