

GeneMATRIX Bacterial & Yeast Genomic DNA Purification Kit

Uniwersalny zestaw do oczyszczania DNA z bakterii Gram⁺, Gram⁻ oraz drożdży

kat. nr E3580

Wersja zestawu 1.1

Wrzesień, 2008

Uwaga: *Minikolumny wiążące przechowywać w temperaturze 2÷8°C.*

Uwaga 1: Zestaw jest przeznaczony do izolacji DNA z bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych oraz różnorodnych gatunków drożdży.

Uwaga 2: Niektóre gatunki bakterii Gram⁺ posiadają ścianę komórkową wyjątkowo oporną na lizę. Poza lizozymem należy wówczas dodatkowo zastosować odpowiedni enzym (np. lysostaphina w przypadku *Staphylococcus* spp.).

Uwaga 3: W celu wydajnej lizy komórek drożdżowych należy stosować odpowiedni enzym np.: lyticase.

Uwaga 4: Po rozpakowaniu, zestaw do oczyszczania DNA genomowego należy przechowywać w temperaturze pokojowej, za wyjątkiem roztworu BL (zawiera lizozym), oraz Proteinazy K które należy przechowywać w -20°C. RNase A oraz kolumniki wiążące należy przechowywać w 2÷8°C.

Uwaga 5: Wszelkie roztwory z zestawu do oczyszczania DNA należy przechowywać szczelnie zamknięte, aby uniknąć zmiany stężeń w wyniku parowania.

Protokół

I. Bakterie

1. W probówce 1.5 ml typu Eppendorf zmieszać:

A. 100 µl hodowli bakteryjnej oraz 200 µl buforu **Lyse BG**.

Lub:

B. Pobrać eż kolonie bakteryjną z płytki Petriego lub skosu i zawiesić w 300 µl buforu **Lyse BG**.

Lub:

C. Zwirować 0.1-1.5 ml hodowli bakteryjnej, dokładnie usunąć supernatant i zawiesić osad w 300 µl buforu **Lyse BG**.

Uwaga 1: Dokładne zawieszenie bakterii jest niezbędne do oczyszczenia DNA z wysoką wydajnością.

Uwaga 2: Najwyższej jakości DNA uzyskuje się z hodowli bakteryjnych znajdujących się w fazie logarytmicznej wzrostu lub wczesnej fazie stacjonarnej.

2. Dodać 50 µl roztworu **BL** oraz 2 µl **RNase A** do zawiesiny komórek (p. 1.) i dokładnie wymieszać przez kilkukrotne odwracanie lub worteksować 2 sek.

Uwaga 1: W przypadku bakterii Gram⁺ posiadających ścianę komórkową wyjątkowo oporną na lizę, poza roztworem BL należy dodać odpowiedni enzym (np. lysostaphina dla *Staphylococcus* spp.).

3. Inkubować 15 min w 37°C.

4. Przejść do punktu 5. części III protokołu izolacji DNA.

II. Drożdże

1. Zwirować odpowiednią ilość hodowli drożdży, tak aby masa osadu komórek nie przekraczała 100 mg. Dokładnie usunąć supernatant i zawiesić osad w 300 μ l buforu **Lyse BG**.

Uwaga 1: Dokładne zawieszenie drożdży jest niezbędne do oczyszczania DNA z wysoką wydajnością.

Uwaga 2: Ze względu na duże różnice w tempie wzrostu i wielkości komórek różnych szczepów drożdży, należy empirycznie ustalić optymalną objętość zwirowanej hodowli (np. 4 ml 24-godzinnej hodowli większości szczepów *Pichia pastoris*), tak aby nie przekraczać 100 mg masy osadu drożdżowego przypadającego na jedną kolumnkę.

Uwaga 3: W przypadku drożdży, przed użyciem Lyse BG do 1 ml dodać 1 μ l β -merkaptoetanolu (β -ME). Po dodaniu β -ME Lyse BG jest stabilny przez 1 miesiąc.

