

## **Syngen Plant DNA Mini & Maxi Kit**

Zestawy do izolacji całkowitego DNA z próbek:

- świeżych tkanek roślinnych
- suszonych tkanek roślinnych
- mrożonych tkanek roślinnych
- tkanek bogatych w polisacharydy (tylko Maxi)
- komórek roślinnych hodowanych w zawiesinie

**Instrukcja dla użytkownika, w. 2018.01**

## Spis treści

Informacje wstępne	3
Ograniczenia	3
Zawartość zestawów	4
Przechowywanie	4
Sprzęt i odczynniki potrzebne do wykonania procedury, a niedostarczone z zestawem	5
Przygotowanie odczynników przed pierwszym użyciem	5
Materiał wyjściowy i wydajność DNA	6
Homogenizacja	8
Ogólne wytyczne dotyczące obsługi zestawów Syngen	9
Elucja DNA	10

### Protokoły do zestawu Syngen Plant DNA Mini

<b>Protokół 1: Izolacja DNA z tkanek roślinnych świeżych, mrożonych lub liofilizowanych</b>	<b>12</b>
---	-----------

<b>Protokół 2: Izolacja DNA z komórek roślinnych hodowanych w zawiesinie</b>	<b>15</b>
--	-----------

### Protokoły do zestawu Syngen Plant DNA Maxi

<b>Protokół 3: Izolacja DNA z tkanek roślinnych świeżych, mrożonych lub liofilizowanych</b>	<b>16</b>
---	-----------

<b>Protokół 4: Izolacja DNA z tkanek roślinnych świeżych, mrożonych lub liofilizowanych bogatych w polisacharydy</b>	<b>19</b>
--	-----------

<b>Protokół 5: Izolacja DNA z komórek roślinnych hodowanych w zawiesinie</b>	<b>20</b>
--	-----------

Samodzielne rozwiązywanie problemów	21
-------------------------------------	----

Dziękujemy za wybór zestawu serii Syngen DNA i okazane nam zaufanie. Produkty serii Syngen DNA to wysokiej jakości zestawy odczynników do izolacji całkowitego DNA z szerokiej gamy próbek takich jak tkanki, komórki, krew, płyny ustrojowe, bakterie, grzyby, rośliny i inne. Zastosowana technologia wykorzystuje technikę chromatografii na złożu krzemionkowym zamkniętym w membranie kolumnienki. Uzyskany DNA odznacza się wysoką czystością, wymaganą do zastosowań między innymi w technikach real-time PCR i microarray.

Niniejsza instrukcja dla użytkownika zawiera szczegółowe wytyczne dotyczące stosowania zestawów Syngen Plant DNA Mini oraz Maxi. Rozdziały wstępne pomogą użytkownikowi przygotować się do wykonania procedur opisanych w dalszych rozdziałach. Zalecamy uważne przeczytanie całej instrukcji przed przystąpieniem do pracy.

Przy użyciu produktu powinna być zachowana uwaga i ostrożność. Zalecamy użytkownikom stosowanie się do zasad GLP (Dobrej Praktyki Laboratoryjnej), a także do zasad prowadzenia eksperymentów z rekombinowanym DNA. Między innymi należy stosować fartuch laboratoryjny, rękawiczki jednorazowe i okulary ochronne.

Aby uzyskać więcej informacji o substancjach niebezpiecznych, które mogą być zawarte w niektórych składnikach zestawów, prosimy przeczytać Karty Charakterystyki Substancji Niebezpiecznych (MSDS) dostępne u producenta.

W przypadku pytań, pozostajemy do Państwa dyspozycji. Życzymy sukcesów w pracy z zestawami Syngen.

Zespół Syngen Biotech

## **Ograniczenia**

Zestawy serii Syngen DNA są przeznaczone wyłącznie do użytku laboratoryjnego. Nie będą uwzględniane żadne roszczenia wynikające z użycia zestawu do diagnozowania lub leczenia chorób.

## Zawartość zestawów

<b>Syngen Plant DNA Mini Kit</b>	<b>SY261010</b>	<b>SY261011</b>	<b>SY261012</b>
<b>Liczba izolacji</b>	<b>50</b>	<b>100</b>	<b>200</b>
Kolumnienki DR	50	100	200
RNaza A – liofilizat	22 mg	43 mg	86 mg
Kolumnienka KL	50	100	200
Bufor lizujący DLR1	25 ml	55 ml	100 ml
Bufor lizujący DLR3	8 ml	15 ml	30 ml
Bufor wiążący DWR – koncentrat	15 ml	30 ml	60 ml
Bufor płuczący DP1 – koncentrat	13 ml	26 ml	52 ml
Bufor płuczący DP2 – koncentrat	15 ml	30 ml	60 ml
Probówki 2 ml	100	200	400
Bufor elucyjny DE	15 ml	30 ml	60 ml

