

GeneMATRIX Tick RNA/DNA Purification Kit

Uniwersalny zestaw do izolacji całkowitego RNA i DNA z kleszczy.

● **kat. nr. E3590**

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	4
Protokół.....	5
Część I Czynności wstępne.....	5
Część II Homogenizacja materiału i izolacja RNA/DNA	6
Środki ostrożności.....	8

Uwagi wstępne

UWAGA 1 • Przeznaczenie zestawu. Zestaw jest przeznaczony do jednoczesnej izolacji całkowitego RNA i DNA wirusowego. Zestaw, dzięki wykorzystaniu Tissue Grinding Tool ze specjalnym złożem ścierającym, umożliwi izolację RNA/DNA z drobnych pajęczaków i owadów.

UWAGA 2 • Maksymalna ilość użytego materiału. Jedną izolację należy wykonywać z jednego kleszcza/owada ścierając go za pomocą Tissue Grinding Tool po dodaniu buforu Sol V.

UWAGA 3 • Przechowywanie próbek. Po zebraniu, kleszcze/owady mogą być przechowywane do 48 godzin w temperaturze 2-8°C. W przypadku dłuższego przechowywania próbki należy zamrozić w -20°C lub -80°C. Właściwym materiałem do izolacji są próbki, które były rozmrożone tylko jeden raz.

UWAGA 4 • Nośnikowe RNA (Carrier RNA). Dodatek nośnikowego RNA zwiększa wydajność wiązania wirusowych kwasów nukleinowych do membran. Jest to ważne, szczególnie w przypadkach gdy próbka zawiera niewielkie ilości docelowego materiału genetycznego. Dodatkowo, wprowadzenie dużej ilości nośnikowego RNA zmniejsza prawdopodobieństwo degradacji wirusowych kwasów nukleinowych. W zestawie na 25 izolacji dołączony liofilizat nośnikowego RNA należy zawiesić w 150 µl wody wolnej od RNaz otrzymując stężenie 1 µg/µl.

UWAGA 5 • Wydajność izolacji. Ilość wirusowych kwasów nukleinowych wyizolowanych z próbek biologicznych jest zwykle poniżej 1 µg i nie nadaje się do pomiaru spektrofotometrycznego. W przypadku ilościowej oceny kwasów nukleinowych otrzymanych przy użyciu poniższego protokołu należy pamiętać, że w próbce jest więcej nośnikowego RNA niż wirusowego RNA/DNA.

UWAGA 6 • Kontrola wewnętrzna. Niektóre komercyjnie dostępne systemy amplifikacji lub procedury walidacyjne wymagają stosowania kontroli wewnętrznej. W takich przypadkach kontrolne DNA/RNA powinno być dodane razem z RNA nośnikowym do buforu lizującego.

UWAGA 7 • Dodatkowe zalecenia. W celu uniknięcia krzyżowego zanieczyszczenia próbek podczas izolacji i wirowania należy zwracać szczególną uwagę, aby nie zmoczyć brzegu kolumnienki podczas każdorazowego nanoszenia lizatu i buforów płuczających.

UWAGA 8 • Przechowywanie składników zestawu. Po rozpakowaniu składniki zestawu należy przechowywać w temperaturze pokojowej, za wyjątkiem Proteiny K, którą należy przechowywać w -20°C.

UWAGA 9 • Dobra praktyka laboratoryjna. Wszystkie roztwory z zestawu do oczyszczania RNA/DNA należy przechowywać szczelnie zamknięte, aby uniknąć zmiany stężeń w wyniku parowania.

Składniki zestawu	25 izolacji E3590-01	Warunki przechowywania
Buffer A	0.75 ml	15-25°C
Sol V	6.5 ml	15-25°C
Wash V1	15 ml	15-25°C
Wash RBW	15 ml	15-25°C
Proteinase K (20 mg/ml)	0.6 ml	-20°C
RNase-free water	4.5 ml	15-25°C
Carrier RNA	150 µg*	15-25°C
DNA/RNA Binding Columns	25 szt.	15-25°C
Homogenization columns	25 szt.	15-25°C
Tissue Grinding Tool	25 szt.	15-25°C
Protokół	1	

* Dołączony liofilizat nośnikowego RNA należy zawiesić w 150 µl wody wolnej od RNaz otrzymując stężenie 1 µg/µl.

