

Uniwersalny zestaw do izolacji DNA (GeDI)

Uniwersalny odczynnik do izolacji całkowitego DNA (GeDI) w zestawie z kolumnkami krzemionkowymi oraz buforami pozwalającymi na dodatkowe oczyszczenie próbki na kolumnkach.

● **kat. nr. E3765**

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

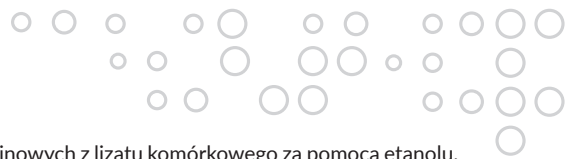




Spis treści

Wyposażenie i odczynniki dostarczane przez użytkownika	3
Uwagi wstępne.....	4
Izolacja DNA	5
Rozdrobnienie i homogenizacja próbeki	5
Precypitacja DNA.....	7
Oczyszczanie DNA na kolumnie	8
Homogenizacja tkanek za pomocą Tissue Grinding Tool.....	10
Środki ostrożności.....	11

Składniki zestawu	25 izolacji E3765-01	100 izolacji E3765-02	Warunki prze- chowywania
Buffer BG	0.9 ml	3.6 ml	15-25°C
GeDI	30 ml	120 ml	2-25°C
Res Sol	11 ml	42 ml	15-25°C
Wash BGX	26 ml	102 ml	15-25°C
Elution	4.5 ml	18 ml	15-25°C
DNA Binding Columns	25 szt.	2 x 50 szt.	15-25°C
Protokół	1	1	



Metoda opiera się na precipitacji kwasów nukleinowych z lizatu komórkowego za pomocą etanolu. Próbkę poddawana jest homogenizacji i lizie w specjalnie skomponowanym roztworze GeDI (nie zawierającym rozpuszczalników organicznych takich jak fenol). Dodanie etanolu powoduje selektywne wytrącenie DNA z roztworu. Osad rozpuszczony w specjalnym buforze ResSol można nanieść na minikolumnki z membranami krzemionkowymi. Pozwala to na zwiększenie stopnia czystości wyizolowanego DNA i otrzymanie materiału najwyższej jakości. Osad można również rozpuścić w 8 mM NaOH i po zobojętnieniu bezpośrednio użyć do standardowych molekularnych i biotechnologicznych aplikacji takich jak: PCR, klonowanie molekularne, RFLP, hybridyzacja Southerna itp.

Uniwersalny odczynnik do izolacji całkowitego DNA (GeDI) jest dostępny oddzielnie (E3760) lub w zestawie (E3765) z kolumnkami krzemionkowymi, roztworem ResSol i odczynnikami pozwalającymi na dodatkowe oczyszczenie próbki na kolumnkach.

Wyposażenie i odczynniki dostarczane przez użytkownika

1. Alkohol etylowy [95%–100% v/v], alkohol etylowy [75% v/v], jałowa woda wolna od DNaz.
2. 8 mM NaOH (świeżo przygotowany), 1 M HEPES.
3. W przypadku krwi: roztwór do lizy erytrocytów **Lyse RBC** (E0326).
4. Mikrowirówka, blok grzejny pozwalający na inkubację próbki w temperaturze 50–70°C, rękawiczki, jałowe tipsy, jałowe próbówki 1.5-2 ml, wortex, opcjonalnie sprzęt do homogenizacji tkanki.

Opcjonalnie:

1. Do rozdrabniania małych porcji tkanek roślinnych bądź zwierzęcych **Tissue Grinding Tool** (E0359).
2. W przypadku bakterii gram dodatnich, drożdży lub tkanek wstępnie rozdrobnionych za pomocą **Tissue Grinding Tool** (E0359), próbówki z kulkami szklanymi do homogenizacji **BeadTubeDry** (E0358) oraz odczynnik redukujący pianę dla roztworów lizujących EURx - bufor **AFR01** (E0328).

