

## GeneMATRIX Bacterial & Yeast Genomic DNA Purification Kit

Uniwersalny zestaw do oczyszczania DNA  
z bakterii Gram+ , Gram- oraz drożdży

● **kat. nr. E3580**

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



# 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>Część I Aktywacja minikolumn wiążących DNA.....</b>	<b>4</b>
<b>Część II Przygotowanie materiału.....</b>	<b>4</b>
<b>Bakterie .....</b>	<b>4</b>
<b>Drożdże.....</b>	<b>5</b>
<b>Część III Izolacja DNA.....</b>	<b>5</b>
<b>Dodatek .....</b>	<b>7</b>
<b>Protokół oczyszczania DNA genomowego i plazmidowego z drożdży.....</b>	<b>7</b>
<b>Środki ostrożności.....</b>	<b>9</b>

<b>Składniki zestawu</b>	<b>50 izolacji E3580-01</b>	<b>150 izolacji E3580-02</b>	<b>Warunki przechowywania</b>
Buffer BG	1.8 ml	5.4 ml	15-25°C
Lyse BG	33 ml	100 ml	15-25°C
BL*	3 ml	9 ml	-20°C
RNase A (10 mg/ml)	0.12 ml	0.36 ml	2-8°C
Proteinase K (20 mg/ml)	0,9 ml	2,7 ml	-20°C
Sol BG	21 ml	63 ml	15-25°C
Wash BGX	55 ml	165 ml	15-25°C
Elution	6 ml	18 ml	15-25°C
DNA Binding Columns	50 szt.	3 x 50 szt.	2-8°C
Protokół	1	1	

\* Bufor BL zawiera lizozym (20 mg/ml).

# Uwagi wstępne

**UWAGA 1 • Przeznaczenie zestawu.** Zestaw jest przeznaczony do izolacji DNA z bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych oraz różnorodnych gatunków drożdży. Niektóre gatunki bakterii Gram+ posiadają ścianę komórkową wyjątkowo oporną na lizę. Poza lizozymem należy wówczas dodatkowo zastosować odpowiedni enzym (np. lizostafinę w przypadku *Staphylococcus* spp.). W celu wydajnej lizy komórek drożdżowych należy stosować odpowiednie enzymy: litykazę lub zymolazę.

**UWAGA 2 • Maksymalna ilość użytego materiału.** Maksymalna pojemność minikolumny to 25 µg DNA. Najwyższej jakości DNA uzyskuje się z hodowli bakteryjnych znajdujących się w fazie logarytmicznej wzrostu lub wczesnej fazie stacjonarnej. Ze względu na duże różnice w tempie wzrostu i wielkości komórek różnych rodzajów bakterii gram-dodatnich oraz drożdży, należy empirycznie ustalić optymalną objętość zwirowanej hodowli. Ogólnie masa osadu po zwirowaniu nie powinna przekraczać 50 mg a objętość hodowli przypadająca na jeden prep 1,0 ml. Nie należy używać więcej niż  $1 \times 10^9$  komórek drożdżowych na jeden prep. W przypadku zbyt dużej lepkości lizatu i zapychania się minikolumny należy zmniejszyć ilość początkową osadu (bakterii, drożdży) użytą do izolacji.

**UWAGA 3 • Przechowywanie komponentów zestawu.** Po rozpakowaniu, zestaw do oczyszczania DNA genomowego należy przechowywać w temperaturze pokojowej, za wyjątkiem roztworu BL (zawiera lizozym), oraz Proteinazy K które należy przechowywać w  $-20^{\circ}\text{C}$ . RNase A oraz kolumnienki wiążące należy przechowywać w  $2-8^{\circ}\text{C}$ .

**UWAGA 4 • Dodatkowe zalecenia.** W celu zwiększenia wydajności izolacji DNA z bakterii opornych na lizę komórki (np. bakterii Gram +) można zastosować jedną lub więcej wymienionych uwag: przedłużenie czasu inkubacji z buforem BL (Część II Bakterie pkt 3) do 30 min, przedłużenie czasu inkubacji z Proteinazą K (Część III pkt 6) do 60 min, zwiększenie temperatury inkubacji z buforem Sol BG do  $70^{\circ}\text{C}$  (Część III pkt 8).

