EURx® MOLECULAR BIOLOGY PRODUCTS

Wersja zestawu 1.4
Kwiecień 2019

GeneMATRIX Bone DNA Purification Kit

Zestaw do izolacji DNA z ludzkich i zwierzęcych kości

kat. nr. E3560

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

Wyposażenie i odczynniki dostarczane przez użytkownika **2**

Uwagi wstępne **3**

Protokół **3**

Środki ostrożności **5**

Składniki zestawu	25 izolacji E3560-01	50 izolacji E3560-02	Warunki przechowywania
Buffer BN	0.9 ml	1.8 ml	15-25°C
Lyse BN	24 ml	48 ml	15-25°C
Proteinase K (20 mg/ml)	1.2 ml	2.4 ml	–20°C
Sol BN	24 ml	48 ml	2-8°C
Wash BNX1	15 ml	30 ml	15-25°C
Wash BNX2	15 ml	30 ml	15-25°C
Elution	3 ml	6 ml	15-25°C
DNA Binding Columns	25 szt.	50 szt.	15-25°C
Screw cap tubes	25 szt.	50 szt.	15-25°C
Protokół	1	1	

Wyposażenie i odczynniki dostarczane przez użytkownika

- Sprzęt konieczny do rozdrobnienia i homogenizacji próbki kości. W zależności od wybranej metody: moździerz i ciekły azot lub mechaniczny młynek.
- Mikrowirówka, rękawiczki, pipety, jałowe tipsy, jałowe probówki 1.5-2 ml, blok grzejny pozwalający na inkubację próbki w temperaturze do 56°C.
- Alkohol etylowy [96-100% v/v].

Uwagi wstępne

UWAGA 1 · Przeznaczenie zestawu. Zestaw umożliwia izolację DNA z kości i zębów. Oczyszczone DNA, zarówno genomowe jak i mitochondrialne, może służyć jako matryca w reakcji PCR.

UWAGA 2 · Maksymalna ilość użytego materiału. Jedna minikolumna pozwala na oczyszczenie DNA z maksymalnie 0.4 g kości. Ogólna pojemność minikolumny to 25 µg DNA. Maksymalna objętość płynu nanoszonego na minikolumnę to 700 µl.

UWAGA 3 · Przechowywanie składników zestawu. Po rozpakowaniu, zestaw należy przechowywać w temperaturze pokojowej, za wyjątkiem buforu Sol BN i Proteinazy K. Bufor Sol BN 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.

Protokół

1. Usunąć ziemię oraz w miarę możliwości zewnętrzną warstwę (nalot) z kości.

   - *Ten etap pozwala na usunięcie zanieczyszczeń.*

   - *Do usunięcia warstwy zewnętrznej można użyć papieru ściernego lub wiertarko-frezarki precyzyjnej zaopatrzonej w tarcze szlifierskie.*

2. Zhomogenizować fragment kości w ciekłym azocie przy użyciu moździerza i tłuczka lub wyspecjalizowanego młynka (ang. freezer mill).

   - *Fragment kości należy zhomogenizować/rozbić jak najdrobniej, gdyż jest to etap decydujący o wydajności izolacji DNA.*

3. Umieścić maksymalnie 0.4 g rozdrobnionej kości w probówce 2 ml **screw cap tube** (probówki screw cap tubes wchodzą w skład zestawu).

4. Dodać 800 µl buforu **Lyse BN**. Dokładnie zawiesić próbkę przez odwracanie lub worteksowanie.

5. Dodać 40 µl **Proteinase K**. Wymieszać przez odwracanie lub worteksowanie.

6. Inkubować przez noc w 56°C.

   - *Inkubację można prowadzić w inkubatorze z wytrząsaniem, co umożliwia stałe mieszanie próbki i zwiększa wydajność izolowanego DNA.*

7. Dodać 30 µl buforu aktywacyjnego **Buffer BN** do minikolumny (nie wirować). Pozostawić w temperaturze pokojowej do momentu naniesienia lizatu na minikolumnę.

