



**A&A BIOTECHNOLOGY**  
innovating life science

## Instrukcja

# Genomic Mini AX Streptomyces

Zestaw o zwiększonej wydajności do izolacji genomowego DNA z bakterii rodzaju *Streptomyces*.  
Procedura z precypitacją DNA.

numer katalogowy	wielkość
066-60	60 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 wchodzi w skład produktu
- użycia przeterminowanych odczynników oraz elementów produktu

# Spis treści

<b>Skład</b>	<b>3</b>
<b>Dodatkowy sprzęt i odczynniki</b>	<b>3</b>
Niezbędne	3
Opcjonalne	3
<b>Ważne informacje</b>	<b>4</b>
<b>Protokół</b>	<b>4</b>
<b>Informacje dodatkowe</b>	<b>6</b>
<b>Informacje bezpieczeństwa</b>	<b>7</b>

## Skład

składnik	60 izolacji	przechowywanie
<b>Kolumny Genomic Mini AX</b>	60 szt.	2-8 °C
<b>Probówki 2 ml</b>	60 szt.	15-25 °C
<b>BS bufor do zawieszania</b>	15 ml	2-8 °C
<b>DTT (dithiothreitol)</b>	154 mg	2-8 °C
<b>LS zawiesina lizująca</b>	100 ml	15-25 °C
<b>K1 roztwór równoważący</b>	55 ml	15-25 °C
<b>K2 roztwór płuczący</b>	190 ml	15-25 °C
<b>K3 roztwór elucyjny</b>	90 ml	15-25 °C
<b>PM mieszanina precypitacyjna</b>	55 ml	15-25 °C
<b>Bufor Tris</b> (10 mM Tris-HCl, pH 8,5)	10 ml	15-25 °C
<b>Lizozym</b>	1,1 ml	-20 °C
<b>Mutanolizyna</b>	1,1 ml	-20 °C
<b>Proteinaza K</b>	1,3 ml	2-8 °C

Pojemność minikolumny do oczyszczania DNA wynosi 20 µg.

## Dodatkowy sprzęt i odczynniki

### Niezbędne

- Probówki 1,5 ml, 2 ml typu Eppendorf
- 70% etanol
- Inkubator lub termoblok 50 °C (zalecany Thermomixer firmy Eppendorf)
- Worteks
- Mikrowirówka

### Opcjonalne

- RNAza (nr kat. 1006-10, 1006-50)
- Woda jałowa (nr kat. 003-075, 003-25)
- Bufor TE (nr kat. 297-100)

## Ważne informacje

- Proces oczyszczania DNA na kolumnie można przerwać w dowolnym momencie i kontynuować nawet po upływie 15 godzin bez wpływu na jakość i ilość uzyskanego DNA. Podczas takiej przerwy należy pamiętać o zamknięciu probówki, w której znajduje się kolumna.
- Przed rozpoczęciem procesu izolacji należy **przygotować roztwór 1M DTT**. W tym celu do fiolki z DTT należy dodać 1 ml jałowej wody (nie ma w zestawie) i proszek całkowicie rozpuścić. Roztwór należy przechowywać w temp. -20 °C.

## Protokół

1. Zwirować **1-3 ml** nocnej hodowli bakteryjnej. Usunąć supernatant. Osad bakteryjny zawiesić w **200 µl** buforu **BS** do zawieszania bakterii.
2. Dodać po **10 µl lizozymu**, **10 µl mutanolizyny** oraz po **10 µl 1M DTT**.  
Całość wymieszać i inkubować przez **30 min** w temp. **50 °C**.
3. **Uwaga:** Zawiesinę lizującą **LS** należy wymieszać przed użyciem przez kilkakrotne odwracanie butelki.  
Dodać po **1,5 ml** zawiesiny lizującej **LS** i **20 µl** **proteiny K**.
4. Próbkę zworteksować i inkubować przez **30 min** w temp. **50 °C**. Podczas inkubacji próbki kilkakrotnie mieszać przez odwracanie probówki.  
  
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.
5. W trakcie inkubacji przygotować kolumny Genomic Mini AX będące w probówkach 15 ml. Nanieść na kolumnę po **800 µl** roztworu równoważącego **K1**. Poczekać, aż roztwór wypłynie z kolumny.
6. Po inkubacji próbkę intensywnie worteksować przez **15 s**.  
Wirować przez **5 min** przy **10 000-14 000 RPM**.  
  
Na dnie probówki powinien znajdować się zwarty osad stanowiący mieszaninę niezliwowanego materiału oraz drobinek pochodzących z zawiesiny lizującej.
7. Pobrać supernatant i w całości nanieść na zrównoważoną kolumnę Genomic Mini AX. Poczekać, aż lisat wypłynie z kolumny.  
  
Kolumna pracuje grawitacyjnie. Szybkość przepływu zależy od ilości oraz wielkości cząstek DNA. Duża ilość DNA powoduje spowolnienie przepływu, a przy znacznym przeładunku kolumny może dojść nawet do całkowitego jej zablokowania. W takim przypadku należy wirować kolumny wraz z probówkami w rotorze uchylnym przez 1 min przy 3000-4000 RPM. Wirowanie można przeprowadzić zarówno po naniesieniu próbek (pkt 7) jak i podczas płukania roztworem płuczącym K2 (pkt 8 i 9) i przy elucji roztworem elucyjnym K3 (pkt 10).

