



A&A BIOTECHNOLOGY
innovating life science

Bead-Beat Micro AX Gravity

Uniwersalny zestaw o zwiększonej wydajności do izolacji genomowego DNA z różnych materiałów.

Procedura z lizą mechaniczną.

wersja 1017

20 izolacji, 100 izolacji

Nr kat. 106-20, 106-100



Pojemność kolumny do oczyszczania DNA wynosi 20 µg.

Produkt przeznaczony wyłącznie do badań naukowych.

Skład zestawu

Składnik	20 izolacji	100 izolacji	Temp. Przechowywania
Kolumny Micro AXD	20 szt.	100 szt.	+4 do +8 °C
Probówki odbieralnikowe	20 szt.	100 szt.	Temp. Pok.
Probówki zawierające kuleczki cyrkonioowe (Zirconia/Silica)	20 szt.	100 szt.	Temp. Pok.
LSU bufor lizujący	24 ml	120 ml	Temp. Pok.
K1 roztwór równoważący	12 ml	55 ml	Temp. Pok.
W1G pierwszy roztwór płuczący	14 ml	70 ml	Temp. Pok.
W2 drugi roztwór płuczący	12 ml	60 ml	Temp. Pok.
E bufor elucyjny	5 ml	20 ml	+4 do +8 °C
N bufor zobojętniający	500 µl	1 ml	Temp. Pok.
Proteinaza K	600 µl	2 x 1,1 ml	+4 do +8 °C
Roztwór T	100 µl	400 µl	+4 do +8 °C

Wyposażenie i materiały niezbędne do izolacji DNA, które nie wchodzi w skład zestawu

1. Materiał do izolacji DNA
2. Urządzenie Beadbeater, np. Mini-Beadbeater firmy BioSpect lub Fast Prep 24 firmy MP
3. Probówki o poj. 1,5 ml typu Eppendorf
4. Probówki PCR (opcjonalnie)
5. Inkubator 50 °C (zalecany Thermomixer firmy Eppendorf)
6. Wortex
7. Mikrowirówka (opcjonalnie)

UWAGA:

Przed przystąpieniem do pracy zalecamy oczyszczenie powierzchni roboczej używając produktu LabZAP™ (nr kat. 040-500)

Ilustracje zamieszczone w niniejszym protokole mają jedynie charakter poglądowy. Ich rzeczywisty wygląd, w tym kolor, może odbiegać od prezentowanych w grafice.

Firma A&A Biotechnology udziela rocznej gwarancji na niniejszy zestaw. Firma nie gwarantuje poprawnego działania zestawu do izolacji DNA w wypadku:

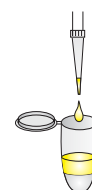
- odstąpienia od dostarczonego wraz z zestawem protokołu
- braku zalecanego w niniejszym protokole wyposażenia i materiałów
- użycia innych odczynników niż zalecane lub które nie wchodzi w skład zestawu
- użycia przeterminowanych lub niewłaściwie przechowywanych odczynników oraz kolumn

Protokół izolacji

1. Próbkę materiału w ilości:
 - A. Bakterie, pleśnie i drożdże z hodowli płynnych: 1–2 ml hodowli odwirować 5 min przy 10 000–12 000 RPM i usunąć supernatant;
 - B. Bakterie, pleśnie i drożdże z hodowli stałych: do 100 mg;
 - C. Fragmenty roślin: do 100 mg, fragmenty tkanek: do 20 mg;
 - D. Biologiczne próbki środowiskowe: do 200 mg;
 - E. Inne materiały biologiczne: do 50 mg.

2. Dodać po 1 ml buforu lizującego LSU oraz 20 µl proteiny K.

W przypadku izolacji DNA z drożdży zalecamy dodanie 10 µl 1M roztworu DTT (nie ma w zestawie, nr kat. 2010-5, 2010-25).



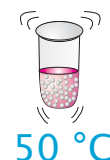
3. Przenieść zawiesinę do próbek zawierających kuleczki cyrkonowe.