<b>Syngen Plant DNA Maxi Kit</b>	<b>SY261020</b>	<b>SY261021</b>
<b>Liczba izolacji</b>	<b>10</b>	<b>24</b>
Kolumny DR Maxi	10	24
Kolumnienka KL	10	24
RNaza A 10mg/ml	550 ul	1300 ul
Bufor lizujący DLR1	45 ml	110 ml
Bufor lizujący DLR2	45 ml	110 ml
Bufor lizujący DLR3	13 ml	30 ml
Bufor wiążący DWR – koncentrat	30 ml	70 ml
Bufor płuczący DP1 – koncentrat	33 ml	88 ml
Bufor płuczący DP2 – koncentrat	20 ml	45 ml
Bufor elucyjny DE	30 ml	60 ml

## Przechowywanie

Kolumnienki DR, DR Maxi i KL, a także wszystkie roztwory powinny być przechowywane w temperaturze pokojowej (15-25°C), chyba że na butelce określono inaczej. RNaza A po rozpuszczeniu powinna być przechowywana w temperaturze +4°C. Przechowywanie kolumnienek DR i DR Maxi w wyższej temperaturze jest zabronione.

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

Do wszystkich protokołów:

- Etanol (96-100%)
- Statyw
- Sterylne końcówki do pipet (najlepiej z filtrem)
- Pipety automatyczne nastawne
- Worteks
- Łaźnia wodna, blok grzejny lub termomikser na 65°C
- Moździerz
- Ciekły azot
- Homogenizator elektryczny (opcjonalnie)
- Tłuczony lód

Do zestawu Syngen Plant DNA Mini:

- Probówki wirówkowe 1.5 lub 2.0 ml z wieczkiem (ependorfki)
- Mikrowirówka 10.000 x g

Do zestawu Syngen Plant DNA Maxi:

- Probówki wirówkowe 50 ml zakręcane (falkonki 50)
- Mikrowirówka 4.000 x g z rotorem wychyłowym (zalecany)

Do izolacji DNA z komórek roślinnych hodowanych w zawiesinie:

- PBS
- Narzędzie do liczenia komórek

## **Przygotowanie odczynników przed pierwszym użyciem**

### Bufor wiążący i bufony płuczące

Bufor wiążący DWR i bufony płuczące DP1 i DP2 są dostarczane jako koncentraty. Przed pierwszym użyciem dodaj do nich odpowiednią ilość etanolu (96-100%) i starannie wymieszaj. Informacja dotycząca wymaganej ilości etanolu, umieszczona jest na butelce z koncentratem. Po dodaniu etanolu należy zaznaczyć kwadrat na zakrętku.

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

### RNaza A

RNaza A jest dostarczana w postaci liofilizowanej. Aby przygotować porcję roztworu roboczego 50 mg/ml, probówkę zawierającą liofilizat należy krótko zwirować, dodać odpowiednią ilość wody destylowanej (czystości do PCR) zgodnie z informacją umieszczoną na probówce, zamknąć i dokładnie wymieszać na wortexie, aż do całkowitego rozpuszczenia. Po rozpuszczeniu roztwór roboczy RNazy A należy przechowywać w temperaturze +4°C.

## **Materiał wyjściowy i wydajność DNA**

Zestawy Syngen Plant DNA Mini i Maxi służą do izolacji całkowitego DNA z tkanek roślinnych – zarówno świeżych, jak i suszonych, liofilizowanych i mrożonych. Poza DNA genomowym, izolat zawiera także frakcję mitochondrialną, jak również plastydowy DNA (w tym chloroplastowy). Wyizolowaniu ulegają fragmenty o długości do 50.000 pz, z przewagą fragmentów długości 20.000-30.000 pz.

Wyizolowany DNA ma wysoki stopień czystości, dzięki czemu może być użyty bezpośrednio do dalszych analiz, jak reakcje enzymatyczne z detekcją w czasie rzeczywistym, mikromacierze i inne procedury wymagające DNA wysokiej jakości.

Prawidłowe dobranie ilości materiału wyjściowego jest kluczem do wydajnej izolacji. Poniższe tabele określają zalecane maksymalne ilości poszczególnych rodzajów próbek oraz typowe wydajności DNA przy zastosowaniu zestawów Mini i Maxi.

### **Syngen Plant DNA Mini Kit**

<b>Materiał wyjściowy</b>	<b>Maksymalna ilość na 1 izolację</b>	<b>Typowa wydajność DNA</b>
Świeże liście	50-100 mg	5-40 ug
Suszone liście	5-20 mg	3-30 ug
Mrożone liście	50-100 mg	5-40 ug
Komórki w hodowli	$1 \times 10^7$	5-40 ug

### **Syngen Plant DNA Maxi Kit**

<b>Materiał wyjściowy</b>	<b>Maksymalna ilość na 1 izolację</b>	<b>Typowa wydajność DNA</b>
Świeże liście	1000 mg	50-300 ug
Suszone liście	50-100 mg	30-250 ug
Mrożone liście	1000 mg	50-300 ug
Komórki w hodowli	$5-10 \times 10^7$	50-300 ug

Do izolacji najlepiej nadają się młode liście i igły, gdyż mają one największy stosunek ilości komórek do wagi. W miarę starzenia się tkanki, maleje ilość komórek (a więc i ilość DNA) w stosunku do masy tkanki.

