

GeneMATRIX Universal DNA/RNA/Protein Purification Kit

Uniwersalny zestaw do izolacji DNA genomowego, całkowitego RNA i białek z jednej próbki: z tkanek zwierzęcych, roślin, drożdży, bakterii lub hodowli komórkowych.

● **kat. nr. E3597**

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 Rozdrobnienie, homogenizacja i wiązanie DNA.....	5
Tkanki zwierzęce.....	5
Tkanki roślinne	5
Drożdże.....	6
Bakterie	7
Hodowle komórkowe.....	8
Część II Izolacja RNA.....	9
Część III Precypitacja białek.....	10
Część IV Izolacja DNA genomowego.....	11
Dodatek 1: Oczyszczanie RNA	
z wykorzystaniem trawienia DNazą I na kolumnie	12
Dodatek 2: Izolacja RNA/DNA z roślin bogatych w związki fenolowe.	13
Środki ostrożności.....	14

Składniki zestawu	25 izolacji E3597-01	100 izolacji E3597-02	Warunki przechowywania
Lyse ALL	6 ml	24 ml	15-25°C
DRP	15 ml	60 ml	15-25°C
Wash DN1	12 ml	48 ml	15-25°C
Wash RB1	12 ml	48 ml	15-25°C
Wash RBW	54 ml	216 ml	15-25°C
DNR	1.5 ml	6 ml	15-25°C
PLB	4.5 ml	18 ml	15-25°C
Bromophenol Blue 0.5%	0.1 ml	0.4 ml	15-25°C
RNase-free water	3 ml	12 ml	15-25°C
Elution	3 ml	12 ml	15-25°C
DNA Binding Columns	25 szt.	2 x 50 szt.	2-8°C
RNA Binding Columns	25 szt.	2 x 50 szt.	2-8°C
Protokół	1	1	

Uwagi wstępne

UWAGA 1 • Przeznaczenie zestawu. Zestaw przeznaczony jest do izolacji DNA genomowego, całkowitego RNA (powyżej 200 nt) oraz białek z jednej próbki. Zestaw może być użyty do izolacji DNA/RNA/białek z tkanek zwierzęcych, roślin, drożdży, bakterii i hodowli komórkowych.

UWAGA 2 • Maksymalna ilość użytego materiału. Maksymalna pojemność minikolumny wiążącej DNA to 30 µg. Naniesienie większej ilości DNA może prowadzić do zanieczyszczenia RNA. Maksymalna pojemność minikolumny wiążącej RNA to 100 µg. Maksymalna objętość płynu nanoszonego na minikolumny to 650 µl. Przetładowanie minikolumn zmniejsza wydajność i obniża jakość wyizolowanego materiału. Może również spowodować zapchanie się minikolumn.

UWAGA 3 • Trawienie DNazą I. Procedura izolacji RNA efektywnie eliminuje całość DNA lub w przypadku zbyt dużej ilości materiału użytego do izolacji i przetładowania minikolumny wiążącej DNA, większość DNA. W związku z tym w przypadku niektórych zastosowań RNA szczególnie wrażliwych na minimalne ilości DNA, proponujemy oczyszczanie zgodnie z Dodatkiem 1 (strona 12) wykorzystującym trawienie preparatu DNazą I (w trakcie izolacji na minikolumnie). W takim przypadku, podczas oczyszczania DNA (część IV protokołu, strona 11) należy pominąć użycie buforu Wash RB1 i wykorzystać ten roztwór podczas oczyszczania RNA z trawieniem DNazą I (punkt 3 Dodatek 1).

