

Syngen DNA Mini Kit

Syngen Tissue RNA Mini Kit

Protokół dodatkowy

Izolacja z kleszcza DNA i RNA

Syngen DNA Mini Kit

Zawartość opakowania i warunki przechowywania

Syngen DNA Mini Kit	zestaw demo	SY241010	SY241011	SY241012
Liczba izolacji	4	50	100	300
Kolumienki DT	4	50	100	300
Probówki do elucji 1,5 ml	4	50	100	300
Proteinaza K	1 mg	11 mg	2 x 11 mg	6 x 11 mg
Homogenizator H	4	50	100	300
Bufor DLT1	1,5 ml	15 ml	30 ml	70 ml
Bufor DLT2	1,5 ml	15 ml	30 ml	70 ml
Bufor DP1	2 x 1,3 ml	22 ml	44 ml	124 ml
Bufor DP2	1 ml	10 ml	20 ml	55 ml
Probówki 2 ml	8	100	200	600
Bufor DE	1 ml	15 ml	30 ml	90 ml

Kolumienki DT, 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.

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

- 100 ul wody destylowanej (czystości do PCR) – do probówki z 1 mg
- 1,1 ml wody 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.

Bufoły płuczące

Bufoły 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 zakrętkę.

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

Syngen Tissue RNA Mini Kit

Zawartość opakowania i warunki przechowywania

Syngen Tissue RNA Mini Kit	zestaw demo	SY321010	SY321011	SY321012
Liczba izolacji	4	50	100	300
Kolumienki R	4	50	100	300
Kolumienki klarujące KL	4	50	100	300
Probówki do elucji 1,5 ml	4	50	100	300
Homogenizator H	4	50	100	300
Bufor RLK	2 x 1,5 ml	25 ml	45 ml	130 ml
Bufor RP1	2 x 1,5 ml	30 ml	60 ml	170 ml
Bufor RP2	1,5 ml	15 ml	35 ml	2 x 50 ml
Probówki 2 ml	8	100	200	600
Woda wolna od RNaz	0,5 ml	6 ml	6 ml	2 x 8 ml

Kolumienki R, a także wszystkie roztwory powinny być przechowywane w temperaturze pokojowej (15-25°C), chyba że na butelce określono inaczej.

Przygotowanie odczynników przed pierwszym użyciem

Bufor płuczący

Bufor płuczący RP2 jest dostarczany jako koncentrat. Przed pierwszym użyciem dodaj do niego 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 zakrętkę.

Bufor RP2 po dodaniu etanolu powinien być szczelnie zamknięty i przechowywany w temperaturze pokojowej. Przed rozpoczęciem procedury zawsze wymieszaj rozpuszczone bufoły przez obrócenie butelki kilka razy.

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

- Etanol (96-100%)
- PBS
- Probówki 1.5 ml i 2 ml (eppendorfk)
- Statyw
- Sterylne końcówki do pipet (najlepiej z filtrem)
- Pipety automatyczne nastawne
- Mikrowirówka
- Worteks
- Woda destylowana (czystości do PCR)

Dodatkowo do izolacji DNA:

- Łaźnia wodna, blok grzejny lub termomikser – jeden na 60°C, drugi na 70°C

Dodatkowo do izolacji RNA:

- Etanol (70%)
- Beta-merkaptioetanol (B-ME)

Materiał wyjściowy

Ilość materiału na 1 izolację: 1 kleszcz

Zanim zaczniesz

Upewnij się, że homogenizator H ściśle pasuje do kształtu wnętrza próbówki 1,5 ml (eppendorfski, niedostarczona), którą posiadasz. Jeśli homogenizator nie sięga dna próbówki (opiera się o ukośne ścianki ponad dnem) lub występuje luz pomiędzy ukośnymi ściankami próbówki, a końcem homogenizatora (po oparciu końca o dno), należy użyć do homogenizacji dostarczonych próbek elucyjnych, a do elucji – zastosować własne próbówki 1,5 ml.

Izolacja DNA:

1. Do buforów DP1 i DP2 dodaj odpowiednią ilość 96-100% etanolu.
2. Przygotuj roztwór proteiny K.
3. Nastaw łaźnię wodną, blok grzewczy lub termomikser na 60°C, drugi na 70°C.
4. Podgrzej bufor do elucji do 70°C.
5. Jeżeli w którymś buforze wytrącił się precypitat, rozpuść go inkubując w 37°C przez kilka minut i mieszając.

Izolacja RNA:

1. Do buforu RP2 dodaj odpowiednią ilość 96-100% etanolu.
2. Jeżeli w którymś buforze wytrącił się precypitat, rozpuść go inkubując w 37°C przez kilka minut i mieszając.
3. Doprowadź wszystkie bufony do temperatury pokojowej (15-25°C).
4. Przygotuj potrzebną porcję buforu RLK-BME używając 10 ul B-ME na każdy 1 ml buforu RLK. Nie wolno dodawać B-ME do całej butelki buforu RLK, o ile cały nie zostanie zużyty na raz.

PROTOKÓŁ**HOMOGENIZACJA KLESZCZA**

1. Przy pomocy homogenizatora H rozgnieć kleszcza wewnątrz próbówki.
2. Do próbówki z kleszczem dodaj 300 ul PBS. Wygnieć kleszcza ponownie pozostawiając PBS w próbówce.
3. Powstały homogenat podziel na dwie części:
 - pobierz 150 ul homogenatu do nowej eppendorfski i przejdź do izolacji RNA
 - pozostały homogenat (wraz z otoczką kleszcza) pozostaw w próbówce i przejdź do izolacji DNA.