Tkanki świeże powinny być przekazane do izolacji natychmiast po pobraniu. W przeciwnym wypadku należy je zamrozić w ciekłym azocie i przechowywać w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ . Ewentualnie tkankę można wysuszyć lub zliofilizować, ale najlepiej zrobić to po etapie homogenizacji.

Nie należy przekraczać maksymalnej ilości na jedną izolację podanej w tabeli. Za duża zawartość komórek w próbce spowoduje niewydajną lizę, za duża zawartość DNA – przeładowanie kolumny. W obu sytuacjach wydajność izolacji znacząco spadnie.

Nie posiadając wagi można określić ilość tkanki pobranej do izolacji na podstawie powierzchni fragmentu liścia. Okrągły wycinek świeżego liścia o średnicy 1,5 cm waży od 25 do 75 mg. Wycinek świeżego liścia o wymiarach 4x4cm waży od 230 do 700 mg.

Przy pomocy zestawów Syngen Plant DNA Maxi można izolować DNA z tkanek bogatych w polisacharydy, jak np. skrobia. W takim przypadku zamiast buforu lizującego DLR1 stosuje się bufor lizujący DLR2.

Komórki hodowane w zawiesinie należy oczyścić z pozostałości pożywki przed przekazaniem do izolacji. W tym celu komórki płucze się w PBS i separuje przez odwirowanie.



## Homogenizacja

W procesie izolacji DNA z tkanek roślinnych homogenizacja jest kluczowym etapem, mającym wyraźny wpływ na wydajność izolacji.

Homogenizację należy wykonać poprzez ucieranie świeżej tkanki w ciekłym azocie na jednolity proszek. Następnie dokładnie utarty drobny proszek pobiera się do izolacji. Ten sposób homogenizacji jest wystarczający dla większości miękkich tkanek.

Utarty proszek można także zamrozić, zliofilizować lub wysuszyć. Zalecamy suszenie materiału po, a nie przed etapem homogenizacji, gdyż ucieranie tkanki suszonej jest znacznie trudniejsze i zachodzi z mniejszą wydajnością, niż świeżej.

Tkanki suszone homogenizuje się poprzez ucieranie w ciekłym azocie. Alternatywnie można zastosować homogenizator elektryczny, jak opisano dalej.

Tkanki mrożone homogenizuje się bez rozmrażania poprzez ucieranie w ciekłym azocie. Alternatywnie można zastosować homogenizator elektryczny, jak opisano dalej.


Alternatywą dla ucierania w ciekłym azocie są homogenizatory elektryczne typu ostrzowego lub kulowego. W takim przypadku homogenizację należy wykonać zgodnie z zaleceniami producenta homogenizatora.

Przy pomocy homogenizatora ostrzowego najczęściej tkankę świeżą lub mrożoną homogenizuje się w ciekłym azocie, lub ewentualnie świeżą tkankę można homogenizować w pierwszym buforze lizującym przed dodaniem enzymu.

Przy pomocy homogenizatora kulowego najczęściej świeżą lub mrożoną tkankę homogenizuje się po zamrożeniu w ciekłym azocie, zamiennie świeżą tkankę można homogenizować w pierwszym buforze lizującym

przed dodaniem enzymu, a suszoną tkankę można homogenizować bez buforu i bez zamrażania, na sucho.

W żadnym wypadku nie zalecamy homogenizacji mrożonego materiału w buforze lizującym. Stosując homogenizatory elektryczne należy rozdrobnić wstępnie tkankę przy pomocy nożyczek lub skalpela.

Po wykonaniu homogenizacji metodą inną niż ucieranie w ciekłym azocie, rozpocznij protokół od miejsca oznaczonego białą strzałką. 

Zestawy Syngen Plant DNA Mini i Maxi zawierają kolumny klarujące KL. Nie są to kolumny homogenizujące, a jedynie klarujące lizat. Nie zastępują one wydajnej homogenizacji próbki przed izolacją.

## **Ogólne wytyczne dotyczące obsługi zestawów Syngen DNA**

Kolumienki Mini pasują do większości probówek wirówkowych o pojemności 1.5 ml lub 2 ml (tzw. eppendorfek).

Kolumienki Maxi pasują do większości probówek wirówkowych o pojemności 50 ml (tzw. falkonek 50).

Wszystkie wirowania w zestawach Mini wykonywane są z pełną prędkością (ok. 14.000 rpm lub 10.000 x g), aczkolwiek możliwe jest zastosowanie niższych prędkości (8000 rpm lub 6000 x g), gdy użytkownik nie posiada szybszej wirówki lub przeszkadza mu hałas – w takim przypadku należy proporcjonalnie wydłużyć wirowanie. Zaleca się jednak, aby przynajmniej wszystkie drugie kroki płukania, kroki dosuszania membrany oraz elucja odbywały się przy najwyższych obrotach wirówki. Wszystkie wirowania należy przeprowadzać w temperaturze pokojowej, chyba że w protokole zaznaczono inaczej.

Wirowania w zestawach Maxi wykonywane są z prędkością 4000 x g w temperaturze pokojowej. Zalecamy stosowanie rotora wychyłowego, a nie stałokątowego.