Próbki umieścić w urządzeniu Beadbeater i przeprowadzić proces wytrząsania przy maksymalnej sile przez 30–60 s.



4. Próbkę inkubować przez 15–30 min w temp. 50 °C. Podczas inkubacji próbki należy kilkakrotnie worteksować.

Inkubację można przeprowadzić w urządzeniu Thermomixer firmy Eppendorf lub jego odpowiedniku, przy parametrach ciągłego mieszania przy 1400 RPM.

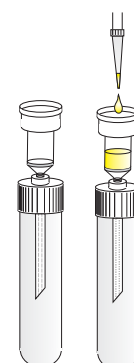


Opcjonalne usuwanie RNA. Patrz „Informacje dodatkowe” – str. 6.

5. Podczas inkubacji przygotować kolumny Micro AXD przez dokładne zamocowanie ich do próbek odbieralnikowych i umieszczenie w pozycji pionowej w statywie.

Następnie nanieść na kolumny Micro AXD po 500 µl roztworu równoważącego K1.

Dobłą praktyką jest nanoszenie roztworu K1 na ściankę kolumny tak, aby uniknąć przypadkowego zablokowania przepływu kolumny przez bąbełek powietrza uwięziony pomiędzy złożem a naniesionym roztworem K1.



Kolumna jest gotowa do użytku, gdy roztwór przestanie kapać z kapilary.

- Po inkubacji próbki wirować przez 5 min przy 12 000 RPM.
- Po wirowaniu pobrać klarowne supernatanty i nanieść je na zrównoważone uprzednio kolumny Micro AXD.

Poczekać, aż lizaty przejdą przez kolumny Micro AXD pod wpływem sił grawitacji. Zwykle trwa to do 10 min.

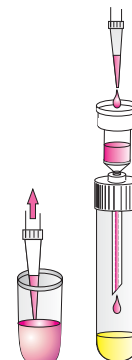
Prędkość przepływu przez kolumnę uzależniona jest od zawartości DNA w próbce.

UWAGA:

Dotyczy punktów 7.–9. protokołu izolacji.

W przypadku izolacji DNA z większej ilości prób (ponad 10) zalecamy odczekanie do 10 min, zamiast obserwowania zachowania się poszczególnych kolumn. Patrz „Uwagi” – str. 5.

W przypadku izolacji DNA z mniejszej ilości prób (do 10) należy obserwować czy lizat w całości przeszedł przez kolumnę. Gdy roztwór przestanie kapać z kapilary należy przejść do kolejnego punktu. Patrz „Uwagi” – str. 5.



- Nanieść na kolumny Micro AXD po 600 µl pierwszego roztworu płuczącego W1G. Poczekać, aż roztwór wypłynie z kolumn Micro AXD.
- Następnie dodać po 500 µl drugiego roztworu płuczącego W2. Poczekać, aż roztwór wypłynie z kolumn Micro AXD.

- Przed użyciem buforu elucyjnego E, zalecamy przeprowadzenie testu funkcjonalności. Patrz „Test funkcjonalności buforu elucyjnego E” – str. 6.

Dodać do kolumn Micro AXD po 60 µl buforu elucyjnego E i poczekać 5 min.

Krok ten ma na celu zmniejszenie całkowitej objętości eluatu, ponieważ martwa objętość kolumny wynosi około 60 µl.

Po użyciu buforu elucyjnego E należy zawsze szczelnie zakręcać pojemnik. Składniki buforu elucyjnego E ulegają rozkładowi przy długotrwałym kontakcie z powietrzem.

Bufor elucyjny E należy zawsze przechowywać w temp. od +4 do +8 °C.



11. Przygotować probówki elucyjne (nie ma w zestawie). Mogą to być jałowe probówki 1,5 ml typu Eppendorf. Dodać na ich dno po 5 μ l buforu zobojętniającego N.

Zobojętnianie próbek DNA. Patrz “Informacje dodatkowe” – str. 6.