8. Nanieść po **1,5 ml** roztworu płuczącego **K2** na kolumnę Genomic Mini AX. Poczekać, aż roztwór wypłynie z kolumny.
9. Ponownie nanieść po **1,5 ml** roztworu płuczącego **K2** na kolumnę Genomic Mini AX. Poczekać, aż roztwór wypłynie z kolumny.
10. Nanieść po **100 µl** roztworu elucyjnego **K3** bezpośrednio na membranę kolumny Genomic Mini AX. Poczekać, aż eluat wypłynie z kolumny.  
**Uwaga:** Krok ten ma na celu zmniejszenie całkowitej objętości eluatu, gdyż martwa objętość kolumny wynosi 100 µl.
11. Przenieść kolumnę Genomic Mini AX do probówki precypitacyjnej **2 ml** (w zestawie).  
**Uwaga:** Kolumna posiada odpowiednie żeberka pozwalające na łatwe umieszczenie jej w probówce.
12. Nanieść po **1 ml** roztworu elucyjnego **K3** na kolumnę Genomic Mini AX. Poczekać, aż eluat wypłynie z kolumny. Usunąć kolumnę Genomic Mini AX.
13. **Uwaga:** Mieszanina precypitacyjna PM zawiera dodatkowo wzmacniacz precypitacji, dlatego przed użyciem należy ją wymieszać przez kilkakrotne odwracanie butelki.  
  
Do eluatów dodać po **800 µl** mieszaniny precypitacyjnej **PM**.
14. Wymieszać i wirować przez **10 min** przy **10 000 RPM**.  
  
Na dnie powinien być widoczny jasnoniebieski osad DNA.
15. Ostrożnie zlać supernatant, tak aby nie usunąć niebieskiego osadu DNA.  
  
**Uwaga:** W trakcie zlewania supernatantu łatwo wylać osad DNA. Dla bezpieczeństwa zaleca się wylewać supernatant do przygotowanej probówki, tak aby można było go odzyskać.
16. Dodać po **500 µl 70% etanolu** (nie ma w zestawie). Całość wymieszać i wirować przez **3 min** przy **10 000 RPM**.  
  
Na dnie powinien być widoczny jasnoniebieski osad DNA.
17. Ostrożnie zlać supernatant, tak aby nie usunąć niebieskiego osadu DNA.  
  
**Uwaga:** W trakcie zlewania supernatantu łatwo wylać osad DNA. Dla bezpieczeństwa zaleca się wylewać supernatant do przygotowanej probówki, tak aby można było go odzyskać..
18. Odwrócić probówkę z osadem DNA i suszyć odwróconą do góry dnem przez **5 min** w **temp. pokojowej**.  
  
**Uwaga:** Jeżeli na ściankach probówki wciąż znajdują się resztki alkoholu, należy je osuszyć przy pomocy patyczków higienicznych.

19. Zawiesić osad DNA w odpowiedniej ilości buforu **Tris** (w zestawie), buforu **TE** lub **wody jałowej wolnej od nukleaz** (nie ma w zestawie).

Niebieska barwa osadu umożliwia śledzenie procesu rozpuszczania DNA.

20. Oczyszczone DNA przechowywać w temp.  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do czasu dalszych analiz.

## Informacje dodatkowe

**Przerwa w procesie izolacji.** Proces oczyszczania DNA na kolumnie można przerwać w dowolnym momencie i kontynuować nawet po upływie 15 godzin bez wpływu na jakość i ilość uzyskanego DNA. Podczas takiej przerwy należy pamiętać o zamknięciu probówki, w której znajduje się kolumna.

Objętość płynu w probówce pozwala na łatwe zorientowanie się na jakim etapie zostało przerwane oczyszczanie:

- ~ 0,5 ml - po zrównoważeniu kolumny;
- ~ 2 ml - po przejściu lizatu;
- ~ 3,5 ml - po pierwszym płukaniu roztworem płuczącym K2;
- ~ 5 ml - po drugim płukaniu roztworem płuczącym K2.

**Grawitacyjna praca kolumny.** Kolumna pracuje grawitacyjnie. Szybkość przepływu zależy od ilości oraz wielkości cząstek DNA. Duża ilość DNA powoduje spowolnienie przepływu, a przy znacznym przeładowaniu kolumny ( $>20\text{ }\mu\text{g}$  DNA) może dojść nawet do całkowitego jej zablokowania. W takim przypadku należy wirować kolumny wraz z probówkami w rotorze uchylnym przez 1 min przy 3000-4000 RPM. Wirowanie można przeprowadzić zarówno po naniesieniu próbek, jak i podczas płukania roztworem płuczącym K2, a także przy elucji roztworem elucyjnym K3. Przy elucji należy przenieść kolumnę do nowej probówki 15 ml (nie ma w zestawie). Nanieść na kolumnę po 1 ml roztworu elucyjnego K3. Począkać 2 min i wirować przez 1 min przy 3000 RPM. Przenieść eluat do probówek precipitacyjnych 2 ml (w zestawie). Następnie przejść do punktu 13. protokołu.

# 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 Zatrucia lub lekarzem.



**UWAGA**

## DTT (dithiothreitol)

H302 Działa szkodliwie po połknięciu.  
 H315 Działa drażniąco na skórę.  
 H319 Działa drażniąco na oczy.  
 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.



**UWAGA**

## LS zawieszina lizująca

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.



**NIEBEZPIECZEŃSTWO**

## K2 roztwór płuczący

H225 Wysoce łatwopalna ciecz i pary.  
 H319 Działa drażniąco na oczy.  
 H336 Może wywoływać uczucie sennaści 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**

## K3 roztwór elucyjny

H225 Wysoce łatwopalna ciecz i pary.  
 H319 Działa drażniąco na oczy.  
 H336 Może wywoływać uczucie sennaści 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**

## PM mieszanina precypitacyjna

H225 Wysoce łatwopalna ciecz i pary.  
 H319 Działa drażniąco na oczy.  
 H336 Może wywoływać uczucie sennaści 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.



**A&A BIOTECHNOLOGY**  
innovating life science

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

wersja 2023-1