Podczas obsługi zestawów Syngen zalecamy, aby ograniczać dotykanie membran w kolumienkach końcówką pipety, przed wirowaniem zamykać wieczka kolumienek i probówek, a z wirówki kolumienki wyjmować razem z probówkami – dopiero po ustawieniu w statywie można wyjąć kolumienkę z próbki. Ponadto, dla ograniczenia kontaminacji pomiędzy próbkami (cross-contamination), zalecamy, aby utrzymywać w czystości rękawiczki ochronne, używać końcówek do pipet z filtrem i po każdym worteksowaniu lub mieszaniu zwirowywać probówki, aby usunąć krople ze spodu wieczek.

## Elucja DNA

Typowo elucję wykonuje się buforem DE ogrzany do 60-65°C o objętości 200 ul w zestawach Mini i 1000 ul w zestawach Maxi. Jest to wystarczające dla większości próbek.

Elucję z kolumny można wykonywać dostarczonym buforem elucyjnym DE lub wodą destylowaną o pH=7.5-9.0. Woda o innym pH może znacznie ograniczyć wydajność elucji, lub nawet uniemożliwić ją.

Nie należy eluować DNA zimnym buforem lub wodą. W przypadku elucji na zimno bufor do elucji (lub woda) powinien być doprowadzony co najmniej do temperatury pokojowej (15-25°C). Elucję na ciepło wykonuje się buforem ogrzany do temperatury 60-65°C.

W przypadkach, gdy izolację wykonywano z materiału wyjątkowo bogatego w DNA i użytkownikowi zależy na odzyskaniu całego DNA z kolumny, zalecamy drugą elucję do oddzielnej próbki przy pomocy drugiej porcji buforu. W niektórych sytuacjach pierwsza elucja pozwala na odzyskanie 60% DNA z kolumny, druga – 40%. Drugim sposobem na odzyskanie większej ilości materiału z kolumny jest inkubacja kolumny z buforem elucyjnym przez 5-10 minut w 37°C (np. w cieplarni hodowlanej), dzięki czemu więcej DNA związanego w kolumnie rozpuści się w buforze elucyjnym DE.

W przypadku próbek ubogich w DNA, aby zatężyć otrzymany materiał, zalecamy elucję mniejszą objętością. W zestawach Mini, dla próbek o zawartości DNA < 3 ug zalecamy zastosowanie buforu DE w objętości 100 ul na ciepło, dla próbek o zawartości DNA < 1 ug – 50 ul na ciepło. W zestawach Maxi, dla próbek o niskiej zawartości DNA zalecamy zredukowanie objętości buforu DE do elucji na ciepło do 200-500 ul.

Do przypadku przechowywania wyizolowanego DNA do 4 tygodni, wystarczą warunki chłodnicze 2-8°C. Do długoterminowego przechowywania wyizolowanego DNA zalecamy temperaturę -20°C.

## Protokół 1 do zestawu Mini

### Izolacja DNA z tkanek roślinnych świeżych, mrożonych lub liofilizowanych

Zanim zaczniesz

- Jeżeli pierwszy raz używasz zestawu Syngen Plant DNA Mini Kit, najpierw przeczytaj wszystkie rozdziały poprzedzające protokoły.
- Upewnij się, że przygotowałeś wszystkie potrzebne odczynniki i sprzęty opisane w rozdziale „Sprzęt i odczynniki potrzebne do wykonania procedury, a niedostarczone z zestawem”.
- Upewnij się, że bufor wiążący i buforo płuczące zostały przygotowane zgodnie z instrukcjami zawartymi w rozdziale „Przygotowanie odczynników przed pierwszym użyciem”.
- Jeżeli w którymś buforze wytrącił się precipitat, rozpuść go inkubując w 37°C przez kilka minut i mieszając.
- Doprowadź wszystkie buforo do temperatury pokojowej (15-25°C).
- Nastaw łaźnię wodną, blok grzejny lub termomikser na 65°C.
- Wstaw odpowiednią ilość buforu elucyjnego DE do 65°C.

### Procedura

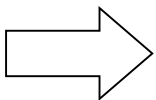
1. Umieść odmierzoną ilość 50-100 mg świeżej lub mrożonej tkanki roślinnej, lub 5-20 mg suszonej tkanki roślinnej w moździerzu z ciekłym azotem.

Przy pomocy tłuczka rozetrzyj tkankę na drobny pył.

Przesyp pył z ewentualnymi resztkami ciekłego azotu do probówki 1,5 ml lub 2,0 ml z wieczkiem (nie dostarczono).

Pozwól na odparowanie pozostałości ciekłego azotu z probówki.

Homogenizację można wykonać inaczej. Więcej szczegółów znajdziesz w rozdziale „Homogenizacja”.



2. Dodaj 400  $\mu$ l buforu DLR1.  
Dodaj 8  $\mu$ l roztworu RNazy A, zamknij i wymieszaj na wortexie.  
Inkubuj w 65°C przez 10 minut, mieszając co 5 minut przez odwrócenie probówki, aż do całkowitej lizy tkanki.  
Zwiruj krótko probówki, aby usunąć krople z wieczka.