12. Przenieść kolumny Micro AXD do przygotowanych probówek elucyjnych.



13. Eluować DNA przez naniesienie na złożę kolumn Micro AXD po 120 μ l buforu elucyjnego E. Odczekać 10 min, aż roztwór całkowicie wypłynie z kolumn Micro AXD.

Brak elucji po tym czasie oznacza bardzo dużą ilość DNA w próbce. W takim przypadku zaleca się odwirowanie probówki z kolumną przez 30 s–1 min przy 5000 RPM.



Po użyciu buforu elucyjnego E należy zawsze szczelnie zakręcać pojemnik. Składniki buforu elucyjnego E ulegają rozkładowi przy długotrwałym kontakcie z powietrzem. Bufor elucyjny E należy zawsze przechowywać w temp. od +4 do +8 °C.

14. Usunąć kolumny Micro AXD i zamknąć probówki elucyjne.

Uwagi

Problem	Przyczyna	Rozwiązanie
Wolny przepływ próbki przez kolumnę	Bardzo duża ilość DNA w próbce	Kolumnę można odwirować po umieszczeniu jej uprzednio w probówce typu Eppendorf. Przy kolejnej izolacji należy zmniejszyć o połowę ilość próbki badanej.
Pęcherzyki powietrza w drenie probówki odbieralnikowej	Niedokładne zamocowanie kolumny na probówce odbieralnikowej	Zalecamy “dokręcenie” kolumny. Uwięzione w drenie pęcherzyki powietrza można usunąć poprzez uniesienie probówki z kolumną na 1–2 cm i opuszczenie jej.

Informacje dodatkowe

Opcjonalne usuwanie RNA. Jeżeli zależy nam na całkowitym usunięciu RNA, to do próbki należy dodać 5 μ l RNAzy (10 mg/ml) (nie ma w zestawie, nr kat. 1006-10, 1006-50), a następnie całość wymieszać i pozostawić na 5 min w temp. pokojowej. Następnie przejść do punktu 4. protokołu izolacji.

Zobojętnianie próbek DNA. Bufor elucyjny E jest silnie alkaiczny i po zamrożeniu może powodować degradację DNA. Z tego powodu konieczne jest stosowanie buforu zobojętniającego N. Z naszej praktyki laboratoryjnej wynika, że najwygodniej jest dodać bufor zobojętniający N przed elucją DNA, do pustej probówki elucyjnej (punkt 11. protokołu izolacji).

W trakcie elucji, zawieszona w buforze elucyjnym DNA wymiesza się z buforem zobojętniającym N i ulegnie natychmiastowej neutralizacji. Po dodaniu bufora zobojętniającego N – DNA będzie zawieszona w roztworze 10 mM Tris pH 8,5.

Jeżeli bufor zobojętniający N nie został dodany w punkcie 11. protokołu, to można dodać go po zakończonej izolacji – przed zamrożeniem próbek DNA.

Test funkcjonalności buforu elucyjnego E

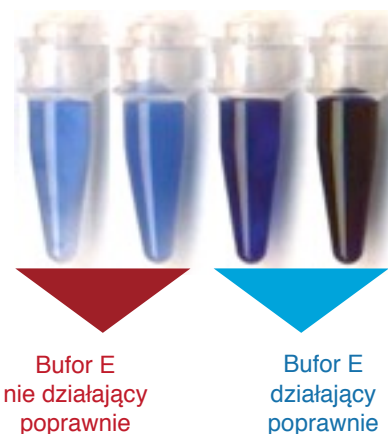
Bufor elucyjny E ma kluczowy wpływ na wydajność elucji DNA. Jego prawidłowe działanie można sprawdzić za pomocą roztworu T wchodzącego w skład zestawu.