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

## Wyposażenie i odczynniki dostarczane przez użytkownika

1. Mikrowirówka, rękawiczki, pipety, jałowe tipsy, jałowe probówki 1.5–2 ml, blok grzejny pozwalający na inkubację próbek w temperaturze z zakresu  $30-55^{\circ}\text{C}$ .
2. W przypadku jednoczesnej izolacji genomowego i plazmidowego DNA z drożdży (Dodatek strona 7) – alkohol etylowy 96–100%.
3. Do protokołu z drożdży –  $\beta$ -merkaptoetanol (14.3 M,  $\beta$ -ME).

# Protokół

## Część I Aktywacja minikolumn wiążących DNA

1. Dodać 30 µl buforu aktywacyjnego **Buffer BG** do minikolumny (nie wirować). Pozostawić w temperaturze pokojowej do momentu naniesienia lizatu (pkt 12) na minikolumnę.
  - o *Dodanie buforu aktywacyjnego Buffer BG 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.*

## Część II Przygotowanie materiału

### Bakterie

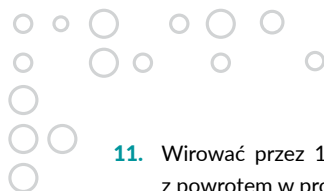
1. W probówce 1.5 ml typu Eppendorf zmieszać (do wyboru jeden z wariantów):
  - A. 100 µl hodowli bakteryjnej oraz 200 µl buforu **Lyse BG**.
  - B. Pobrać eżą kolonię bakteryjną z płytki Petriego lub skosu i zawiesić w 300 µl buforu **Lyse BG**.
  - C. Zwirować 0.1-1.5 ml hodowli bakteryjnej, dokładnie usunąć supernatant i zawiesić osad w 300 µl buforu **Lyse BG**.
  - o *Dokładne zawieszenie bakterii jest niezbędne do oczyszczenia DNA z wysoką wydajnością.*
  - o *Najwyższej jakości DNA uzyskuje się z hodowli bakteryjnych znajdujących się w fazie logarytmicznej wzrostu lub wczesnej fazie stacjonarnej.*
2. Dodać 50 µl roztworu **BL** oraz 2 µl **RNase A** do zawiesiny komórek (punkt 1) i dokładnie wymieszać przez kilkukrotne odwracanie lub worteksować 2 sek.
  - o *W przypadku bakterii Gram+ posiadających ścianę komórkową wyjątkowo oporną na lizę, poza roztworem BL należy dodać odpowiedni enzym (np. lizostafyna dla Staphylococcus spp.).*
3. Inkubować 15 min w 37°C.
  - o *bakterie odporne na lizę - patrz Uwaga 4.*
4. Prześć do punktu 5. części III protokołu izolacji DNA.

## Drożdże

1. Zwirować odpowiednią ilość hodowli drożdży, tak aby masa osadu komórek nie przekraczała 50 mg. Dokładnie usunąć supernatant i zawiesić osad w 300  $\mu$ l buforu **Lyse BG**.
  - o Dokładne zawieszenie drożdży jest niezbędne do oczyszczania DNA z wysoką wydajnością.
  - o Ze względu na duże różnice w tempie wzrostu i wielkości komórek różnych szczepów drożdży, należy empirycznie ustalić optymalną objętość zwirowanej hodowli, tak aby nie przekraczać 50 mg masy osadu drożdżowego przypadającego na jedną kolumnienkę. Nie należy używać więcej niż  $1 \times 10^9$  komórek drożdżowych na jeden prep.
  - o W przypadku drożdży, przed użyciem Lyse BG do 1 ml dodać 1  $\mu$ l  $\beta$ -merkaptoetanolu ( $\beta$ -ME). Po dodaniu  $\beta$ -ME Lyse BG jest stabilny przez 1 miesiąc.
2. Wirować z prędkością 11 000 x g przez 1 min, dokładnie usunąć supernatant i ponownie zawiesić w 250  $\mu$ l buforu **Lyse BG**.
3. Dodać odpowiedni enzym np.: litykazę. Dodać również 2  $\mu$ l **RNase A**. Dokładnie wymieszać. Inkubować 30 min w 30°C.
  - o 50 U litykazy/zymolazy na  $1 \times 10^7$  komórek. Objętość dodanego enzymu nie powinna przekroczyć 50  $\mu$ l.
4. Przejdź do punktu 5. części III protokołu izolacji DNA.

