

## GeneMATRIX Stool DNA Purification Kit

Zestaw do izolacji DNA z kału

● **kat. nr. E3575**

EURx Ltd. 80-297 Gdansk Poland  
ul. Przyrodników 3, NIP 957-07-05-191  
KRS 0000202039, [www.eurx.com.pl](http://www.eurx.com.pl)  
orders: email: [orders@eurx.com.pl](mailto:orders@eurx.com.pl)  
tel. +48 58 524 06 97, fax +48 58 341 74 23





## Spis treści

<b>Uwagi wstępne.....</b>	<b>3</b>
<b>Wyposażenie i odczynniki dostarczane przez użytkownika .....</b>	<b>3</b>
<b>Protokół.....</b>	<b>4</b>
<b>Środki ostrożności.....</b>	<b>6</b>

<b>Składniki zestawu</b>	<b>50 izolacji E3575-01</b>	<b>100 izolacji E3575-02</b>	<b>Warunki przechowywania</b>
Buffer ST	1.8 ml	3.6 ml	15-25°C
Lyse ST	3.6 ml	7.2 ml	15-25°C
PR	24 ml	48 ml	2-8°C
Sol ST	39 ml	78 ml	15-25°C
Wash STX	60 ml	120 ml	15-25°C
Elution	12 ml	24 ml	15-25°C
DNA Binding Columns	50 szt.	2 x 50 szt.	15-25°C
Bead Tube	50 szt.	2 x 50 szt.	15-25°C
Protokół	1	1	

# Uwagi wstępne

**UWAGA 1 • Przeznaczenie zestawu.** Zestaw umożliwia szybką izolację całkowitego DNA ze świeżego lub zamrożonego kału. Oczyszczone DNA nie zawiera inhibitorów (występujących w dużej ilości w kale) i może być bezpośrednio użyte do amplifikacji DNA metodą PCR.

**UWAGA 2 • Maksymalna ilość użytego materiału.** Jedna minikolumna pozwala na oczyszczenie DNA z maksymalnie 200 mg kału. Ogólna pojemność minikolumny to 25 µg DNA. Maksymalna objętość płynu nanoszonego na minikolumnę to 700 µl.

**UWAGA 3 • Przechowywanie składników zestawu.** Po rozpakowaniu, składniki zestawu należy przechowywać w temperaturze pokojowej, za wyjątkiem buforu PR który 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 wymyc z kolumnki z użyciem Tris-HCl, wody lub TE.

## Wyposażenie i odczynniki dostarczane przez użytkownika

- Mikrowirówka, rękawiczki, pipety, jałowe tipsy, jałowe probówki 1.5-2 ml.
- Worteks 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). Blok grzejny pozwalający na inkubację próbki w temperaturze do 70°C.
- Alkohol etylowy 96-100%.

# Protokół

1. Dodać 30 µl buforu aktywacyjnego **Buffer ST** do minikolumny wiążącej DNA (**DNA binding spin-column**). Pozostawić w temperaturze pokojowej (nie wirować) do momentu naniesienia lizatu na minikolumnę.
  - o Dodanie buforu aktywacyjnego Buffer ST 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. Dodać maksymalnie 200 mg próbki kału do próbówki **Bead Tube**.
  - o Probówka Bead Tube zawiera 750 µl roztworu i kulki szklane umożliwiające dokładne zawieszenie i liżę próbki kału.
3. Energicznie wymieszać przez odwracanie do momentu oderwania próbki kału od ścianki próbówki i zawieszenia w buforze z kulkami szklanymi.
4. Dodać 60 µl buforu **Lyse ST**.
  - o Komponenty buforu Lyse ST mogą tworzyć precypitat w temperaturze poniżej 20°C. W przypadku pojawienia się precypitatu, roztwór należy podgrzać w temperaturze 37°C, aż do całkowitego wyklarowania.
5. Worteksować przez 1 min.
6. Inkubować 5 min w 70°C.
7. Probówki **Bead Tubes** przymocować do worteksu w pozycji horyzontalnej. Użyć w tym celu specjalnego adaptera lub alternatywnie przymocować próbówki za pomocą mocnej taśmy klejącej. Worteksować przez 10 min z maksymalną prędkością.
  - o W przypadku użycia taśmy klejącej należy zwracać uwagę, aby próbówki były ściśle i mocno przyklejone do worteksu w celu efektywnego wytrząsania probówek.
  - o Do wytrząsania probówek Bead Tubes można użyć wyspecjalizowanych przyrządów, nazywanych ang. "bead beater" lub "cell disrupter". W tym wypadku wymagana jest optymalizacja czasu wytrząsania.
8. Wirować przez 2 min z prędkością 12 000 x g. Przenieść 400 µl supernatantu do nowej próbówki typu Eppendorf 2 ml.
9. Dodać 400 µl buforu **PR**. Worteksować przez 5 sekund i inkubować przez 5 min w lodzie (0-4°C).
  - o Bufor PR umożliwia precypitację organicznych i nieorganicznych substancji, m.in: białek, pozostałości komórkowych, inhibitorów enzymatycznych.