Kiedy przeprowadzić test funkcjonalności:

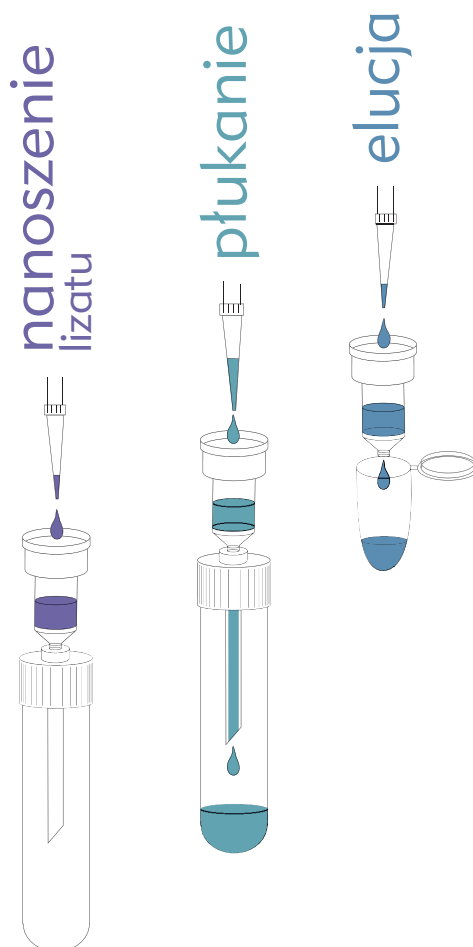
- Bufor E nie był używany przez min. 2 miesiące
- Bufor E był przechowywany w temp. pokojowej przez min. 2 tygodnie
- Fiolka zawierająca bufor E nie została szczelnie zamknięta po użyciu

Protokół

1. Przenieść **20 μ l** buforu **E** do nowej probówki PCR
2. Dodać po **2 μ l** roztworu **T**. Całość wymieszać
3. Poczekać **2 min**
4. Porównać kolor mieszaniny ze zdjęciem obok przedstawiającym kolory referencyjne



Technologia Gravity flow



Produkty oparte na technologii Gravity flow

Produkt	Ilość	Materiał	Nr. kat
Plasmid Mini AX Gravity	100 izolacji	Plazmidy	015-100
Genomic Micro AX Swab Gravity	100 izolacji	Wymazy	105-100
Genomic Micro AX Swab Gravity Plus	100 izolacji + wymazówki	Wymazy	105-100P
Genomic Micro AX Bacteria Gravity	100 izolacji	Bakterie	102-100
Genomic Micro AX Bacteria+ Gravity	100 izolacji	Bakterie G+	102-100M
Genomic Micro AX Plant Gravity	100 izolacji	Rośliny	103-100
Genomic Micro AX Blood Gravity	100 izolacji	Krew	101-100
Genomic Micro AX Tissue Gravity	100 izolacji	Tkanki	104-100

Informacje bezpieczeństwa



NIEBEZPIECZEŃSTWO

Proteinaza K

H315 Działa drażniąco na skórę.

H319 Działa drażniąco na oczy.

H334 Może powodować objawy alergii lub astmy lub trudności w oddychaniu w następstwie wdychania.

H335 Może powodować podrażnienie dróg oddechowych.

P261 Unikać wdychania pyłu.

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.

P342+P311 W przypadku wystąpienia objawów ze strony układu oddechowego skontaktować się z Ośrodkiem Zatruc lub lekarzem.



UWAGA

LSU bufor lizujący

H302 Działa szkodliwie po połknięciu.

H315 Działa drażniąco na skórę.

H319 Działa drażniąco na oczy.

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.



UWAGA

K1 roztwór równoważący

H302 Działa szkodliwie po połknięciu.

H315 Działa drażniąco na skórę.

H319 Działa drażniąco na oczy.

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.



UWAGA

W1G pierwszy roztwór płuczący

H302 Działa szkodliwie po połknięciu.

H315 Działa drażniąco na skórę.

H319 Działa drażniąco na oczy.

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.



NIEBEZPIECZEŃSTWO

E bufor elucyjny

H314 Powoduje poważne oparzenia skóry oraz uszkodzenia oczu.

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.

P310 Natychmiast skontaktować się z Ośrodkiem Zatruc lub lekarzem.