## Część III Izolacja DNA

5. Dodać 15  $\mu$ l Proteiny K do zawiesiny komórek i dokładnie wymieszać poprzez kilkukrotne odwracanie probówki lub worteksować 3 sek.
6. Inkubować 30 min w 55°C.
  - o Wymieszać podczas inkubacji kilkukrotnie przez obrócenie probówki.
  - o bakterie odporne na lizę - patrz Uwaga 4.
7. Dodać 350  $\mu$ l buforu **Sol BG** i dokładnie wymieszać poprzez kilkukrotne odwracanie probówki lub worteksować 3 sek.
8. Inkubować 5 min w 55°C.
  - o bakterie odporne na lizę - patrz Uwaga 4.
9. Worteksować 15 sek.
10. Lizat wirować w mikrowirówce przez 2 min z prędkością 11 000 x g, a następnie przenieść maksymalnie 750  $\mu$ l klarownego supernatantu do kolumnienki wiążącej.

- 
11. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g. Wylać przesącz i umieścić minikolumnę z powrotem w próbówce odbierającej.
  12. Przenieść pozostałość supernatantu (jeżeli pozostał) do tej samej kolumnki wiążącej. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g. Wylać przesącz.
  13. Dodać 600 µl buforu płuczącego **Wash BGX** do minikolumny. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i umieścić minikolumnę z powrotem w próbówce odbierającej.
  14. Dodać 300 µl buforu płuczącego **Wash BGX** do minikolumny. 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 próbówce i ponownie wirować przez 1 min.
  15. Minikolumnę umieścić w nowej próbówce typu Eppendorf 1.5-2 ml. Dodać 100 µl buforu **Elution** ogrzanego do 80°C.
    - 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.
  16. Minikolumnę pozostawić na 2 min w temperaturze pokojowej.
  17. Wirować minikolumnę przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
  18. Usunąć minikolumnę, zamknąć próbkę. DNA jest gotowe do dalszych analiz/manipulacji, może być przechowywane w 2-8°C lub zamrożone w -20°C (należy unikać wielokrotnego zamrażania i rozmrażania DNA).

# Dodatek

## Protokół oczyszczania DNA genomowego i plazmidowego z drożdży

- Protokół jest przeznaczony do jednoczesnej izolacji DNA genomowego oraz plazmidowego z drożdży.
  - W celu wydajnej lizy komórek drożdżowych należy stosować odpowiedni enzym np.: litykazę.
1. Dodać 30 µl buforu aktywacyjnego **Buffer BG** do minikolumny (nie wirować). Pozostawić w temperaturze pokojowej do momentu naniesienia lizatu (pkt 12) na minikolumnę.
    - Dodanie buforu aktywacyjnego Buffer BG centralnie na powierzchnię membran zapewnia kompletne nasączenie membran buforem aktywacyjnym i uzyskanie maksymalnej wydajności wiązania DNA.
    - Aktywację należy wykonać przed rozpoczęciem procedury izolacji DNA.
  2. Zwirować odpowiednią ilość hodowli drożdży, tak aby masa osadu komórek nie przekraczała 50 mg. Dokładnie usunąć supernatant i zawiesić osad w 300 µl buforu **Lyse BG**.
    - Dokładne zawieszenie drożdży jest niezbędne do oczyszczania DNA z wysoką wydajnością.
    - Ze względu na duże różnice w tempie wzrostu i wielkości komórek różnych szczepów drożdży, należy empirycznie ustalić optymalną objętość zwirowanej hodowli, tak aby nie przekraczała 50 mg masy osadu drożdżowego przypadającego na jedną kolumnkę. Nie należy używać więcej niż  $1 \times 10^9$  komórek drożdżowych na jeden prep.
    - Uwaga 3: W przypadku drożdży, przed użyciem Lyse BG do 1 ml dodać 1 µl β-merkaptoetanolu (β-ME). Po dodaniu β-ME Lyse BG jest stabilny przez 1 miesiąc.
  3. Wirować z prędkością 11 000 x g przez 1 min, dokładnie usunąć supernatant i ponownie zawiesić w 225 µl buforu **Lyse BG**.
  4. Dodać odpowiedni enzym np.: litykazę. Dodać również 2 µl **RNase A**. Dokładnie wymieszać. Inkubować 30 min w 30°C.
    - 50 U litykazy/zymolazy na  $1 \times 10^7$  komórek. Objętość dodanego enzymu nie powinna przekroczyć 50 µl.
  5. Dodać 15 µl Proteiny K do zawiesiny komórek i dokładnie wymieszać poprzez kilkukrotne odwracanie próbki lub worteksować 3 sek.
  6. Inkubować 30 min w 55°C.
  7. Dodać 225 µl buforu **Sol BG** i dokładnie wymieszać poprzez kilkukrotne odwracanie próbki lub worteksować 3 sek.
  8. Inkubować 5 min w 55°C.
-