Wyposażenie i odczynniki dostarczane przez użytkownika

- Mikrowirówka, rękawiczki, pipety, jałowe tipsy, jałowe probówki 1.5-2 ml, blok grzejny pozwalający na inkubację próbki w temperaturze 60°C, wortex.
- Alkohol etylowy 96-100% i 0.9% NaCl lub PBS.

Protokół

Część I Czynności wstępne

Rozpuścić nośnikowe RNA (**Carrier RNA**). W zestawie na 25 izolacji dołączony liofilizat nośnikowego RNA należy zawiesić w 150 µl wody wolnej od RNaz otrzymując stężenie 1 µg/µl. Wymieszać dokładnie przez pipetowanie. Zawieszono nośnikowe RNA podzielić na porcje i przechowywać w -20°C. Unikać rozmrażania/zamrażania porcji więcej niż 3 razy. Używać 5 µl (5 µg) nośnikowego RNA na jedną izolację.

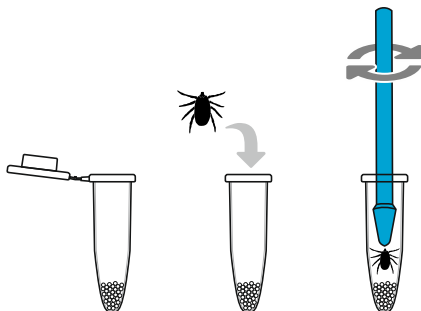
Wszystkie wirowania należy wykonywać w temperaturze pokojowej.

1. Dodać 25 µl buforu aktywacyjnego **Buffer A** do **minikolumny wiążącej DNA** (nie wirować). Pozostawić w temperaturze pokojowej do momentu naniesienia lizatu na minikolumnę.
 - o *Dodanie buforu aktywacyjnego Buffer A centralnie na powierzchnię membran zapewnia kompletne nasączenie membran buforem aktywacyjnym i uzyskanie maksymalnej wydajności wiązania DNA/RNA.*
 - o *Aktywację należy wykonać przed rozpoczęciem procedury izolacji DNA/RNA.*
2. Próbkę doprowadzić do temperatury pokojowej.
3. Osadzić złoże ścierające na dole próbki poprzez krótkie zwirowanie.
4. Dodać 5 µl roztworu nośnikowego RNA do 215 µl buforu **Sol V**.
 - o *Nośnikowe RNA nie rozpuszcza się bezpośrednio w buforze Sol V. Przed dodaniem do buforu Sol V musi być rozpuszczone w wodzie wolnej od RNaz.*
 - o *Podana proporcja dotyczy jednej izolacji. Można przygotować większą objętość mieszaniny zgodnie z ilością przeprowadzanych izolacji.*

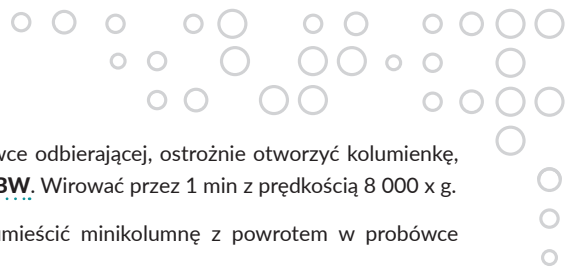
Część II Homogenizacja materiału i izolacja DNA/RNA

1. Do probówki ze złożem ścierającym dodać 220 μl **Sol V** (z dodanym nośnikowym RNA, patrz „Czynności wstępne”). Następnie dodać materiał (pajęczak/owad) i rozetrzeć obracając patyczkiem.

o W przypadku, gdy pajęczak/owad jest bardzo mały (np. kleszcz pospolity) rozcieranie lepiej rozpocząć w mniejszej objętości Sol V (np. 50 μl) i stopniowo dopełnić objętość Sol V do 220 μl .