Uwagi wstępne

UWAGA 1 • Przeznaczenie odczynnika. Roztwór **GeDI** jest jednofazową mieszaniną soli i dodatkowych składników pozwalającą na wydajną lizę i izolację całkowitego DNA (wielko i małowcząsteczkowego) z tkanek ludzkich, zwierzęcych i roślinnych lub z komórek bakteryjnych bądź drożdżowych.

UWAGA 2 • Maksymalna ilość użytego materiału. Należy używać maksymalnie 50 mg tkanki zwierzęcej lub 50–200 mg tkanki roślinnej na 1 ml roztworu. W przypadku komórek zwierzęcych, bakteryjnych lub drożdżowych orientacyjna ilość to maksymalnie 1×10^7 komórek na 1 ml roztworu. Objętość dodanej tkanki, osadu lub zawiesiny komórkowej nie powinna przekraczać 10% objętości użytego roztworu **GeDI**. W przypadku izolacji DNA z ludzkich leukocytów wyjściowa ilość krwi to maksymalnie 1 ml na 1 ml roztworu **GeDI**.

UWAGA 3 • Rozdrabnianie i liza próbek. W przypadku większości próbek (tkanki zwierzęce, roślinne) wymagana jest homogenizacja mechaniczna, którą można przeprowadzić bezpośrednio w roztworze **GeDI** lub zamrożone w ciekłym azocie próbki należy zmielić w młynku za pomocą tłuczka. W przypadku próbek łatwo ulegających lizie (komórki bakteryjne, hodowle komórkowe) wystarczy zawiesić materiał w roztworze **GeDI**.

UWAGA 4 • Przechowywanie próbek. Probki zhomogenizowane i zlizowane w roztworze **GeDI** można przechowywać do kilku miesięcy w temperaturze -20°C lub -80°C .

UWAGA 5 • Przechowywanie składników zestawu. Roztwór może być przechowywany zarówno w temperaturze pokojowej jak i w 2°C – 8°C (lodówka).

UWAGA 6 • Rozpuszczone DNA może zawierać niewielką ilość zdegradowanego RNA. W zastosowaniach wymagających DNA wysokiej czystości należy przeprowadzić trawienie RNazą A lub wykonać operacje opisane w części protokołu **Oczyszczanie DNA na kolumnie**.

Przybliżona wydajność izolacji całkowitego DNA w zależności od rodzaju tkanek lub komórek.

Rodzaj próbki/tkanki	Początkowa ilość materiału	Wydajność DNA genomowego
Komórki <i>E. coli</i>	10^9 komórek	30 – 40 μg
Komórki ludzkie	10^6 komórek	4 – 7 μg
Komórki mysie	10^6 komórek	4 – 7 μg
Krew	1 ml	20 – 40 μg
Liść	0.5 g	10 – 100 μg
Łożysko	10 mg	20 – 30 μg
Mięśnie szkieletowe	10 mg	15 – 25 μg
Mózg	10 mg	15 – 30 μg
Nerki	10 mg	30 – 40 μg
Ogon myszy	10 mg	4 – 30 μg
Płuca	10 mg	30 – 50 μg
Serce	10 mg	15 – 30 μg
Wątroba	10 mg	30 – 40 μg

Izolacja DNA

Rozdrobnienie i homogenizacja próbek

1. Tkanki

Zhomogenizować fragment tkanki w roztworze **GeDI**. Zachować proporcję: maksymalnie 50 mg tkanki na 1 ml roztworu.

Tkankę można zamrozić w ciekłym azocie a następnie dokładnie zmielić w schłodzonym moździerzu za pomocą tłuczka. Proszek dodać do roztworu **GeDI** i dobrze wymieszać.

W przypadku dodatkowego oczyszczania materiału na minikolumnkach lub stosowania wydajnych homogenizatorów mechanicznych należy użyć do 10 razy mniej tkanki.

Do homogenizacji małych porcji tkanek polecamy **Tissue Grinding Tool (E0359)** – patrz strona 10.

2. Tkanki roślinne

Zhomogenizować fragment tkanki roślinnej w roztworze **GeDI**. Zachować proporcję: 50–200 mg tkanki na 1 ml roztworu.

