syngen.pl kolumienki.pl

Syngen Blood/Cell DNA Maxi Kit

Zawartość opakowania i warunki przechowywania

Syngen Blood/Cell DNA Maxi Kit	SY221030	SY221031
Liczba izolacji	**10**	**24**
Bufor DLK	110 ml	265 ml
Bufor DP1	33 ml	88 ml
Bufor DP2	20 ml	40 ml
Bufor DE	30 ml	60 ml
Kolumna DK Maxi	10 szt.	24 szt.
Probówki 50 ml	10 szt.	24 szt.
Proteinaza K	11 mg x10	11 mg x24

Kolumny DK Maxi, a także wszystkie roztwory poza rozpuszczoną proteinazą K, powinny być przechowywane w temperaturze pokojowej (15-25°C), chyba że na butelce określono inaczej.

Proteinazę K po rozpuszczeniu należy przechowywać w 4°C.

Sprzęt i odczynniki potrzebne do wykonania procedury, a niedostarczone z zestawem

Do wszystkich protokołów:
- Etanol (96-100%)
- Probówki 50 ml
- Statyw
- Sterylne końcówki do pipet (najlepiej z filtrem)
- Pipety automatyczne nastawne
- Wirówka z rotorem wychylnym
- Worteks
- Inkubator, łaźnia wodna lub blok grzejny na 60°C
- Piec próżniowy na 70°C (w niektórych sytuacjach)
- PBS (w niektórych sytuacjach)
- RNaza 100 mg/ml (opcjonalnie)

Przygotowanie odczynników przed pierwszym użyciem

Proteinaza K

Proteinaza K jest dostarczana w postaci liofilizowanej. Aby przygotować porcję roztworu roboczego, probówkę zawierającą liofilizat proteinazy K należy krótko zwirować, dodać

- 500 µlwody destylowanej (czystości do PCR) – do probówki z 11 mg

Następnie zamknąć probówkę i dokładnie wymieszać, aż do całkowitego rozpuszczenia. Po rozpuszczeniu roztwór roboczy proteinazy K należy przechowywać w temperaturze 4°C.

Bufory płuczące

Bufory płuczące DP1 i DP2 są dostarczane jako koncentraty. Przed pierwszym użyciem dodaj do nich odpowiednią ilość etanolu (96-100%) i starannie wymieszaj.

Poniższa tabela przedstawia sposób przygotowania buforów płuczących.

Syngen Blood/Cell DNA Maxi Kit	SY221030	SY221031
Liczba izolacji	**10**	**24**
Objętość etanolu, jaką należy dodać do koncentratu buforu płuczącego DP1	12 ml	32 ml
Objętość etanolu, jaką należy dodać do koncentratu buforu płuczącego DP2	80 ml	160 ml

Bufory DP1 i DP2 po dodaniu etanolu powinny być szczelnie zamknięte i przechowywane w temperaturze pokojowej. Przed rozpoczęciem procedury zawsze wymieszaj rozpuszczone bufory przez obrócenie butelki kilka razy.

Materiał wyjściowy

Ilość materiału na 1 izolację: 3-10 ml świeżej lub mrożonej krwi lub $1x10^8$ komórek.

Próbki pełnej krwi podczas pobierania powinny być zabezpieczone przed koagulacją. W tym celu należy zastosować antykoagulant – EDTA lub cytrynian. Heparyna jest również dozwolona, jednak nie zalecamy jej stosowania, gdyż nawet śladowe jej ilości po przedostaniu się do eluatu mogą stać się inhibitorem reakcji PCR.

Kożuszek leukocytarny to potoczna nazwa białego osadu powstającego na granicy osocza i komórek opadających w stojącej nieruchomo probówce po pobraniu krwi. Frakcja ta jest bogata w WBC, głównie leukocyty. Zastosowanie do izolacji 10 ml kożuszka leukocytarnego zamiast 10 ml pełnej krwi zwiększa około 10-krotnie wydajność izolacji DNA. Aby przygotować kożuszek leukocytarny, krew pobraną na antykoagulant mieszamy z 5-krotnie większą objętością buforu RLE, przy czym objętość krwi musi być taka, żeby ilość komórek nie przekraczała $1x10^8$. Następnie Inkubujemy przez 10 minut na lodzie mieszając co jakiś czas przez odwrócenie probówki, wirujemy z prędkością 3500-4500 x g przez 1-2 minuty w temperaturze pokojowej i usuwamy supernatant. Powstały biało-różowy osad WBC ma wystarczająca czystość do izolacji DNA. Zawieszamy go w 10 ml PBS i stosujemy jako próbkę.