2. Wyjąć patyczek, dodać 200 μl 0.9% NaCl lub PBS i 20 μl Proteinyazy K. Wortexować kilka sekund, bądź dokładnie wymieszać przez odwracanie probówki.
3. Inkubować 30 min w 60°C.
4. Przenieść zawartość probówki razem ze złożem ścierającym do kolumnki filtracyjnej umieszczonej w probówce odbierającej.
 - o Przechylić probówkę i przelać zawartość do kolumnki filtracyjnej. Podczas wirowania lizat zostanie przesączony i dodatkowo zhomogenizowany.
5. Wirować przez 1 min z prędkością 10 000 x g.
6. Usunąć kolumnkę filtracyjną. Dokładnie wymieszać przesącz przez pipetowanie, zawieszając również osad jeżeli powstał podczas wirowania. Dodać 500 μl **96-100% alkoholu etylowego** i ponownie wymieszać.
7. Przenieść 600 μl mieszaniny do **kolumnki wiążącej** umieszczonej w probówce odbierającej. Wirować przez 1 min z prędkością 8 000 x g. Wylać przesącz.
8. Przenieść resztę mieszaniny do **kolumnki wiążącej** umieszczonej w probówce odbierającej. Wirować przez 1 min z prędkością 8 000 x g. Przesącz usunąć.
9. Dodać 500 μl buforu płuczającego **Wash V1** do minikolumny. Wirować przez 1 min z prędkością 8 000 x g. Przesącz usunąć.

- 
10. Umieścić minikolumnę w nowej probówce odbierającej, ostrożnie otworzyć kolumnkę, dodać 500 µl buforu płuczącego **Wash RBW**. Wirować przez 1 min z prędkością 8 000 x g.
 11. Wyjąć minikolumnę, wyłączyć przesącz i umieścić minikolumnę z powrotem w probówce odbierającej.
 - 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.
 12. Wirować przez 2 min z maksymalną prędkością w celu usunięcia resztek buforu płuczącego.
 13. Minikolumnę umieścić w nowej probówce typu Eppendorf 1.5-2 ml. Ostrożnie otworzyć i dodać 50-100 µl wody RNase-free centralnie na membranę.
 - Dodanie wody centralnie na powierzchnię membrany zapewnia uzyskanie maksymalnej wydajności odzysku DNA. Należy unikać dotykania ścianek minikolumny mikropipetą, aby nie przenosić śladów RNA/DNA pomiędzy kolejnymi minikolumnami.
 14. Minikolumnę pozostawić na 1 min w temperaturze pokojowej, następnie wirować przez 2 min z maksymalną prędkością.
 15. Usunąć minikolumnę, zamknąć probówkę. RNA/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 RNA/DNA).

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 RBW



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.

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 V



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

P302+P352 W przypadku kontaktu ze skórą: umyć dużą ilością wody.

P332+P313 W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry: zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.

Wash V1

Uwaga

H226 Łatwopalna ciecz i pary.

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.



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

P302+P352 W przypadku kontaktu ze skórą: umyć dużą ilością wody.

P332+P313 W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry: zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.

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.



**DOBÓR ZESTAWU
W ZALEŻNOŚCI OD RODZAJU
IZOLOWANEGO MATERIAŁU**

		IZOLACJA RNA							
		E3700	E3594	E3596	E3598	E3599	E3593		
		RNA EXTRA COL. ¹	UNIVERSAL BLOOD RNA	HUMAN BLOOD RNA	UNIVERSAL RNA	UNIVERSAL RNA/miRNA	FFPE RNA Purification Kit		
		IZOLACJE							
		25 100	25	25	25 100	25 100	25 100		
RNA	RNA POWYŻEJ 200 nt	TKANKI ZWIERZĘCE				●	●		
		TKANKI ROŚLINNE				●	●		
		BAKTERIE				●			
		DROŹDŹE				●			
		HODOWLE KOMÓRKOWE				●	●		
		KREW LUDZKA	ŚWIEŻA	●	●	●	●		
			MROŻONA ¹		●				
		KREW ZWIERZĘCA	ŚWIEŻA	●	●				
			MROŻONA ¹		●				
		miRNA LUB CAŁKOWITE RNA	TKANKI ZWIERZĘCE	●				●	
	TKANKI PARAFINA / FORMALINA							●	
	TKANKI ROŚLINNE					●			
	HODOWLE KOMÓRKOWE		●				●		
	BAKTERIE		●						
	DROŹDŹE		●						
	KREW/LEUKOCYTY		●						
	OCZYSZCZANIE PO REAKCJACH ENZYMATYCZNYCH					●	●		
	TRAWIENIE DNazą I NA KOLUMIENCIE			●		●			

Wszystkie zestawy zawierają bufony WASH w formie gotowej do bezpośredniego użytku

1. Mrożone w buforze Lyse Blood (występuje w zestawie).
2. Mieszanina fenolu i soli chaotropowych przeznaczona do izolacji całkowitego RNA.