Tkankę można zamrozić w ciekłym azocie a następnie dokładnie zmielić w schłodzonym moździerzu za pomocą tłuczka. Proszek dodać do roztworu **GeDI** i dobrze wymieszać.

W przypadku dodatkowego oczyszczania materiału na minikolumnkach lub stosowania wydajnych homogenizatorów mechanicznych należy użyć do 10 razy mniej tkanki.

Do homogenizacji małych porcji tkanek polecamy **Tissue Grinding Tool (E0359)** – patrz strona 10.

3. Hodowle komórkowe w zawiesinie

Osadzić komórki przez wirowanie i usunąć supernatant. Zawiesić osad w proporcji 1 ml roztworu **GeDI** na maksymalnie 1×10^7 komórek. Dla uzyskania całkowitej lizy wymieszać dokładnie przez pipetownie.

4. Hodowle komórkowe w warstwie

Usunąć pożywkę. Dodać roztwór **GeDI** w proporcji 1 ml roztworu na 10 cm² powierzchni, bezpośrednio na płytkę. Dla uzyskania całkowitej lizy wymieszać dokładnie przez pipetownie.

5. Krew (leukocyty)

W pierwszym etapie należy przeprowadzić lizę erytrocytów. W przypadku krwi ludzkiej używać wyjściowo maksymalnie 1 ml świeżej krwi na 1 ml roztworu **GeDI**.

Do świeżej krwi dodać 4 objętości buforu **Lyse RBC**. Wymieszać przez odwracanie próbki. Pozostawić w 4°C na 10 minut w celu lizy erytrocytów. W trakcie inkubacji wymieszać kilkakrotnie przez odwracanie. Wirować próbkę przez 5 min w 4°C z prędkością 1 000 x g. Wylać supernatant.

Osad zawiesić w roztworze **GeDI**. Dla uzyskania całkowitej lizy wymieszać dokładnie przez pipetownie.

6. Bakterie

Gram ujemne: Zwirować odpowiednią ilość hodowli bakteryjnej, dokładnie usunąć supernatant. Zawiesić osad w proporcji 1 ml roztworu **GeDI** na maksymalnie 1×10^8 komórek.

Gram dodatnie: Użyć 1 ml roztworu **GeDI** na maksymalnie 1×10^8 komórek. Osad bakteryjny zamrozić w ciekłym azocie a następnie zmielić na proszek. Odpowiednią ilość proszku zawiesić w 1 ml odczynnika **GeDI**.

Homogenizacja z użyciem **BeadTubeDry**: Do roztworu **GeDI** dodać odczynnik redukujący pianę dla roztworów lizujących EURx – bufor **AFR01** w proporcji 50 μ l **AFR01** na 10 ml **GeDI**. Zwirować odpowiednią ilość hodowli bakteryjnej, dokładnie usunąć supernatant. Osad zwiesić w 1 ml odczynnika **GeDI** z dodanym **AFR01**. Całość przenieść do próbki **BeadTubeDry** z kulkami szklanymi. Probówki **BeadTubeDry** przymocować do wortexu. Użyć w tym celu specjalnego adaptera. Wortexować przez 10 min z maksymalną prędkością.

o Do wytrząsania próbek **BeadTubeDry** można użyć wyspecjalizowanych przyrządów, ang. "bead beater" lub "cell disrupter" (np. *FastPrep*, *Precellys*, *Disruptor Genie*), co pozwala na uzyskanie większej wydajności izolacji DNA. Wówczas, w celu uniknięcia fragmentacji DNA, wymagana jest optymalizacja czasu wytrząsania (skrócenie).

Po etapie wytrząsania, w przypadku silnego spienienia próbki, próbki **BeadTubeDry** należy zwirować z prędkością 8 000 x g przez 30 sek. Po wirowaniu pobrać maksymalną możliwą objętość supernatantu i przenieść do nowej próbki. Zanotować otrzymaną objętość.

7. Drożdże

Stosować protokół jak dla bakterii gram dodatnich.