UWAGA 4 • β-Merkaptoetanol / DTT. W celu eliminacji RNaz obecnych w środowisku należy dodać odczynnik redukujący taki jak β-merkaptoetanol (β-ME) lub dithiothreitol (DTT) do buforów Lyse ALL i DRP przed rozpoczęciem procedury izolacji RNA/DNA. Do 1 ml Lyse ALL i DRP należy dodać 10 µl β-merkaptoetanolu (β-ME, 14.3M). Po dodaniu β-ME bufor Lyse ALL oraz DRP są stabilne przez 1 miesiąc. Alternatywnie należy dodać 10 µl 1 M DTT rozpuszczonego w wodzie wolnej od RNaz. DTT nie jest stabilny w buforze DRP lub Lyse ALL stąd nie należy przechowywać buforów po zmieszaniu. 1M roztwór DTT powinien być przechowywany w -20°C w małych porcjach aby zapobiec częstemu rozmrażaniu. Aby przygotować 1 M roztwór DTT (MW = 154.25 g mol⁻¹) należy rozpuścić 1.54 g DTT w 10 ml wody wolnej od RNaz i przechowywać w małych porcjach do jednokrotnego użytku.

UWAGA 5 • Bufor PLB. Przed użyciem buforu PLB do 1 ml dodać 25 µl β-merkaptoetanolu (β-ME) lub [1 M] DTT i 10 µl Bromophenol Blue. Po dodaniu β-ME bufor PLB przechowywać w 2-8°C.

UWAGA 6 • Dodatkowe zalecenia. 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. Alternatywnie można zastosować lizę mechaniczną z użyciem kuleczek szklanych (BeadTubeDry E0358) i wytrząsania urządzeniem typu Bead Beater.

UWAGA 7 • Przechowywanie składników zestawu. Po rozpakowaniu, zestaw należy przechowywać w temperaturze pokojowej, za wyjątkiem minikolumn wiążących DNA i RNA, które należy przechowywać w 2-8°C.

UWAGA 8 • Dobra praktyka laboratoryjna. Dla otrzymania DNA/RNA o wysokiej czystości istotne jest dokładne stosowanie się do zaleceń protokołu. Czynności należy wykonać możliwie szybko. Wszystkie kroki należy przeprowadzić w temperaturze pokojowej. Należy uważać aby w trakcie wykonywania czynności związanych z protokołem nie wprowadzać RNaz. Wszelkie roztwory z zestawu należy przechowywać szczelnie zamknięte, aby uniknąć zmiany stężeń w wyniku parowania.

UWAGA 9 • 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 wymyć z kolumnki z użyciem Tris-HCl, wody lub TE.

Wyposażenie i odczynniki dostarczane przez użytkownika

- Do wszystkich protokołów: β -merkптоetanol (14.3 M, β -ME) lub [1 M] Dithiothreitol (DTT) w wodzie wolnej od RNaz, alkohol etylowy [96-100% v/v], alkohol etylowy [70% v/v], mikrowirówka, rękawiczki, jałowe wolne od RNaz tipsy, jałowe wolne od RNaz próbówki 1.5-2 ml, opcjonalnie DNaza I do trawienia na kolumnie (patrz Dodatek 1 strona 12).
- Do protokołu z bakterii – lizozym.
- Do protokołu z tkanek roślinnych i zwierzęcych – sprzęt konieczny do rozdrobnienia i homogenizacji tkanek, w zależności od wybranej metody: móżdziej i ciekły azot lub mechaniczny homogenizator.
- Do protokołu z drożdży – bufor YL: 1 M sorbitol, 0.1 M EDTA, oraz litykaza nr kat. E0329.
- Opcjonalnie do protokołu z tkanek roślinnych i zwierzęcych – odczynnik redukujący pianę do roztworów lizujących AFR01, EURx nr kat. E0328. W wielu przypadkach pierwszym etapem izolacji DNA/RNA jest rozdrobnienie i homogenizacja próbki. Przeprowadza się ją w buforach lizujących bogatych w detergenty, które powodują znaczne spienienie mieszaniny homogenizacyjnej. Widoczne jest to zwłaszcza podczas użycia homogenizatorów mechanicznych bądź wytrząsania próbek z różnego rodzaju kulkami rozdrabniającymi. Aby zapobiec tworzeniu się nadmiaru piany można dodać odczynnik AFR01 do buforu Lyse ALL w ilości 5 μ l na 1 ml roztworu [0,5% (v/v)] i dobrze wymieszać. W przypadku bardzo silnego spienienia, po homogenizacji próbkę należy zwirować z prędkością 8 000 x g przez 30 sekund.
- Opcjonalnie do protokołu z tkanek roślinnych - Lyse Buffer PVP nr kat. E0291-01 do lizy tkanek u gatunków roślin, szczególnie bogatych w związku fenolowe i polisacharydy oraz tkanki zdrewniałe.