   - *Dodanie buforu aktywacyjnego Buffer BN centralnie na powierzchnię membran zapewnia kompletne nasączenie membran buforem aktywacyjnym i uzyskanie maksymalnej wydajności wiązania DNA.*

   - *Aktywację należy wykonać po nocnej inkubacji, przed dodaniem buforu Sol BN.*

8. Dodać 800 µl buforu **Sol BN**. Dokładnie wymieszać przez odwracanie lub worteksowanie. Inkubować 10 min w 56°C.

9. Wirować lizat przez 3 min z prędkością 12 000 x g.

10. Przenieść 1200 µl supernatantu do nowej probówki typu Eppendorf 2 ml.

11. Dodać 600 µl 96% etanolu. Dokładnie wymieszać przez odwracanie lub worteksowanie probówki.

12. Zwirować przez kilka sekund z prędkością 12 000 x g.

13. Przenieść 700 µl supernatantu do minikolumny wiążącej DNA, znajdującej się w probówce odbierającej. Wirować przez 30 sekund z prędkością 11 000 x g. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i umieścić minikolumnę z powrotem w probówce odbierającej.

14. Powtórzyć krok 13 procedury izolacji DNA.

15. Przenieść pozostałość supernatantu do minikolumny, znajdującej się w probówce odbierającej. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g celem przefiltrowania pozostałości lizatu przez złoże.

   - *Wirowanie należy kontynuować w przypadku niecałkowitego przefiltrowania lizatu przez złoże.*

16. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i umieścić minikolumnę z powrotem w probówce odbierającej.

17. Dodać 500 µl buforu płuczącego **Wash BNX1** do minikolumny i wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.

18. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i umieścić minikolumnę z powrotem w probówce odbierającej.

19. Dodać 500 µl buforu płuczącego **Wash BNX2** do minikolumny i wirować przez 2 min z prędkością 11 000 x g.

   - *Podczas wyjmowania minikolumny zwrócić szczególną uwagę aby nie zanieczyścić próbki buforem płuczącym. Jeżeli minikolumna nie jest całkowicie sucha, wylać przesącz, umieścić ją w probówce i ponownie wirować przez 1 min.*

20. Minikolumnę umieścić w nowej probówce typu Eppendorf 1.5-2 ml. Dodać 30-100 µl buforu **Elution**.

   - *Dodanie buforu eluującego centralnie na powierzchnię membrany zapewnia uzyskanie maksymalnej wydajności odzysku DNA. Należy unikać dotykania ścianek minikolumn mikropipetą, aby nie przenosić śladów DNA pomiędzy kolejnymi minikolumnami.*

   - *W celu podniesienia wydajności odpłukania z membran DNA genomowego można bufor Elution ogrzać do temp. 80°C.*

   - *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 sekwencjonownia DNA)*
     - *Innych buforów do celów specjalnych, o pH i stężeniu soli zbliżonych do buforu 5-10 mM Tris-HCl, pH 8.0-9.0.*

21. Minikolumnę pozostawić na 2 min w temperaturze pokojowej.

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

23. Usunąć minikolumnę, zamknąć probówkę. DNA jest gotowe do dalszych analiz/manipulacji.

Środki ostrożności

Buffer BN

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.

Lyse BN

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 zatruć/ lekarzem.

Sol BN

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 zatruć/ 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.
EUH032 W kontakcie z kwasami uwalnia bardzo toksyczne gazy.

Wash BNX1

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 zatruć/ 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 BNX2

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.

- ***GeneMATRIX Bone DNA Purification Kit jest przeznaczony do szybkiej izolacji DNA (genomowego i mitochondrialnego) z kości i zębów. Oczyszczone DNA nie zawiera inhibitorów enzymatycznych i może być bezpośrednio użyte do amplifikacji DNA metodą PCR.***

W trakcie izolacji DNA próbka poddana zostaje homogenizacji, a następnie lizie w obecności specjalnego buforu, który zapewnia integralność i ilościowy odzysk DNA. Proteinaza K całkowicie degraduje białka komórkowe, w tym kolagen-główne białko tkanki kostnej. Następnie DNA zawarte w lizacie jest wiązane do minikolumny w obecności buforu zawierającego sole chaotropowe i etanolu. Zanieczyszczenia związane do złoża są skutecznie usuwane 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 SiO_2 .W celu osiągnięcia wysokiej wydajności i czystości otrzymanych kwasów nukleinowych, opracowano wyspecjalizowane bufory wiążące i płuczące, projektowane pod kątem optymalnego wykorzystania właściwości nowych membran.**

Zastosowanie gotowych do użycia membran, umieszczonych w kolumienkach 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 złóż 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®
MOLECULAR
BIOLOGY
PRODUCTS

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