**DOBÓR ZESTAWU
W ZALEŻNOŚCI OD RODZAJU
IZOLOWANEGO MATERIAŁU**

		PRZEWODNIK PO ZESTAWACH DO IZOLACJI KWASÓW NUKLEINOWYCH																						
		E3600	E3865	E3940	E3980	E3910	E3945	E3960	E3955	E3925	E3920	E3995	E3935	E3900	E3865	E3915	E3970	E3975	E3930	E3950	E3951			
		MICELLULLA DNA ¹	GRAM PLUS & YEAST GENOMIC DNA	AGAROSE - OUIT DNA	BACTERIAL & YEAST GENOMIC DNA	BIO - TRACE DNA	BASIC DNA	BONE DNA	CELL CULTURE DNA	FOOD EXTRACT DNA	PCR / DNA CLEANUP	PLANT & FUNGI DNA	AGROBACTERIUM PLASMID DNA	PLASMID MINIPREP DNA	QUICK BLOOD DNA	SHORT DNA CLEAN-UP	SOIL DNA	STOOL DNA	SWAB EXTRACT DNA	TISSUE DNA	TISSUE & BACTERIAL DNA			
		DOSTĘPNA ILOŚĆ IZOLACJI																						
		50 150	25 100	50 150	50 150	25 100	50 150	25 100	50 150	25 100	50 150	50 150	50 150	50 150	50 150	25 100	50 100	50 100	25 100	50 150	50 150			
DNA	GENOMOWE	BAKTERIE	●		●																	●		
		DROŻDŻE	●		●																			
		HODOWLE KOMÓRKOWE							●												●	●		
		ROŚLINY											●											
		GRZYBY											●											
		ROŚLINY BOGATE W POLISACHARYDY ²											●											
		KREW													●									
		GLEBA																●						
		KĄŁ																	●					
		WYMAZY																		●				
		TKANKI ZWIERZĘCE																				●	●	
		TKANKI PARAFINA / FORMALINA																				●	●	
		OGONY GRZYŹONI																				●	●	
		WŁOSY																				●	●	
		OWADY																				●	●	
		MOCZ																				●	●	
		KOŚCI											●											
		ŚLADY BIOLOGICZNE						●																
	ŻYWNOŚĆ										●													
	PLAZMIDOWE	BAKTERIE												●	●									
DROŻDŻE					●																			
IZOLACJA Z AGAROZY				●			●																	
OCZYSZCZANIE PO PCR I REAKCJACH ENZYMATYCZNYCH		●					●						●											

Wszystkie zestawy zawierają bufor WASH w formie gotowej do bezpośredniego użytku

1. Dodatkowo wymagany bufor Lyse CT (E0324)
2. Zestaw do tworzenia emulsji i oczyszczania DNA.

○ **GeneMATRIX Tick RNA/DNA Purification Kit jest przeznaczony do jednoczesnego oczyszczania RNA i DNA wirusów i bakterii bytujących w drobnych pajęczakach takich jak kleszcze i innych owadach o twardych i trudno rozcieralnych chitynowych pancerzykach.**

Zestaw jest zoptymalizowany w kierunku jednoczesnej izolacji RNA i DNA z drobnoustrojów (bakterie, wirusy, grzyby) bytujących w małych (do 5 mm długości) pajęczakach (kleszczach) lub owadach. Szybki protokół zapewnia krótki czas izolacji. Pierwszy krok to homogenizacja kleszcza za pomocą Tissue Grinding Tool specjalnie dostosowanego do rozcierania twardych chitynowych pancerzyków owadów. Następnie materiał poddawany jest lizie i filtracji. Dodatek nośnikowego RNA wspomaga oczyszczanie nawet niewielkich ilości wirusowych i bakteryjnych kwasów nukleinowych. Podczas krótkiego wirowania

następuje wiązanie RNA/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 RNA/DNA wykonuje się wodą wolną od RNaz. Oczyszczane są kwasy nukleinowe o długości od 25 nt (miRNA). Oczyszczony preparat RNA/DNA wolny od białek, nukleaz i innych zanieczyszczeń 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 bufor 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 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