Protokół

Część I Rozdrobnienie, homogenizacja i wiązanie DNA

Tkanki zwierzęce

- Zamrozić fragment tkanki w ciekłym azocie, a następnie dokładnie rozdrobnić, używając do tego celu wcześniej schłodzonego moździerza i tłuczka. Umieścić rozdrobnioną tkankę w schłodzonej, RNase-free 2 ml próbówce typu Eppendorf. Dodać 200 μ l buforu **Lyse ALL** oraz 300 μ l buforu **DRP** do rozdrobnionej tkanki. Dokładnie wymieszać przez pipetowanie i worteksowanie.
 - Rozdrobnić fragment tkanki (świeży lub zamrożony) mechanicznie za pomocą homogenizatora w 300 μ l buforu **DRP**. Do rozdrobnionej próbki dodać 200 μ l **Lyse ALL**.
 - Nie należy używać więcej niż 20 mg tkanek. Korzystając z homogenizatora mechanicznego należy użyć do 10 razy mniej materiału do izolacji niż w przypadku moździerza i tłuczka.
 - Fragment tkanki należy zhomogenizować/rozbić jak najdrobniej, gdyż jest to etap decydujący o wydajności izolacji. W celu podniesienia wydajności izolacji zalecamy użycie homogenizatora mechanicznego.
 - Zamrożone tkanki nie powinny ulec rozmrożeniu.
 - Upewnić się czy do buforu Lyse ALL i buforu DRP został dodany β -ME lub DTT (Uwaga 4 strona 3).
- Wirować próbkę przez 3 min z maksymalną prędkością.
- Ostrożnie przenieść supernatant do minikolumny wiążącej DNA umieszczonej w 2 ml próbówce odbierającej. Wirować przez 1 min z maksymalną prędkością.
- Przechować minikolumny wiążące DNA w temperaturze pokojowej 15-25°C (lub w 2-8°C przez dłuższy czas) do późniejszego oczyszczania DNA (część IV protokołu). Użyć przesącz (flow-through) do izolacji RNA. Przejsć do punktu 1 części II protokołu (izolacja RNA).

Tkanki roślinne

- Zamrozić fragment tkanki roślinnej w ciekłym azocie, a następnie dokładnie rozdrobnić, używając do tego celu wcześniej schłodzonego moździerza i tłuczka. Umieścić rozdrobnioną tkankę (max. 100 mg) w schłodzonej, RNase-free 2 ml próbówce typu Eppendorf. Dodać 200 μ l buforu **Lyse ALL** oraz 100 μ l buforu **DRP** do rozdrobnionej tkanki. Dokładnie wymieszać przez worteksowanie.

o W przypadku roślin o dużej zawartości związków fenolowych/zdrewniałych lub problemów z uzyskaniem RNA/DNA zdatnego do analiz PCR/RT-PCR proponujemy zastąpienie buforu Lyse ALL buforem Lyse Buffer PVP nr kat. E0291-01 i postępowanie zgodnie z dodatkiem 2 (strona 13).

b. Rozdrobnić fragment tkanki (świeży lub zamrożony) mechanicznie za pomocą homogenizatora w mieszaninie 200 µl buforu **Lyse ALL** oraz 100 µl buforu **DRP**.

o Nie należy używać więcej niż 100 mg tkanek. Korzystając z homogenizatora mechanicznego należy użyć do 10 razy mniej materiału do izolacji niż w przypadku mózdzierza i tłuszczka.

o Fragment tkanki należy zhomogenizować/rozbić jak najdrobniej, gdyż jest to etap decydujący o wydajności izolacji. W celu podniesienia wydajności izolacji zalecamy użycie homogenizatora mechanicznego.

o Zamrożone tkanki nie powinny ulec rozmrożeniu.

o Upewnić się czy do buforu Lyse ALL i buforu DRP został dodany β-ME lub DTT (Uwaga 4 strona 3).

