A&A BIOTECHNOLOGY
innovating life science

*Instrukcja*

# Genomic Mini AX Milk Spin

Zestaw o zwiększonej wydajności do izolacji genomowego DNA z próbek mleka.

| numer katalogowy | wielkość |
|---|---|
| 059-100S | 100 izolacji |

Produkt przeznaczony wyłącznie do badań naukowych.

**Gwarancja**
Firma A&A Biotechnology udziela gwarancji na niniejszy produkt.
Firma nie gwarantuje poprawnego działania produktu w przypadku:

- odstępstwa od dostarczonego wraz z produktem protokołu
- braku zalecanego w niniejszym protokole wyposażenia i materiałów
- użycia innych odczynników niż zalecane lub które nie wchodzą w skład produktu
- użycia przeterminowanych odczynników oraz elementów produktu

# Spis treści

**Skład** **3**
**Dodatkowy sprzęt i odczynniki** **3**
Niezbędne 3
Opcjonalne 3
**Ważne informacje** **4**
**Przygotowanie materiału** **4**
**Protokół izolacji** **5**
Zobojętnianie próbek DNA 6
Test funkcjonalności buforu E 6
**Informacje Bezpieczeństwa** **7**

# Skład

| składnik | 100 izolacji | przechowywanie |
|---|---|---|
| **Kolumny Mini AX Spin** | 100 szt. | 2–8 °C |
| **Probówki 2 ml** | 200 szt. | 15–25 °C |
| **LSU** bufor lizujący | 50 ml | 15–25 °C |
| **W1** pierwszy roztwór płuczący | 140 ml | 15–25 °C |
| **W2** drugi roztwór płuczący | 60 ml | 15–25 °C |
| **E** bufor elucyjny (nie zawiera EDTA) | 20 ml | 2–8 °C |
| **N** bufor zobojętniający | 1 ml | 15–25 °C |
| **T** roztwór | 400 µl | 2–8 °C |
| **Proteinaza K** | 2 x 1,1 ml | 2–8 °C |

Pojemność kolumny do oczyszczania DNA wynosi 15 µg.

# Dodatkowy sprzęt i odczynniki

## Niezbędne

- Probówki 1,5 ml typu Eppendorf
- Probówki 15 ml typu Falcon
- Bufor PBS lub bufor TE (nr kat. K-TE-5, K-TE-100)
- Inkubator lub termoblok 50 °C (zalecany Thermomixer firmy Eppendorf)
- Worteks
- Mikrowirówka, wirówka z chłodzeniem na probówki 15 ml

## Opcjonalne

- RNAza (nr kat. 1006-10, 1006-50)

# Ważne informacje

- 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. 2-8 °C.

# Przygotowanie materiału

1. Umieścić **5-10 ml** próbki mleka w probówce 15 ml typu Falcon (nie ma w zestawie).
2. Wirować przez **10 min** przy **5000 RPM (4500 x g)**.

   Podczas wirowania, w górnej części probówki zbiera się śmietana. Tworzy ona rodzaj "korka", który mocno przywiera do ścianek probówki. Po wirowaniu zalecamy okrążyć brzeg probówki tipsem, aby ułatwić usunięcie "korka" i uwolnienie supernatantu.
3. Usunąć supernatant.
4. Do osadu dodać po **10 ml** buforu **PBS** lub buforu **TE** (nie ma w zestawie).
5. Wirować przez **10 min** przy **5000 RPM (4500 x g)**.

   Na dnie probówki znajduje się wyraźny biały osad.
6. Usunąć supernatant.
7. Do osadu dodać po **500-600 µl** buforu **PBS** lub buforu **TE** (nie ma w zestawie).

   Objętość buforu PBS lub buforu TE można zwiększać w zależności od ilości otrzymanego osadu. Jednak całkowita objętość próbki nie może przekroczyć 1,5 ml.
8. Całość przenieść do nowej probówki 1,5 ml (nie ma w zestawie).
9. Wirować przez **5 min** przy **8000 RPM (6000 x g)**..
10. Usunąć supernatant.
11. Przejść do punktu 1. protokołu izolacji.

# Protokół izolacji

1. Dodać po **400 µl** buforu lizującego **LSU** i **20 µl proteinazy K**.

2. Próbkę zworteksować i inkubować przez **60 min** w temp. **50 °C**.

   Podczas inkubacji próbkę należy kilkakrotnie worteksować.