Nie wolno mieszać RNazy A bezpośrednio z buforem DLR1 przed dodaniem do próbki. Zamiast okresowego mieszania można zastosować termomikser.

3. Dodaj 130  $\mu$ l buforu DLR3, zamknij i zmieszaj na wortexsie.  
Inkubuj na lodzie przez 5 minut.  
Zwiruj krótko probówki, aby usunąć krople z wieczka.
4. Umieść kolumnkę klarującą KL w probówce 2 ml.  
Przenieś zawartość probówki z kroku 3 na kolumnkę.  
Zamknij wieczko i wiruj przez 3 minutę z maksymalną prędkością.  
Usuń kolumnkę klarującą KL ze stałymi cząstkami lizatu.
5. Przenieś przesącz (sklarowany lizat) do nowej probówki 1,5 ml lub 2,0 ml z wieczkiem (nie dostarczono).  
Dodaj 1,5 objętości buforu wiążącego DWR (ok. 800  $\mu$ l), zamknij i zmieszaj na wortexsie przez 5 sekund.  
Zwiruj krótko probówkę, aby usunąć krople z wieczka.
6. Umieść kolumnkę DR w nowej probówce 2 ml.  
Przenieś 700  $\mu$ l mieszaniny z kroku 5 na kolumnkę.  
Zamknij wieczko i wiruj przez 2 minuty z maksymalną prędkością.  
Wylej przesącz (nie wyrzucaj probówki) i powtarzaj, aż do nałożenia całego lizatu na kolumnę.  
Wylej przesącz, nie wyrzucaj probówki.
7. Dodaj do kolumnki 500  $\mu$ l buforu DP1.  
Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością.  
Wylej przesącz, nie wyrzucaj probówki.
8. Dodaj do kolumnki 750  $\mu$ l buforu DP2.  
Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością.  
Wylej przesącz, nie wyrzucaj probówki.
9. Wiruj przez 3 minuty z maksymalną prędkością, aby wysuszyć membranę i pozbyć się z kolumnki resztek buforów zawierających etanol.  
  
Upewnij się, że w rogu kolumnki nie został żaden płyn.  
Ewentualnie usuń go pipetą i powtórz wirowanie.

10. Przenieś kolumnkę DR do próbki elucyjnej 1,5 ml (nie dostarczono) i wyrzuć starą próbkę 2 ml z resztkami buforu płuczącego.

Ostrożnie, nie dotykając membrany, dodaj na sam środek membrany 200 ul podgrzanego buforu do elucji DE.

Zamknij wieczko i inkubuj przez 3 minuty w temperaturze pokojowej, aż bufor wsiąknie w membranę.

Wiruj przez 2 minuty w temperaturze pokojowej z maksymalną prędkością.

Objętość elucji może być mniejsza. Elucję można wykonać wodą o pH=7,5-9,0. Więcej na temat zwiększania wydajności elucji znajdziesz w rozdziale „Elucja DNA”.

Warunki inkubacji mogą być inne. Więcej na temat zwiększania wydajności elucji znajdziesz w rozdziale „Elucja DNA”.

11. Ostrożnie wysuń kolumnkę i zamknij wieczko w próbce z wyizolowanym DNA.

Nie wyrzucaj kolumnki do czasu określenia stężenia wyizolowanego DNA. Jak w przypadku każdej metody chromatograficznej, niewłaściwe pH wody użytej do elucji może wyraźnie zmniejszyć wydajność elucji, a nawet uniemożliwić ją, powodując pozostanie całego DNA na kolumnie. Przy pomiarze stężenia DNA metodami spektrofotometrycznymi, stosuj bufor użyty do elucji jako próbę ślepą (blank).

Wyizolowany DNA można przechowywać w temperaturze 2-8°C do 4 tygodni, lub w -20°C przez dłuższy czas.

## Protokół 2 do zestawu Mini

### Izolacja DNA z komórek roślinnych hodowanych w zawieszynie

Zanim zaczniesz

- Jeżeli pierwszy raz używasz zestawu Syngen Plant DNA Mini Kit, najpierw przeczytaj wszystkie rozdziały poprzedzające protokoły.
- Upewnij się, że przygotowałeś wszystkie potrzebne odczynniki i sprzęty opisane w rozdziale „Sprzęt i odczynniki potrzebne do wykonania procedury, a niedostarczone z zestawem”.
- Upewnij się, że bufor wiążący i buforo płuczące zostały przygotowane zgodnie z instrukcjami zawartymi w rozdziale „Przygotowanie odczynników przed pierwszym użyciem”.
- Jeżeli w którymś buforze wytrącił się precipitat, rozpuść go inkubując w 37°C przez kilka minut i mieszając.
- Doprowadź wszystkie buforo do temperatury pokojowej (15-25°C).
- Nastaw łaźnię wodną, blok grzejny lub termomikser na 65°C. Wstaw bufor elucyjny DE.
- Przygotuj PBS i narzędzia do liczenia komórek

### Procedura

1. Przenieś maksymalnie  $1 \times 10^7$  komórek do probówki wirówkowej 1,5 lub 2,0 ml (nie dostarczono).

Wiruj przez 5 minut z prędkością 300 x g w temperaturze +10°C (schłodzenie opcjonalne).