2. Wirować próbkę przez 4 min z maksymalną prędkością.
3. Ostrożnie przenieść supernatant do nowej, RNase-free, próbówki 1.5-2 ml typu Eppendorf i dodać 200 µl buforu **DRP**.
4. Ostrożnie przenieść supernatant do minikolumny wiążącej DNA umieszczonej w 2 ml próbówce odbierającej. Wirować przez 1 min z maksymalną prędkością.
5. Przechować minikolumny wiążące DNA w temperaturze pokojowej 15-25°C (lub w 2-8°C przez dłuższy czas) do późniejszego oczyszczania DNA (część IV protokołu). Użyć przesącz (flow-through) do izolacji RNA. Prześć do punktu 1 części II protokołu (izolacja RNA).

Drożdże

1. Zwirować odpowiednią ilość hodowli drożdży z prędkością 5 000 x g przez 5 min w 4°C. Dokładnie usunąć supernatant.
 - o Nie należy używać więcej niż 5×10^7 komórek drożdży.
 - o Izolację należy wykonywać ze świeżo zwirowanych hodowli.
2. Zawiesić osad w 0.5 ml buforu YL zawierającego litykazę/zymolazę (patrz uwaga 4 poniżej). Inkubować przez 30 min w 30°C.
 - 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 (np. 4 ml 24-godzinnej hodowli większości szczepów *Pichia pastoris*), tak aby nie przekraczać 100 mg masy osadu drożdżowego przypadającego na jedną kolumnkę.
 - o Alternatywnie do lizy enzymatycznej można zastosować lizę mechaniczną z użyciem kuleczek szklanych (BeadTubeDry E0358) i wytrząsania urządzeniem typu Bead Beater. Siłę wytrząsania należy dostosować do badanego gatunku drożdży.
 - o Przed izolacją należy przygotować bufor YL: 1 M sorbitol, 0.1 M EDTA. Przed użyciem dodać: 0.1% β-merkaptioetanolu, 10 µl (50 U) litykazy E0329 na 1×10^7 komórek.

3. Zwirować powstałe sferoplasty przez 3 min z prędkością 1 000 x g. Dokładnie usunąć supernatant.
4. Dodać 200 µl buforu **Lyse ALL** oraz 350 µl buforu **DRP** do osadu. Dokładnie wymieszać przez pipetowanie i worteksowanie.
 - Upewnić się czy do buforu Lyse ALL i buforu DRP został dodany β-ME lub DTT (Uwaga 4 strona 3).
5. Wirować próbkę przez 2 min z maksymalną prędkością.
6. Ostrożnie przenieść supernatant do minikolumny wiążącej DNA umieszczonej w 2 ml próbówce odbierającej. Wirować przez 1 min z maksymalną prędkością.
7. Przechować minikolumny wiążące DNA w temperaturze pokojowej 15-25°C (lub w 2-8°C przez dłuższy czas) do późniejszego oczyszczania DNA (część IV protokołu). Użyć przesącz (flow-through) do izolacji RNA. Przejść do punktu 1 części II protokołu (izolacja RNA).