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

   **Opcjonalne usuwanie RNA:** do próbki należy dodać po 5 µl RNAzy (10 mg/ml) (nie ma w zestawie). Całość wymieszać i pozostawić próbkę na 5 min w temp. pokojowej.

3. Po inkubacji próbkę intensywnie worteksować przez **2 min** przy **1000-1400 RPM**.

   Ten krok jest kluczowy dla wydajności izolacji DNA.

4. Próbkę wirować przez **5 min** przy **8 000 x g.**

   Na dnie probówki powinien znajdować się zwarty osad stanowiący mieszaninę niezlizowanego materiału.

5. Nanieść próbkę na kolumnę Mini AX Spin znajdującą się w 2 ml probówce.

6. Wirować przez **30-60 s** przy **8 000 x g**.

7. Wyjąć kolumnę Mini AX Spin z probówki i umieścić ją w **nowej** probówce **2 ml** (w zestawie).

8. Nanieść po **600 µl** pierwszego roztworu płuczącego **W1.**
   Wirować przez **30-60 s** przy **8 000 x g**.

9. Wyjąć kolumnę Mini AX Spin z probówki. Usunąć supernatant.
   Umieścić kolumnę Mini AX Spin w **tej samej** probówce **2 ml**.

10. Nanieść po **600 µl** pierwszego roztworu płuczącego **W1.**
    Wirować przez **30-60 s** przy **8 000 x g**.

11. Wyjąć kolumnę Mini AX Spin z probówki i umieścić ją w **nowej** probówce **2 ml** (w zestawie).

12. Nanieść po **500 µl** drugiego roztworu płuczącego **W2.**
    Wirować przez **30-60 s** przy **14 000-21 000 x g**.

13. Przygotować probówki elucyjne (nie ma w zestawie). Mogą to być jałowe probówki 1,5 ml typu Eppendorf.
Dodać na dno probówki elucyjnej po **5 µl** buforu zobojętniającego **N**.

Zobojętnianie próbek DNA - str. 6.

14. Przenieść kolumnę Mini AX Spin do przygotowanej probówki elucyjnej.

15. Przed użyciem buforu elucyjnego E zalecamy przeprowadzenie testu funkcjonalności - str. 6.

Nanieść po **100-150 µl** buforu elucyjnego **E** na kolumnę Mini AX Spin.
Zostawić na **2 min** w **temp. pokojowej**.

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 2-8 °C.

16. Wirować przez **30-60 s** przy **14 000-21 000 x g**.

17. Usunąć kolumnę Mini AX Spin i zamknąć probówkę elucyjną zawierającą DNA.

## Zobojętnianie próbek DNA

Bufor elucyjny E jest silnie alkaliczny 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.
W trakcie elucji, zawieszone w buforze elucyjnym DNA wymiesza się z buforem zobojętniającym N i ulegnie natychmiastowej neutralizacji. Będzie zawieszone w roztworze 10 mM Tris pH 8,5.
Jeżeli bufor zobojętniający N nie został dodany przed elucją DNA, to można dodać go po zakończonej izolacji - przed zamrożeniem próbek DNA.

## Test funkcjonalności buforu 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.

**Test funkcjonalności:**
Przenieść 20 µl buforu E do probówki PCR; dodać po 2 µl roztworu T; całość wymieszać, poczekać 2 min.
Porównać kolor mieszaniny ze zdjęciem przedstawiającym kolory referencyjne.

# 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 Zatruć 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.

NIEBEZPIECZEŃSTWO

### W1 pierwszy roztwór płuczący

H225 Wysoce łatwopalna ciecz i pary.
H319 Działa drażniąco na oczy.
H336 Może wywoływać uczucie senności lub zawroty głowy.
P210 Przechowywać z dala od źródeł ciepła, gorących powierzchni, iskrzenia, otwartego ognia i innych źródeł zapłonu. Palenia wzbronione.
P261 Unikać wdychania par.
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 Zatruć lub lekarzem.

A&A BIOTECHNOLOGY
innovating life science

A&A Biotechnology, ul. Strzelca 40, 80-299 Gdańsk
tel. 883 323 761, 600 776 268
info@aabiot.com, www.aabiot.com

wersja 2023-1