Ostrożnie usuń cały supernatant, nie naruszając pelletu.

Uwaga: Pellet komórek może być niewidoczny lub tworzyć nalot na ukośnej ścianie wewnątrz probówki.

2. Dodaj 0,5-1,0 ml PBS wolnego od RNaz i zawieś komórki – można zastosować energiczne worteksowanie.

Wiruj przez 5 minut z prędkością 300 x g w temperaturze +10°C (schłodzenie opcjonalne).

Ostrożnie usuń cały supernatant, nie naruszając pelletu.

Uwaga: Pellet komórek może być niewidoczny lub tworzyć nalot na ukośnej ścianie wewnątrz probówki.

3. Przejdź do Protokołu 1 „Izolacja DNA z tkanek roślinnych świeżych, mrożonych lub liofilizowanych”. Zacznij od początku.



## Protokół 3 do zestawu Maxi

### Izolacja DNA z tkanek roślinnych świeżych, mrożonych lub liofilizowanych

Zanim zaczniesz

- Jeżeli pierwszy raz używasz zestawu Syngen Plant DNA Maxi Kit, najpierw przeczytaj wszystkie rozdziały poprzedzające protokoły.
- Upewnij się, że przygotowałeś wszystkie potrzebne odczynniki i sprzęty opisane w rozdziale „Sprzęt i odczynniki potrzebne do wykonania procedury, a niedostarczone z zestawem”.
- Upewnij się, że bufor wiążący i bufor pływający zostały przygotowane zgodnie z instrukcjami zawartymi w rozdziale „Przygotowanie odczynników przed pierwszym użyciem”.
- Jeżeli w którymś buforze wytrącił się precipitat, rozpuść go inkubując w 37°C przez kilka minut i mieszając.
- Doprowadź wszystkie bufor do temperatury pokojowej (15-25°C).
- Nastaw łaźnię wodną, blok grzejny lub termomikser na 65°C.
- Wstaw odpowiednią ilość buforu elucyjnego DE do 65°C.

### Procedura

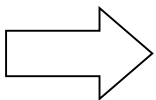
1. Umieść odmierzoną ilość do 1000 mg świeżej lub mrożonej tkanki roślinnej, lub 50-100 mg suszonej tkanki roślinnej w moździerzu z ciekłym azotem.

Przy pomocy tłuczka rozetrzyj tkankę na drobny pył.

Przesyp pył z ewentualnymi resztkami ciekłego azotu do probówki 50 ml z wieczkiem (nie dostarczono).

Pozwól na odparowanie pozostałości ciekłego azotu z probówki.

Homogenizację można wykonać inaczej. Więcej szczegółów znajdziesz w rozdziale „Homogenizacja”.

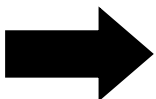


2. Dodaj 4 ml buforu DLR1.

Dodaj 50 µl roztworu RNazy A, zamknij i wymieszaj na wortexie.

Inkubuj w 65°C przez 20 minut, mieszając co 5 minut przez odwrócenie probówki, aż do całkowitej lizy tkanki.

Zwiruj krótko probówki, aby usunąć krople z wieczka.



Nie wolno mieszać RNazy A bezpośrednio z buforem DLR1 przed dodaniem do próbki. Zamiast okresowego mieszania można zastosować termomikser.

3. Dodaj 1 ml buforu DLR3, zamknij i zmieszaj na wortexsie.  
Inkubuj na lodzie przez 5 minut.  
Zwiruj krótko probówki, aby usunąć krople z wieczka.
  4. Umieść kolumnę klarującą KL w probówce 50 ml (nie dostarczono).  
Przenieś zawartość probówki z kroku 11 na kolumienkę.  
Zamknij wieczko i wiruj przez 5 minut z prędkością 4000 x g.  
Usuń kolumienkę klarującą KL ze stałymi cząstkami lizatu.
  5. Dodaj 1,5 objętości buforu wiążącego DWR (ok. 7,5 ml), zamknij i zmieszaj na wortexsie przez 10 sekund.  
Zwiruj krótko probówkę, aby usunąć krople z wieczka.
  6. Umieść kolumnę DR Maxi w nowej probówce 50 ml.  
Przenieś mieszaninę z kroku 17 na kolumnę.  
Wiruj przez 5 minut z prędkością 4000 x g.  
Wylej przesącz, nie wyrzucaj probówki.
  7. Dodaj na kolumnę 4 ml buforu płuczającego DP1.  
Wiruj przez 3 minuty z prędkością 4000 x g.  
Wylej przesącz, nie wyrzucaj probówki.
  8. Dodaj 6 ml buforu płuczającego DP2.  
Wiruj przez 3 minuty z prędkością 4000 x g.  
Wylej przesącz, nie wyrzucaj probówki.
- Jeśli membrana jest zabarwiona na zielono lub na inny kolor, który posiadała tkanka pobrana do izolacji, nanieś na kolumnę 4 ml etanolu 96-100% i zwiruj przy 4000 x g przez 5 minut. Następnie wylej przesącz, nie wyrzucaj probówki.
9. Wiruj przez 10 minut z prędkością 4000 x g, aby wysuszyć membranę i pozbyć się z kolumienki resztek buforów zawierających etanol.