Bakterie

1. Zwirować nocną hodowlę bakteryjną (2 min w 4°C), dokładnie usunąć supernatant.
 - Nie należy używać więcej niż 1×10^9 bakterii.
 - Najwyższej jakości DNA/RNA uzyskuje się z hodowli bakteryjnych znajdujących się w fazie logarytmicznej wzrostu lub wczesnej fazie stacjonarnej.
2. Dokładnie zawiesić osad bakteryjny w 200 µl buforu **Lyse ALL** zawierającego lizozym (patrz uwaga 1 poniżej).
 - Przed izolacją należy dodać lizozym do buforu Lyse ALL: 500 µg/ml dla bakterii Gram- lub 5 mg/ml dla bakterii Gram* .
 - Upewnić się czy do buforu Lyse ALL został dodany β-ME lub DTT (Uwaga 4 strona 3).
3. Inkubować próbkę w temperaturze pokojowej:
 - a) 5-10 min bakterie gram-ujemne
 - b) 15-20 min bakterie gram-dodatnie
4. Dodać 300 µl buforu **DRP**. Dokładnie wymieszać przez worteksowanie.
 - Upewnić się czy do buforu DRP został dodany β-ME lub DTT (Uwaga 4 strona 3).
5. Wirować próbkę przez 2 min z maksymalną prędkością.
6. Ostrożnie przenieść supernatant do minikolumny wiążącej DNA umieszczonej w 2 ml próbówce odbierającej. Wirować przez 1 min z maksymalną prędkością.
7. Przechować minikolumny wiążące DNA w temperaturze pokojowej 15-25°C (lub w 2-8°C przez dłuższy czas) do późniejszego oczyszczania DNA (część IV protokołu). Użyć przesącz (flow-through) do izolacji RNA. Przejść do punktu 1 części II protokołu (izolacja RNA).

Hodowle komórkowe

1. W probówce 2 ml typu Eppendorf zwirować hodowlę komórek z prędkością 1 000 x g przez 5 min. Ostrożnie wybrać supernatant znad osadu.
 - o Nie należy używać więcej niż 5×10^6 komórek.
2. Dodać 400 μ l buforu **DRP** do osadu. W celu homogenizacji dokładnie wymieszać przez pipetowanie i worteksowanie.
 - o Na tym etapie można użyć homogenizatora mechanicznego. W tym celu rozdrabniać komórki w 400 μ l buforu DRP przez 30 sekund. Homogenizacja mechaniczna podnosi wydajność izolacji DNA genomowego.
 - o Upewnić się czy do buforu DRP został dodany β -ME lub DTT (Uwaga 4 strona 3).
3. Dodać 100 μ l buforu **Lyse ALL** do rozdrobnionych komórek. Dokładnie wymieszać.
 - o Upewnić się czy do buforu Lyse ALL został dodany β -ME lub DTT (Uwaga 6 strona 3).
4. Wirować próbkę przez 2 min z maksymalną prędkością.
5. Ostrożnie przenieść supernatant do minikolumny wiążącej DNA umieszczonej w 2 ml probówce odbierającej. Wirować przez 1 min z maksymalną prędkością.
6. Przechować minikolumny wiążące DNA w temperaturze pokojowej 15-25°C (lub w 2-8°C przez dłuższy czas) do późniejszego oczyszczania DNA (część IV protokołu). Użyć przesącz (flow-through) do izolacji RNA. Przejść do punktu 1 części II protokołu (izolacja RNA).

Część II Izolacja RNA

1. Dodać 0.7 objętości alkoholu etylowego (96-100%) do przesączu (flow-through) z ostatniego punktu części I protokołu. Wymieszać dokładnie przez pipetowanie. Nie wirować.
 - o *Na przykład, do 400 µl przesączu dodać 280 µl etanolu.*
2. Przenieść mieszaninę (razem z osadem jeżeli powstał) do minikolumny wiążącej RNA umieszczonej w probówce odbierającej. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g. Użyć przesącz (flow-through) do izolacji białek. Część III protokołu (precypitacja białek).
3. Dodać 400 µl buforu płuczącego **Wash DN1** do minikolumny. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i powtórnie umieścić minikolumnę w probówce.
 - o *Krok ten efektywnie eliminuje ślady DNA. Jednakże w przypadku niektórych zastosowań RNA szczególnie wrażliwych na minimalne ilości DNA, dalsze kroki proponujemy wykonać zgodnie z Dodatkiem 1 (strona 12) wykorzystującym trawienie preparatu DNazą I (w trakcie izolacji na minikolumnie).*
4. Dodać 600 µl buforu płuczącego **Wash RBW** do minikolumny. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
5. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i powtórnie umieścić minikolumnę w probówce.
6. Dodać 300 µl buforu płuczącego **Wash RBW** 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 membrana nie jest całkowicie sucha, wylać przesącz, umieścić minikolumnę w probówce i ponownie wirować przez 1 min.*
7. Minikolumnę umieścić w nowej probówce typu Eppendorf 1.5-2 ml. Dodać 50-100 µl wody RNase-free centralnie na membranę.
8. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
9. Usunąć minikolumnę, zamknąć probówkę. RNA jest gotowe do dalszych analiz/manipulacji. Powinno być przechowywane w -20°C.