Precypitacja DNA

1. Zhomogenizowaną próbkę inkubować przez 15 min w temperaturze 70°C.
2. Wytrząsać próbkę ręcznie lub przy użyciu wortexu przez 5 sekund.
3. Wirować próbkę przez 2 min z prędkością 10 000 x g w temperaturze pokojowej.
 - o *Nastąpi osadzenie pozostałości komórkowych i niezhomogenizowanych fragmentów tkanek. Do dalszego etapu izolacji pobrać klarowny supernatant.*
4. Przenieść supernatant do nowej próbówki i dodać 1 ml alkoholu etylowego (95–100% v/v). W przypadku homogenizacji za pomocą **BeadTubeDry** dodać objętość etanolu równą objętości pobranego supernatantu. Pozostawić w temperaturze pokojowej przez 3–5 minut.
 - o *Nastąpi wytrącenie DNA w postaci widocznych kłaczków. Jeżeli stężenie DNA jest małe (< 10 µg) lub DNA jest w formie krótkich fragmentów, kłaczkki nie będą widoczne.*
 - o *W niektórych przypadkach możliwe jest wydobycie wytrąconego DNA za pomocą tipsa, przepłukanie za pomocą 75% etanolu, usunięcie etanolu, wysuszenie osadu i zawieszenie DNA we właściwym buforze. Gdy nie jest to możliwe należy wykonać kolejne punkty protokołu.*
5. Wirować próbkę przez 2 min z prędkością 10 000 x g w temperaturze pokojowej. Zebrać dokładnie supernatant i usunąć.
6. W zależności od potrzeb przejść do kolejnej części protokołu Oczyszczanie DNA na kolumiencie lub wykonać punkty protokołu zamieszczone poniżej.
7. Przepłukać osad za pomocą 75% alkoholu etylowego. W tym celu dodać 1 ml 75% etanolu i dokładnie zwortexować. Wirować próbkę przez 2 min z prędkością 10 000 x g w temperaturze pokojowej. Dokładnie usunąć supernatant.
8. Wysuszyć osad DNA w temperaturze pokojowej. Zawiesić osad w 8 mM NaOH. Użyć odpowiedniej objętości w zależności od potrzeb. Pozostawić próbkę przez 5 min w temperaturze pokojowej. Wymieszać dokładnie. W razie potrzeby krótko ogrzać próbkę w 55°C i ponownie dokładnie wymieszać. Odwirować nierozpuszczone pozostałości przez 2 min z prędkością 10 000 x g w temperaturze pokojowej. Zebrać supernatant, przenieść do nowej próbówki i zobjętnić odpowiednią ilością 1 M HEPES.

Ustalenie pH próbki DNA zawieszono w 8 mM NaOH.

Dla 1 ml 8 mM NaOH użyć następującej objętości 1M roztworu HEPES (kwas):

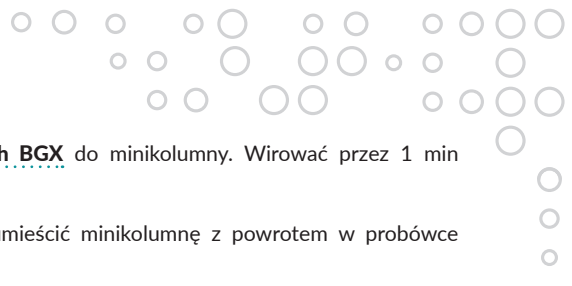
1 M HEPES [μ l]	Końcowe pH
51.5	7.0
36.5	7.2
22.5	7.5
17.5	7.7
12.5	8.0
10.5	8.2
9.0	8.5

○ CO₂ znajdujący się w powietrzu może reagować z NaOH znajdującym się w roztworze, neutralizując zwłaszcza roztwory NaOH o niskim stężeniu. Raz na tydzień należy przygotowywać świeży roztwór 8 mM NaOH.

○ Rozpuszczone DNA może zawierać niewielką ilość zdegradowanego RNA. W zastosowaniach wymagających DNA wysokiej czystości należy przeprowadzić trawienie RNazą A lub wykonać operacje opisane w części protokołu Oczyszczanie DNA na kolumnie.

