

GeneMATRIX Cell Culture DNA Purification Kit

Zestaw do izolacji DNA z kultur komórek ludzkich i zwierzęcych

○ kat. nr. E3555

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
 Wyposażenie i odczynniki dostarczane przez użytkownika	3
Protokół.....	4
Środki ostrożności.....	5

Składniki zestawu	50 izolacji E3555-01	150 izolacji E3555-02	Warunki przechowywania
Buffer C	1.8 ml	5.4 ml	15-25°C
Lyse C	12 ml	36 ml	15-25°C
RNase A (10 mg/ml)	0.12 ml	0.36 ml	2-8°C
Proteinase K (20 mg/ml)	0.6 ml	1.8 ml	-20°C
Sol C	12 ml	36 ml	15-25°C
Wash CX1	30 ml	90 ml	15-25°C
Wash CX2	30 ml	90 ml	15-25°C
Elution	18 ml	54 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 szybkiej izolacji całkowitego DNA (genomowego i mitochondrialnego) z kultur komórek ludzkich i zwierzęcych.

UWAGA 2 • Maksymalna ilość użytego materiału. Ogólna pojemność minikolumny to 25 µg DNA. Maksymalna objętość płynu nanoszonego na minikolumnę to 700 µl. Jedna minikolumna pozwala na oczyszczenie DNA z maksymalnie 5×10^6 komórek. Przykładowa wydajność izolacji DNA z 2×10^6 komórek HeLa to 15 – 25 µg.

UWAGA 3 • Przechowywanie składników zestawu. Po rozpakowaniu, zestaw należy przechowywać w temperaturze pokojowej, za wyjątkiem Proteinazy K i RNazy A. RNazę A należy przechowywać w 2-8°C, natomiast Proteinazę K w -20°C.

UWAGA 4 • Dobra praktyka laboratoryjna. Wszelkie roztwory z zestawu do oczyszczania DNA należy przechowywać szczelnie zamknięte, aby uniknąć zmiany stężeń w wyniku parowania. Dla otrzymania DNA o wysokiej czystości istotne jest dokładne stosowanie się do zaleceń protokołu.

Wyposażenie i odczynniki dostarczane przez użytkownika

- Alkohol etylowy [96-100% v/v], mikrowirówka, rękawiczki, jałowe tipsy, jałowe probówki 1.5-2 ml. Blok grzejny pozwalający na inkubację próbki w temperaturze do 70°C.

Protokół

1. Dodać 30 µl buforu aktywacyjnego **Buffer C** do minikolumny (nie wirować). Pozostawić w temperaturze pokojowej do momentu naniesienia lizatu na minikolumnę.
 - o Dodanie buforu aktywacyjnego Buffer C 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. W probówce typu Eppendorf 1.5-2 ml zwirować hodowlę komórek (nie przekraczając 5×10^6 komórek) przez 2 min z prędkością 1 000 x g.
3. Ostrożnie wybrać supernatant znad osadu. Do osadu dodać 200 µl buforu **Lyse C** i 2 µl **RNase A**. Dokładnie zawiesić komórki przez worteksowanie (15 sekund).
4. Inkubować 5 min w temperaturze pokojowej.
5. Dodać 10 µl **Proteinase K** i 200 µl buforu **Sol C**. Dokładnie wymieszać przez worteksowanie próbówki.
6. Inkubować 10 min w 70°C.
7. Dodać 200 µl 96% etanolu.
8. Dokładnie wymieszać przez worteksowanie próbówki.
9. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
10. Przenieść całość lizatu do minikolumny, znajdującej się w probówce odbierającej.
11. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
 - o W przypadku niecałkowitego przesączenia lizatu przez złożę wirowanie należy kontynuować.
12. Wyjąć minikolumnę, wyłączyć przesącz i umieścić minikolumnę z powrotem w probówce odbierającej.
13. Dodać 500 µl buforu płuczącego **Wash CX1** do minikolumny i wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
14. Wyjąć minikolumnę, wyłączyć przesącz i umieścić minikolumnę z powrotem w probówce odbierającej.
15. Dodać 500 µl buforu płuczącego **Wash CX2** do minikolumny i wirować przez 2 min z prędkością 11 000 x g.
 - o Podczas wyjmowania minikolumny zwrócić szczególną uwagę aby nie zanieczyścić próbki buforem płuczącym. Jeżeli minikolumna nie jest całkowicie sucha, wyłączyć przesącz, umieścić ją w probówce i ponownie wirować przez 1 min.

16. Minikolumnę umieścić w nowej probówce typu Eppendorf 1.5-2 ml. Dodać 50-150 μ l buforu **Elution**.

o Dodanie buforu elującego centralnie na powierzchnię membrany zapewnia uzyskanie maksymalnej wydajności odzysku DNA. Należy unikać dotykania ścianek minikolumn mikropipetą, aby nie przynosić śladów DNA pomiędzy kolejnymi minikolumnami.

o W celu podniesienia wydajności odplukania z membran DNA genomowego można bufor Elution ogrzać do temp. 80°C.

o Do elucji DNA można używać:

- Buforu 5-10 mM Tris-HCl, pH 8.0-9.0
- Buforu TE, pH 8.0-9.0 (nie zalecany w przypadku sekwencjonowania DNA)
- Innych buforów do celów specjalnych, o pH i stężeniu soli zbliżonych do buforu 5-10 mM Tris-HCl, pH 8.0-9.0.

17. Minikolumnę pozostawić na 2 min w temperaturze pokojowej.

18. Wirować minikolumnę przez 1 min z prędkością 11 000 x g.

Opcjonalnie:

19. Powtórzyć elucję drugi raz jak opisano w punktach 16-18.

o Ten dodatkowy etap zwiększa wydajność izolacji DNA. Można użyć nowej próbówki, aby uniknąć rozcieńczenia pierwszego eluatu, bądź ponownie użyć próbówki z pierwszej elucji.

20. 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 C



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.

LyseC



Uwaga

H319 Działa drażniąco na oczy.

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.

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.

Sol C



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.

Wash CX1



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.



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 CX2

- **GeneMATRIX Cell Culture DNA Purification Kit jest przeznaczony do szybkiej izolacji całkowitego DNA (genomowego i mitochondrialnego) z kultur komórek ludzkich i zwierzęcych. Oczyszczone DNA nie zawiera zanieczyszczeń m.in. takich jak: RNA, białka, lipidy, barwniki, detergenty, organiczne inhibitory enzymów, związki buforowe, sole, kationy dwuwartościowe.**

Próbka poddawana jest lizie w obecności buforu zawierającego duże stężenia soli chaotropowych i Proteinazy K. Proteinaza K całkowicie degraduje białka komórkowe, w tym białka wiążące DNA i nukleazy. Dodanie etanolu wytwarza odpowiednie warunki do selektywnego wiązania DNA do złoża GeneMATRIX. Podczas krótkiego wirowania następuje wiązanie DNA do złoża, natomiast

niezwiązane zanieczyszczenia pozostają w wycieku z kolumny. Ich śladowe pozostałości są skutecznie usuwane ze złoża w trakcie dwóch etapów płukania. 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.

- **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 bufor wiążące i płuczące, 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 złożeń 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, hybrydyzacji. 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