Część III Precypitacja białek

1. Do przesączu (flow-through), z punktu 2 części II protokołu, dodać 2 objętości etanolu (96-100%). Wymieszać dokładnie. Pozostawić w 2-8°C przez 30 min.
2. Wirować próbkę z maksymalną prędkością przez 15 min w 4°C.
3. Dodać 300 µl 70% etanolu do osadu. Dokładnie wymieszać przez worteksowanie. Wirować 10 min w 4°C, usunąć supernatant.
4. Wysuszyć osad białkowy w temperaturze pokojowej przez 5-15 min.
5. Zawiesić osad w 80-150 µl buforu **PLB** (Uwaga 5 str 3).
 - Bufor PLB jest buforem używanym w analizie SDS-PAGE białek (bufor Laemmli). Jeżeli białka nie będą analizowane przy użyciu SDS-PAGE, zawiesić osad w odpowiednim buforze zgodnym z wybraną metodą analizy. W wyniku stosowanej procedury sprecypitowane białka są silnie zdenaturowane i wykazują obniżoną rozpuszczalność w wodzie. Ponowne rozpuszczenie osadu jest możliwe w buforze PLB lub innym roztworze zawierającym wysokie stężenie detergentu (np. 1.5-5% SDS). W związku z tym do ilościowego oznaczania białek polecamy metodę Micro-BCA (Bicinchoninic Acid Assay).
 - W przypadku SDS-PAGE przed użyciem buforu PLB do 1 ml dodać 25 µl β-merkaptioetanolu (β-ME) lub [1 M] DTT oraz 10 µl Bromophenol Blue. Po dodaniu β-ME bufor PLB przechowywać w 2-8°C.
 - W wypadku krystalizacji komponentów buforu PLB roztwór należy podgrzać do całkowitego wyklarowania.
6. Ogrzewać w 95°C przez 5 min w celu rozpuszczenia i denaturacji próbki.
7. Jeżeli są widoczne nierozpuszczalne pozostałości, wirować próbkę przez 1 min z maksymalną prędkością. Supernatant jest gotowy do użytku w zastosowaniach typu analizy SDS-PAGE.
 - Próbkę może być przechowywana przez krótki okres czasu w 2-8°C lub w -20°C przez kilka miesięcy.

Część IV Izolacja DNA genomowego

1. Dodać 400 μ l buforu płuczącego **Wash RB1** do minikolumny wiążącej DNA (ostatni punkt części I protokołu). Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
 - o W przypadku stosowania trawienia DNazą I podczas oczyszczania RNA (Dodatek1) ten krok należy pominąć i przejść do wykonania płukania za pomocą Wash RBW.
2. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i powtórnie umieścić minikolumnę w probówce.
3. Dodać 600 μ l buforu płuczącego **Wash RBW** do minikolumny. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
4. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i powtórnie umieścić minikolumnę w probówce.
5. Dodać 300 μ l buforu płuczącego **Wash RBW** 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 probówce i ponownie wirować przez 1 min.
6. Minikolumnę umieścić w nowej probówce typu Eppendorf 1.5-2 ml. Dodać 50-100 μ l buforu **Elution**.
 - o Dodanie buforu elującego centralnie na powierzchnię membrany zapewnia uzyskanie maksymalnej wydajności odzysku DNA. Należy unikać dotykania ścianek minikolumny mikropipetą, aby nie przenosić śladów DNA pomiędzy kolejnymi minikolumnami.
 - o W celu podniesienia wydajności odpłukania z membran DNA genomowego bufor Elution można ogrzać do temp. 80°C.
7. Minikolumnę pozostawić na 2 min w temperaturze pokojowej.
8. Wirować minikolumnę przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
9. Usunąć minikolumnę, zamknąć probówkę. 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 1: Oczyszczanie RNA z wykorzystaniem trawienia DNazą I na kolumnie