Komórki z hodowli przygotowuje się do izolacji poprzez zebranie i przemycie w PBS. Komórki rosnące w zawiesinie należy odwirować i zawiesić w PBS. Komórki rosnące w monowarstwie należy zebrać przy pomocy trypsyny lub zeskrobać z powierzchni, odwirować i zawiesić w PBS. W każdym przypadku zalecamy dokładne określenie ilości komórek.

Ilość komórek rosnących w monowarstwie można określić na podstawie powierzchni hodowli. Należy przyjąć, że 1 cm^2 hodowli zawiera od $1x10^5$ do $1,5 x10^5$ komórek.

Zanim zaczniesz

1. Do buforów DP1 i DP2 dodaj odpowiednią ilość 96-100% etanolu.

2. Przygotuj roztwór proteinazy K.
3. Nastaw inkubator na 60°C.
4. Podgrzej bufor do elucji do 60°C.

PROTOKÓŁ 1
IZOLACJA DNA Z KRWI PEŁNEJ I KOŻUSZKA LEUKOCYTARNEGO

1. W 50 ml probówce (nie dostarczono) umieść maksymalnie 10 ml próbki i dodaj 500 µl proteinazy K. Zamknij probówkę i wymieszaj na worteksie.

   ⇨ Próbki o objętości mniejszej niż 10 ml powinny zostać dopełnione przy użyciu PBS do objętości 10 ml.

2. Dodaj 10 ml buforu DLK, zamknij probówkę i wymieszaj pulsacyjnie na worteksie.

   ⇨ Nie dodawaj proteinazy K bezpośrednio do buforu DLK.

3. Inkubuj próbkę przez 15 minut w temperaturze 60°C

   Podczas inkubacji obróć próbkę 3-5 krotnie.

4. Opcja: trawienie RNA. Jeżeli potrzebujesz DNA wolne od RNA, po inkubacji dodaj 80 µl RNazy A 100 mg/ml (nie dostarczono), zamknij wieczko i wymieszaj. Inkubuj przez 10 minut w temperaturze pokojowej.

5. Do próbki dodaj 10 ml etanolu, zamknij probówkę i wymieszaj na worteksie. Jeśli pojawi się osad, spróbuj rozpuścić go pipetując.

6. Umieść kolumnę DK Maxi w probówce wirówkowej 50 ml (nie dostarczono). Przenieś 15 ml próbki wraz z ewentualnym osadem na kolumnę DK Maxi. Zamknij wieczko.

7. Wiruj przez 3 minuty z prędkością 4.000-6.000 x g. Odrzuć supernatant, a kolumnę przenieś z powrotem do tej samej probówki.

8. Przenieś resztę próbki na kolumnę. Zamknij wieczko i wiruj przez 3 minuty z prędkością 4.000-6.000 x g. Odrzuć supernatant, a kolumnę przenieś z powrotem do tej samej probówki.

9. Na kolumnę przenieś 4 ml buforu DP1. Zamknij wieczko i wiruj przez 3 minuty z prędkością 4.000-6.000 x g. Odrzuć supernatant, a kolumnę przenieś z powrotem do tej samej probówki.

10. Na kolumnę przenieś 7 ml buforu DP2. Zamknij wieczko i wiruj przez 15 minut z prędkością 4.000-6.000 x g. Odrzuć supernatant, a kolumnę przenieś z powrotem do tej samej probówki.

    ⇨ Upewnij się, czy na kolumnie po wirowaniu nie pozostał bufor. Być może będzie potrzebne dodatkowe wysuszenie kolumny poprzez umieszczenie jej w piecu próżniowym w temperaturze 70°C na 3 minuty.

11. Przenieś kolumnę do nowej 50 ml probówki (dostarczono).

12. Na środek membrany dodaj 0,75-1,5 ml uprzednio podgrzanego buforu do elucji DE i inkubuj w RT przez 5 minut. Zamknij wieczko.

    ⇨ Jeśli zajdzie potrzeba otrzymania wyższej wydajności izolacji DNA, powtórz krok elucji (11.).

13. Wiruj przez 2 minuty z prędkością 4.000 x g.

PROTOKÓŁ 2
IZOLACJA DNA Z HODOWLI KOMÓRKOWYCH

1. W 50 ml probówce (nie dostarczono) umieść maksymalnie $1x10^8$ komórek. Zamknij probówkę. Wiruj przez 5 minut z prędkością 4.000-6.000 x g.

2. Zawieś komórki w 10 ml PBS.

3. Kontynuuj Protokół 1 do izolacji DNA z krwi pełnej od punktu 4.

Producent

Syngen Biotech Sp. z o.o. Sp. k.
54-116 Wrocław, ul. Ostródzka 13
tel. 71 349 70 13, 71 349 91 66, 71 349 61 67, faks 71 349 70 33
kolumienki.pl, syngen.pl, info@syngen.pl