Upewnij się, że w rogu kolumienki nie został żaden płyn.  
Ewentualnie usuń go pipetą i powtórz wirowanie.

10. Przenieś kolumnę DR Maxi do probówki elucyjnej 50 ml (nie dostarczono) i wyrzuć starą probówkę 50 ml z resztkami buforu płuczającego.

Ostrożnie, nie dotykając membrany, dodaj na sam środek membrany 1 ml podgrzanego buforu do elucji DE.

Inkubuj przez 5 minut w temperaturze pokojowej, aż bufor wsiąknie w membranę.

Wiruj przez 3 minuty z prędkością 4000 x g.

Objętość elucji może być mniejsza. Elucję można wykonać wodą o pH=7,5-9,0. Więcej na temat zwiększania wydajności elucji znajdziesz w rozdziale „Elucja DNA”.

Warunki inkubacji mogą być inne. Więcej na temat zwiększania wydajności elucji znajdziesz w rozdziale „Elucja DNA”.

11. Ostrożnie wysuń kolumnę i zamknij wieczko w probówce z wyizolowanym DNA.

Nie wyrzucaj kolumny do czasu określenia stężenia wyizolowanego DNA. Jak w przypadku każdej metody chromatograficznej, niewłaściwe pH wody użytej do elucji może wyraźnie zmniejszyć wydajność elucji, a nawet uniemożliwić ją, powodując pozostanie całego DNA na kolumnie. Przy pomiarze stężenia DNA metodami spektrofotometrycznymi, stosuj bufor użyty do elucji jako próbę ślepą (blank).

Wyizolowany DNA można przechowywać w temperaturze 2-8°C do 4 tygodni, lub w -20°C przez dłuższy czas.

## Protokół 4 do zestawu Maxi

### Izolacja DNA z tkanek roślinnych świeżych, mrożonych lub liofilizowanych, bogatych w polisacharydy

Zanim zaczniesz

- Jeżeli pierwszy raz używasz zestawu Syngen Plant DNA Maxi Kit, najpierw przeczytaj wszystkie rozdziały poprzedzające protokoły.
- Upewnij się, że przygotowałeś wszystkie potrzebne odczynniki i sprzęty opisane w rozdziale „Sprzęt i odczynniki potrzebne do wykonania procedury, a niedostarczone z zestawem”.
- Upewnij się, że bufor wiążący i buforo płuczące zostały przygotowane zgodnie z instrukcjami zawartymi w rozdziale „Przygotowanie odczynników przed pierwszym użyciem”.
- Jeżeli w którymś buforze wytrącił się precipitat, rozpuść go inkubując w 37°C przez kilka minut i mieszając.
- Doprowadź wszystkie buforo do temperatury pokojowej (15-25°C).
- Nastaw łaźnię wodną, blok grzejny lub termomikser na 65°C. Wstaw buforu elucyjny DE.

### Procedura

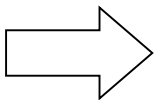
1. Umieść odmierzoną ilość do 1000 mg świeżej lub mrożonej tkanki roślinnej, lub 50-100 mg suszonej tkanki roślinnej w moździerzu z ciekłym azotem.

Przy pomocy tłuczka rozetrzyj tkankę na drobny pył.

Przesyp pył z ewentualnymi resztami ciekłego azotu do probówki 50 ml z wieczkiem (nie dostarczono).


Pozwól na odparowanie pozostałości ciekłego azotu z probówki.

Homogenizację można wykonać inaczej. Więcej szczegółów znajdziesz w rozdziale „Homogenizacja”.



2. Dodaj 4 ml buforu DLR2.  
Dodaj 50 ul roztworu RNazy A, zamknij i wymieszaj na wortexie.  
Inkubuj w 65°C przez 25 minut, mieszając co 5 minut przez odwrócenie probówki, aż do całkowitej lizy tkanki.

Nie wolno mieszać RNazy A bezpośrednio z buforem DLR2 przed dodaniem do próbki.  
Zamiast okresowego mieszania można zastosować termomikser.

3. Przejdź do protokołu 3 "Izolacja DNA z tkanek roślinnych świeżych, mrożonych lub liofilizowanych" do miejsca oznaczonego czarną strzałką. 

## Protokół 5 do zestawu Maxi

### Izolacja DNA z komórek roślinnych hodowanych w zawieszynie

Zanim zaczniesz

- Jeżeli pierwszy raz używasz zestawu Syngen Plant DNA Maxi Kit, najpierw przeczytaj wszystkie rozdziały poprzedzające protokoły.
- Upewnij się, że przygotowałeś wszystkie potrzebne odczynniki i sprzęty opisane w rozdziale „Sprzęt i odczynniki potrzebne do wykonania procedury, a niedostarczone z zestawem”.
- Upewnij się, że bufor wiążący i buforo płuczące zostały przygotowane zgodnie z instrukcjami zawartymi w rozdziale „Przygotowanie odczynników przed pierwszym użyciem”.
- Jeżeli w którymś buforze wytrącił się precypitat, rozpuść go inkubując w 37°C przez kilka minut i mieszając.
- Doprowadź wszystkie buforo do temperatury pokojowej (15-25°C).
- Nastaw łaźnię wodną, blok grzejny lub termomikser na 65°C.
- Wstaw odpowiednią ilość buforu elucyjnego DE do 65°C.
- Przygotuj PBS i narzędzia do liczenia komórek

### Procedura

1. Przenieś maksymalnie  $5-10 \times 10^7$  komórek do probówki (nie dostarczono).

Wiruj przez 5-10 minut z prędkością 300 x g w temperaturze +10°C (schłodzenie opcjonalne).