IZOLACJA DNA

1. Do próbówki z homogenatem dodaj 200 ul buforu DLT1 i kontynuuj ucieranie przy pomocy

homogenizatora H pozostawiając cały homogenat w próbówce. Wyciągnij homogenizator H z próbówki.

2. Dodaj 20 ul roztworu proteiny K, zamknij i wymieszaj na wortexie.
3. Inkubuj w 60°C, mieszając na wortexie co 10-15 minut, aż do momentu, kiedy próbka ulegnie lizie i pozostanie tylko otoczka chitynowa kleszcza. Zwykle zajmuje to około 1 godziny.
4. Wiruj przez 2-3 minuty z maksymalną prędkością (18.000 x g).
5. Przenieś supernatant do nowej próbówki 1,5 ml (niedostarczone). Osad z otoczką odrzuć.
6. Dodaj 200 ul buforu DLT2, zamknij i zmieszaj na wortexie. Upewnij się, że roztwory zmieszały się całkowicie i zawartość próbówki jest homogenna.
7. Inkubuj w 70°C przez 10 minut. Zwiruj krótko próbówki, aby usunąć krople z wieczka.
8. Dodaj 200 ul etanolu (96%-100%), zamknij i zmieszaj na wortexie. Upewnij się, że roztwory zmieszały się całkowicie i zawartość próbówki jest homogenna.
9. Umieść kolumienkę w próbówce 2 ml do płukania. Zwiruj krótko próbówki z lizatem, aby usunąć krople z wieczka. Przenieś maksymalną możliwą ilość lizatu na kolumienkę. Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością.
10. Przenieś pozostałą część lizatu na kolumienkę, zamknij wieczko i wiruj ponownie przez 1 minutę z maksymalną prędkością.
11. Przenieś kolumienkę do nowej próbówki 2 ml i wyrzuć przesącz razem ze starą próbówką.
12. Dodaj do kolumienki 500 ul buforu DP1. Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością. Wylej przesącz, nie wyrzucaj próbówki.
13. Dodaj do kolumienki 750 ul buforu DP2. Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością. Wylej przesącz, nie wyrzucaj próbówki.
14. Wiruj przez 3 minuty z maksymalną prędkością, 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.
15. Przenieś kolumienkę do próbówki elucyjnej 1,5 ml i wyrzuć starą próbówkę z resztkami buforu płuczającego. Ostrożnie, nie dotykając membrany, dodaj na sam środek membrany 200 ul buforu

do elucji DE lub wody o pH=7,5-9,0. Zamknij wieczko i inkubuj przez 3 minuty w RT.

16. Wiruj przez 2 minuty w RT z maksymalną prędkością.
17. Ostrożnie wysuń kolumnienkę i zamknij wieczko w probówce z wyizolowanym DNA. Wyizolowane DNA można przechowywać w temperaturze 2-8°C do 4 tygodni lub w -20°C przez dłuższy czas.

IZOLACJA RNA

1. Do probówki z homogenatem dodaj 350 ul buforu RLK-BME i kontynuuj ucieranie przy pomocy homogenizatora H pozostawiając cały homogenat w probówce. Wyciągnij homogenizator H z probówki.
2. OPCJA (wykonaj lub przejdź do następnego kroku): Umieść kolumnienkę klarującą w probówce 2 ml. Przenieś zawartość probówki z kroku 1 na kolumnienkę. Zamknij wieczko i wiruj przez 2 minuty z maksymalną prędkością. Usuń kolumnienkę KL ze stałymi cząstkami lizatu.
3. Przenieś przesącz do nowej probówki 1,5 lub 2 ml z wieczkiem (nie dostarczono). Dodaj 1 objętość etanolu (70%), zamknij i zmieszaj na wortexie. Nie wiruj.
4. Umieść kolumnienkę R w probówce 2 ml do płukania (dostarczono). Przenieś całą zawartość probówki z kroku 4 na kolumnienkę. Zamknij wieczko.

Jeżeli objętość lizatu jest większa niż 700 ul, przenieś na kolumnę tylko 700 ul, zwiruj, usuń przesącz (nie wyrzucaj probówki) i powtarzaj aż do nałożenia całego lizatu na kolumnę.
5. Wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością (18.000 x g).
6. Przenieś kolumnienkę do nowej probówki 2 ml (nie dostarczono). Wyrzuć przesącz razem ze starą probówką.
7. Dodaj do kolumnienki 250 ul buforu RP1. Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością. Wylej przesącz, nie wyrzucaj probówki.
8. Powtórz krok 7.
9. Dodaj do kolumnienki 700 ul buforu RP2. Zamknij wieczko i wiruj przez 1 minutę z maksymalną prędkością. Wylej przesącz, nie wyrzucaj probówki.
10. Powtórz krok 9.
11. Wiruj przez 3 minuty z maksymalną prędkością, aby wysuszyć membranę i pozbyć się z

kolumnienki resztek buforów zawierających etanol. Upewnij się, że w rogu kolumnienki nie został żaden płyn. Ewentualnie usuń go pipetą i powtórz wirowanie.

12. Przenieś kolumnienkę do probówki elucyjnej 1,5 ml i wyrzuć starą probówkę z resztkami buforu płuczającego. Ostrożnie, nie dotykając membrany, dodaj na sam środek membrany 50 ul wody wolnej od RNaz. Zamknij wieczko i inkubuj przez 3 minuty w RT.
13. Wiruj przez 2 minuty w RT z maksymalną prędkością.
14. Ostrożnie wysuń kolumnienkę i zamknij wieczko w probówce z wyizolowanym RNA. Wyizolowane RNA należy przechowywać w temperaturze od -70°C do -86°C.

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
kolumnienki.pl, syngen.pl, info@syngen.pl