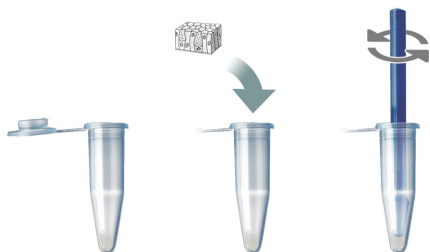
Oczyszczanie DNA na kolumnie

1. Dodać 30 μ l buforu aktywacyjnego **Buffer BG** do minikolumny (nie wirować). Pozostawić w temperaturze pokojowej do momentu naniesienia lizatu 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. Osad otrzymany w punkcie 5 części protokołu Precypitacja DNA zawiesić w 350 μ l buforu **ResSol**.
3. Pozostawić próbkę przez 5 min w temperaturze pokojowej. Wymieszać dokładnie. W razie potrzeby krótko ogrzać próbkę w 55°C i ponownie dokładnie wymieszać. Odwirować nierozpuszczone pozostałości przez 2 min z prędkością 10 000 x g w temperaturze pokojowej.
4. Przenieść klarowny supernatant do kolumnki wiążącej.
 - Zwrócić uwagę aby nie przenieść osadu, jeżeli powstał w trakcie wirowania.
5. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g. Wylać przesącz i umieścić minikolumnę z powrotem w probówce odbierającej.

- 
6. Dodać 550 μ l buforu płuczącego **Wash BGX** do minikolumny. Wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
 7. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i umieścić minikolumnę z powrotem w probówce odbierającej.
 8. Dodać 300 μ l buforu płuczącego **Wash BGX** do minikolumny. Wirować przez 2 min z prędkością 11 000 x g.
 9. Minikolumnę umieścić w nowej probówce typu Eppendorf 1.5–2 ml. Dodać 60–150 μ l buforu **Elution**. Pozostawić na 2 min w temperaturze pokojowej.
 - o *Dodanie buforu elucyjnego 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 odpłukania z membran DNA genomowego można bufor Elution ogrzać do temp. 80°C.*
 10. Wirować przez 2 min z prędkością 11 000 x g.
 11. 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).

Homogenizacja tkanek za pomocą Tissue Grinding Tool

Tissue Grinding Tool (E0359) to wygodne narzędzie pozwalające na rozcieranie małych porcji tkanek roślinnych bądź zwierzęcych w ilościach odpowiadających jednej izolacji. Zestaw składa się z probówki 1.5 ml typu Eppendorf zawierającej niewielką ilość kulek szklanych pokrytych, dla podniesienia twardości, tlenkiem cyrkonu (E0359a) bądź nieregularnych fragmentów granatu (E0359b) oraz patyczka z końcówką o specjalnie dopasowanym kształcie. Tkanki można rozdrabniać w niewielkiej ilości roztworu lizującego bądź bez żadnych dodatków. W większości przypadków lepszy efekt homogenizacji można uzyskać rozcierając próbkę w małej objętości roztworu lizującego (50–150 μ l).



1. Do probówki z kulkami dodać 50–150 μ l uniwersalnego odczynnika do izolacji DNA (**GeDI**). Następnie dodać odpowiednią porcję tkanki roślinnej bądź zwierzęcej. Rozcierać próbkę obracając patyczkiem.
2. Wyjąć patyczek, dopełnić objętość roztworu **GeDI** do 1 ml. Worteksować kilka sekund bądź dokładnie wymieszać przez odwracanie probówki.
 - o Aby dokładniej rozdrobnić próbkę można kontynuować homogenizację używając *BeadTubeDry*. W tym celu należy przenieść wstępnie rozdrobnioną próbkę do *BeadTubeDry* i kontynuować protokół jak w przypadku opisanym dla bakterii gram dodatnich „Homogenizacja z użyciem *BeadTubeDry*”.
3. Przejdź do punktu 1 części protokołu Precypitacja 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.

GeDI



Uwaga

H302 Działa szkodliwie po połknięciu.

H315 Działa drażniąco na skórę.

H319 Działa drażniąco na oczy.

P264 Dokładnie umyć skórę po użyciu.

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.

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

Res Sol



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 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.

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