UWAGA 1 • Poniższą procedurę wykonać po kroku z Wash DN1 w standardowym protokole w Części II Izolacja RNA.

UWAGA 2 • Trawienie DNazą I należy wykonać z użyciem buforu DNR dołączonego do zestawu. Nie należy używać innych buforów.

UWAGA 3 • DNaza I nie jest dołączona do zestawu. Polecamy użycie DNazy I EURx nr kat. E1345.

UWAGA 4 • Przygotować roztwór DNazy I przed rozpoczęciem izolacji. Dodać 1 U DNazy I do 50 µl buforu DNR. Nie dodawać więcej niż 2 µl roztworu DNazy I.

UWAGA 5 • DNaza I łatwo ulega denaturacji fizycznej. Nie należy jej worteksować, a po dodaniu DNazy I do roztworu należy mieszać jedynie przez delikatne pipetowanie.

UWAGA 6 • Używać tylko DNazy I wolnej od RNaz.

1. Po wykonaniu **Wash DN1** i odwirowaniu, wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i powtórnie umieścić minikolumnę w probówce.
2. Dodać 50 µl buforu **DNR** (z dodaną DNazą I) centralnie na membranę i pozostawić w temperaturze pokojowej na 10 min. Nie wirować.
 - o *Upewnić się czy do buforu DNR została dodana DNaza I (patrz Uwaga 4 powyżej).*
3. Dodać 400 µl buforu **Wash RB1** do minikolumny. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
4. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i powtórnie umieścić minikolumnę w probówce.
5. Kontynuować standardowy protokół od kroku nr 4 w Części II Izolacja RNA (strona 9).

Dodatek 2: Izolacja RNA/DNA z roślin bogatych w związki fenolowe.

UWAGA 1 • W szczególnych przypadkach pracy z roślinami o dużej zawartości związków fenolowych, a także tkanek zdrewniałych zaleca się zastąpienie buforu Lyse ALL buforem Lyse Buffer PVP nr kat. E0291-01. Lyse Buffer PVP w składzie zawiera poliwinolopirolidon (PVP) aktywnie usuwający związki polifenolowe będące inhibitorami reakcji PCR.

UWAGA 2 • Modyfikacja protokołu polega na wymianie buforu Lyse ALL na Lyse Buffer PVP oraz na 10 min inkubacji próbki na lodzie (krok 3).

UWAGA 3 • Przed użyciem buforu Lyse Buffer PVP do 1 ml dodać po 10 μ l β -merkaptoetanolu (β -ME) lub 10 μ l [1 M] DTT. Po dodaniu β -ME Lyse Buffer PVP jest stabilny przez 1 miesiąc. DTT nie jest stabilny w odczynniku Lyse Buffer PVP.