10. Wirować przez 2 min z prędkością 12 000 x g.
11. Przenieść 550 µl supernatantu do nowej probówki typu Eppendorf 2 ml.
- W przypadku, gdy niemożliwe jest wybranie znad osadu 550 µl supernatantu należy wybrać mniejszą objętość supernatantu, a w kolejnych etapach izolacji dodać proporcjonalnie mniej buforu Sol ST i etanolu.
12. Dodać 650 µl buforu **Sol ST**.
13. Dodać 400 µl 96 % etanolu i dokładnie wymieszać przez odwracanie.
14. Zwirować przez kilka sekund z prędkością 11 000 x g.
15. Przenieść 700 µl supernatantu do minikolumny wiążącej DNA, znajdującej się w probówce odbierającej. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i umieścić minikolumnę z powrotem w probówce odbierającej.
16. Powtórzyć krok 15 procedury izolacji DNA.
17. 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 złożo.
- Wirowanie należy kontynuować w przypadku niecałkowitego przefiltrowania lizatu przez złożo.
18. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i umieścić minikolumnę z powrotem w probówce odbierającej.
19. Dodać 500 µl buforu płuczącego **Wash STX** do minikolumny i wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
20. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i umieścić minikolumnę z powrotem w probówce odbierającej.
21. Dodać 500 µl buforu płuczącego **Wash STX** 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.
22. Minikolumnę umieścić w nowej probówce typu Eppendorf 1.5-2 ml. Dodać 50-100 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.



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.

23. Minikolumnę pozostawić na 2 min w temperaturze pokojowej.

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

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

## Środki ostrożności

### Buffer ST



#### 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.

### Sol ST



#### 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 STX



#### 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 Stool DNA Purification Kit jest przeznaczony do szybkiej izolacji całkowitego DNA ze świeżego lub zamrożonego kału. Oczyszczone DNA nie zawiera inhibitorów enzymatycznych (występujących w dużej ilości w kale) i może być bezpośrednio użyte do amplifikacji DNA metodą PCR.**

Próbkę kału umieszcza się w próbówce zawierającej kulki szklane i specjalny bufor, które umożliwiają kompletne zawieszenie i lizę próbki. Liza komórek ludzkich (zwierzęcych) i mikroorganizmów następuje na skutek: działania sił mechanicznych i podwyższonej temperatury towarzyszących wytrząsaniu kulek szklanych oraz działania detergentu zawartego w buforze do lizy. Dodanie wyspecjalizowanego roztworu umożliwia precypitację pozostałości komórkowych, białek i inhibitorów enzymatycznych.

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  $\text{SiO}_2$ . 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 złoż 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](http://www.eurx.com.pl)  
orders: email: [orders@eurx.com.pl](mailto:orders@eurx.com.pl)  
tel. +48 58 524 06 97, fax +48 58 341 74 23