9. Wortexsować 15 sek.
10. Lizat wirować w mikrowirówce przez 2 min z prędkością 11 000 x g, a następnie przenieść klarowny supernatant do nowej próbówki 2 ml.
11. Dodać 250 µl alkoholu etylowego (96-100%) i dokładnie wymieszać przez wortexsowanie.
  - o *Po dodaniu etanolu może strącić się osad.*
12. Przenieść maksymalnie 700 µl mieszaniny do kolumnienki wiążącej umieszczonej w próbówce odbierającej. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g. Wylać przesącz.
13. Przenieść pozostałość mieszaniny do tej samej kolumnienki wiążącej. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g. Wylać przesącz.
14. Dodać 600 µl buforu płuczącego **Wash BGX** do minikolumny. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
15. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i umieścić minikolumnę z powrotem w próbówce odbierającej.
16. Dodać 300 µl buforu płuczącego **Wash BGX** do minikolumny. 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, wylać przesącz, umieścić ją w próbówce i ponownie wirować przez 1 min.*
17. Minikolumnę umieścić w nowej próbówce typu Eppendorf 1.5-2 ml. Dodać 100 µl buforu **Elution** ogrzanego do 80°C.
  - o *Dodanie buforu elującego centralnie na powierzchnię membrany zapewnia uzyskanie maksymalnej wydajności odzysku DNA. Należy unikać dotykania ścianek minikolumn mikropipetą, aby nie przenosić śladów DNA pomiędzy kolejnymi minikolumnami.*
18. Minikolumnę pozostawić na 2 min w temperaturze pokojowej.
19. Wirować minikolumnę przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
20. Usunąć minikolumnę, zamknąć próbówkę. DNA jest gotowe do dalszych analiz/manipulacji, może być przechowywane w 2-8°C lub zamrożone w -20°C (należy unikać wielokrotnego zamrażania i rozmrażania DNA).



# Środki ostrożności

## Buffer BG



### 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 BG



### 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 BG



### 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 dihydrochlorok etylenodiaminy. Może powodować wystąpienie reakcji alergicznej.

## Wash BGX



### 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 Bacterial & Yeast Genomic DNA Purification Kit jest przeznaczony do szybkiej izolacji genomowego DNA z różnorodnych grup fizjologicznych bakterii oraz różnorodnych gatunków i szczepów drożdży.**

Oczyszczony DNA nie zawiera zanieczyszczeń m.in. takich jak: RNA, białka, lipidy, barwniki, detergenty, organiczne inhibitory enzymów, związki buforowe, sole, kationy dwuwartościowe. Próbkę poddana zostaje lizie w obecności specjalnego buforu, naruszającego strukturę ściany komórkowej oraz lizozymu lub w przypadku drożdży litykazy. Proteinaza K degradowa białka komórkowe oraz uwalnia genomowe DNA z wiążących je białek oraz eliminuje nukleazy komórkowe. Dodanie specjalnego buforu wytwarza warunki do selektywnego wiązania

DNA do membrany GeneMATRIX. Podczas krótkiego wirowania następuje wiązanie DNA do membrany, natomiast niezwiązane zanieczyszczenia pozostają w wycieku z kolumny. Ich śladowe pozostałości na membranie 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 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  $\text{SiO}_2$ . W celu osiągnięcia wysokiej wydajności i czystości otrzymanych kwasów nukleinowych, opracowano wyspecjalizowane bufony 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 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 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