Ostrożnie usuń cały supernatant, nie naruszając pelletu.

Uwaga: Pellet komórek może być niewidoczny lub tworzyć nalot na ukośnej ścianie wewnątrz probówki.

2. Dodaj 5 ml PBS wolnego od RNaz i zawieś komórki – można zastosować energiczne worteksowanie.

Wiruj przez 5-10 minut z prędkością 300 x g w temperaturze +10°C (schłodzenie opcjonalne).

Ostrożnie usuń cały supernatant, nie naruszając pelletu.

Uwaga: Pellet komórek może być niewidoczny lub tworzyć nalot na ukośnej ścianie wewnątrz probówki.

3. Przejdź do Protokołu 3 lub do Protokołu 4, zacznij od początku.

## Samodzielne rozwiązywanie problemów

### Mała lub zerowa wydajność izolacji

Przyczyna	Rozwiązanie
Niewydajna liza z powodu niewystarczającej homogenizacji tkanki	Zwróć uwagę na etap homogenizacji tkanki. Przeczytaj zalecenia w rozdziale „Homogenizacja”
Niewydajna liza z powodu za dużej ilości komórek w próbce	Powtórz izolację. Zmniejsz ilość próbki do zalecanej porcji
Niewydajna liza z powodu niewystarczających warunków inkubacji	Powtórz izolację. Wydłuż inkubację w 65°C.
Niewydajna liza z powodu dużej zawartości polisacharydów	Powtórz izolację stosując protokół 3 (tylko Maxi)
Nie dodano etanolu do buforów płuczających lub buforu wiążącego przed pierwszym użyciem lub zastosowano etanol o złym stężeniu	Powtórz izolację, przygotuj prawidłowo bufor, upewnij się, że używasz etanolu minimum 96%
Niewydajna elucja wodą o za niskim pH (niższe niż 7.5-9.0)	Wykonaj elucję ponownie buforem DE
Niewydajna elucja – DNA nie rozpuściło się w buforze DE	Powtórz elucję buforem DE - upewnij się, że nanosisz bufor na sam środek membrany - pozwól buforowi wsiąknąć w membranę - przed wirowaniem inkubuj 5 minut w temperaturze pokojowej lub 5-10 minut w cieplarni
Niewydajna elucja w powodu przedziurawienia membrany	Powtórz izolację

### Materiał po izolacji jest zdegradowany

Przyczyna	Rozwiązanie
Próbka jest stara lub źle przechowywana	Powtórz izolację na nowej próbce, izoluj DNA z próbek świeżych lub

	prawidłowo przechowywanych
Wirowanie przy za wysokich obrotach	Powtórz izolację, wiruj zgodnie z zaleceniami w rozdziale „Ogólne wytyczne dotyczące obsługi zestawów Syngen DNA”. Nie przekraczaj maksymalnej prędkości wirowania 10.000 x g dla zestawu Mini i 4.000 x g dla zestawu Maxi.

Kolumnienka zatkała się

Przyczyna	Rozwiązanie
Próbka jest zbyt gęsta lub lepka	Powtórz izolację z mniejszej ilości próbki.
Niewydajna liza	Przeczytaj porady 1-4 w tabeli 1
Zbyt mała prędkość wirowania	Powtórz wirowanie z maksymalną prędkością
Precypitat w próbce po dodaniu buforu DWR	- Powtórz izolację z mniejszej ilości próbki - Nie nakładaj cząstek stałych na kolumnę

Materiał po izolacji zanieczyszczony, nieprawidłowa A230

Przyczyna	Rozwiązanie
Zanieczyszczenia wprowadzone przez użytkownika	Stosuj się do wskazówek w rozdziale „Ogólne wytyczne dotyczące obsługi zestawów Syngen DNA” – 3 akapit. Nakładaj bufor i próbki do wnętrza kolumny, nie zanieczyszczając brzegu kolumny
Niewydajna liza z powodu dużej zawartości polisacharydów	Powtórz izolację stosując protokół 3 (tylko Maxi)



[facebook.com/SyngenBiotech](https://facebook.com/SyngenBiotech)

Syngen Biotech Sp. z o.o. Sp. k.

54-116 Wrocław, ul. Ostródzka 13

[kolumienki.pl](http://kolumienki.pl), [syngen.pl](http://syngen.pl), [info@syngen.pl](mailto:info@syngen.pl)

tel. +48 71 349 70 13, +48 349 91 66, +48 71 349 91 67, faks +48 71 349 70 33