1. Wybrać metodę homogenizacji materiału roślinnego:
 - a. Zamrozić fragment tkanki roślinnej w ciekłym azocie, a następnie dokładnie rozdrobnić, używając do tego celu wcześniej schłodzonego moździerza i tłuczka. Umieścić rozdrobnioną tkankę (max. 100 mg) w schłodzonej, RNase-free 2 ml probówce typu Eppendorf. Dodać 200 μ l buforu Lyse Buffer PVP oraz 100 μ l buforu **DRP** do rozdrobnionej tkanki. Dokładnie wymieszać przez worteksowanie.
 - b. Rozdrobnić fragment tkanki (świeży lub zamrożony) mechanicznie za pomocą homogenizatora w mieszaninie 200 μ l buforu Lyse Buffer PVP oraz 100 μ l buforu **DRP**.
 - o Nie należy używać więcej niż 100 mg tkanek. Korzystając z homogenizatora mechanicznego należy użyć do 10 razy mniej materiału do izolacji niż w przypadku moździerza i tłuczka.
 - o Fragment tkanki należy zhomogenizować/rozbić jak najdrobniej, gdyż jest to etap decydujący o wydajności izolacji. W celu podniesienia wydajności izolacji zalecamy użycie homogenizatora mechanicznego.
 - o Zamrożone tkanki nie powinny ulec rozmrożeniu.
 - o Upewnić się czy do buforu Lyse Buffer PVP i buforu DRP został dodany β -ME lub DTT
2. Wirować próbkę przez 4 min z maksymalną prędkością, a następnie przenieść supernatant do nowej RNase-free, próbówki 1.5-2 ml typu Eppendorf. Osad składający się z resztek roślinnych wyrzucić.
3. Inkubować próbkę na lodzie 10 min.
4. Kontynuować protokół od kroku 2 str 6 tkanki roślinne.

Środki ostrożności

Lyse ALL



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.

DRP



Uwaga

H302+H332 Działa szkodliwie po połknięciu lub w następstwie wdychania.

H412 Działa szkodliwie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki.

P261 Unikać wdychania par/ rozpylonej cieczy.

P273 Unikać uwolnienia do środowiska.

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.

EUH032 W kontakcie z kwasami uwalnia bardzo toksyczne gazy.

Wash RB1



Uwaga

H226 Łatwopalna ciecz i pary.

H302 Działa szkodliwie po połknięciu.

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.

P301+P312 W przypadku połknięcia: w przypadku złego samopoczucia skontaktować się z ośrodkiem zatruc/ lekarzem.

P403+P235 Przechowywać w dobrze wentylowanym miejscu. Przechowywać w chłodnym miejscu.

EUH032 W kontakcie z kwasami uwalnia bardzo toksyczne gazy.



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 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 DNA/RNA/Protein Purification Kit jest przeznaczony do szybkiej izolacji DNA genomowego, całkowitego komórkowego RNA oraz białek z jednej próbki, pochodzącej z różnorodnych źródeł: tkanek zwierząt i ludzi, roślin, bakterii, drożdży oraz hodowli komórkowych.**

W trakcie izolacji próbka zostaje rozdrobniona i poddana lizie w obecności buforów denaturujących, które inaktywują RNazy, DNazy i proteazy komórkowe. Następnie lizat jest wirowany w mikrokolumnkach o specjalnej konstrukcji, które redukują lepkość lizatu i wiążą fragmenty DNA. Dodanie etanolu wytwarza warunki do selektywnego wiązania RNA do membrany GeneMATRIX. Podczas krótkiego wirowania następuje wiązanie RNA do membrany kolumnek wiążących RNA, natomiast niezwiązane zanieczyszczenia pozostają w wycieku z kolumny. Ich

śladowe pozostałości na membranie są skutecznie usuwane w trakcie dwóch etapów płukania. Elucję oczyszczonego RNA wykonuje się wodą destylowaną, wolną od RNaz. Maksymalna wydajność procesu to ok. 100 µg RNA o długości powyżej 200 nt. Białka po wytrąceniu z przesączu są zawieszane w buforze PLB używanym w analizie SDS-PAGE (bufor Laemmli). Zestaw ten jest użytecznym narzędziem dla naukowców zainteresowanych badaniem genomu, proteomu i transkryptomu pochodzących z tej samej próbki.

- **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 mikrokolumn, 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
orders: email: orders@eurx.com.pl
tel. +48 58 524 06 97, fax +48 58 341 74 23