2. Wirować z prędkością 11000 x g przez 1 min, dokładnie usunąć supernatant i ponownie zawiesić w 250 μ l buforu **Lyse BG**.
3. Dodać odpowiedni enzym np.: lyticase. Dodać również 2 μ l **RNase A**. Dokładnie wymieszać. Inkubować 30 min w 30°C.

Uwaga 1: 50 U lyticase/zymolase na 1×10^7 komórek. Objętość dodanego enzymu nie powinna przekroczyć 50 μ l.

4. Przejść do punktu 5. części III protokołu izolacji DNA.

III Izolacja DNA

5. Dodać 15 μ l **Proteinyzy K** do zawiesiny komórek i dokładnie wymieszać poprzez kilkukrotne odwracanie probówki lub worteksować 3 sek.
6. Inkubować 30 min w 55°C.
7. Dodać 350 μ l buforu **Sol BG** i dokładnie wymieszać poprzez kilkukrotne odwracanie probówki lub worteksować 3 sek.
8. Inkubować 5 min w 55°C.
9. Worteksować 15 sek.
10. Lizat wirować w mikrowirówce przez 2 min z prędkością 11000 x g, a następnie przenieść klarowny supernatant do minikolumny.
11. Wirować przez 1 min z prędkością 11000 x g. Wylać przesącz i umieścić minikolumnę z powrotem w probówce odbierającej.
12. Dodać 600 μ l buforu płuczącego **Wash BGX** do minikolumny. Wirować przez 1 min z prędkością 11000 x g.

13. Wyjąć minikolumnę, wyłączyć przesącz i umieścić minikolumnę z powrotem w probówce odbierającej.

14. Dodać 300 μ l buforu płuczącego **Wash BGX** do minikolumny. Wirować przez 2 min z prędkością 11000 x g.

15. Minikolumnę umieścić w nowej probówce typu Eppendorf 1.5-2 ml. Dodać 100 μ l buforu **Elution** ogrzanego do 80°C.

Uwaga 1: Dodanie buforu elującego centralnie na powierzchnię membrany zapewnia uzyskanie maksymalnej wydajności odzysku DNA. Należy unikać dotykania ścianek minikolumny mikropipetą, aby nie przenosić śladów DNA pomiędzy kolejnymi minikolumnami.

Uwaga 2: Do elucji DNA można używać alternatywnie:

1. Buforu 5-10 mM Tris-HCl, pH 7.5-8.5 (zalecany w przypadku długotrwałego przechowywania DNA w -20°C).
2. Jałową wodę destylowaną wysokiej jakości (zalecane pH 7.5-8.5)
3. Buforu TE (nie zalecany w przypadku sekwencjonowania DNA)
4. Innych buforów do celów specjalnych, o pH i stężeniu soli zbliżonym do buforu 5-10 mM Tris-HCl, pH 7.5.

16. Minikolumnę pozostawić na 2 min w temperaturze pokojowej.

17. Wirować minikolumnę przez 2 min z prędkością 11000 x g.

18. Usunąć minikolumnę, zamknąć probówkę. DNA jest gotowe do dalszych analiz/manipulacji, może być przechowywane w 2÷8°C lub zamrożone w -20°C (należy unikać wielokrotnego zamrażania i rozmrażania DNA).

Dodatek:

Protokół oczyszczania DNA genomowego i plazmidowego z drożdży

Uwaga 1: Protokół jest przeznaczony do jednoczesnej izolacji DNA genomowego oraz plazmidowego z drożdży.

Uwaga 2: W celu wydajnej lizy komórek drożdżowych należy stosować odpowiedni enzym np.: lyticase.

1. Dodać 40 μ l buforu aktywacyjnego **Buffer BG** do minikolumny (nie wirować). Pozostawić w temperaturze pokojowej do momentu naniesienia lizatu (pkt 12) na minikolumnę.

Uwaga 1: Dodanie buforu aktywacyjnego Buffer BG centralnie na powierzchnię membran zapewnia kompletne nasączenie membran buforem aktywacyjnym i uzyskanie maksymalnej wydajności wiązania DNA.

Uwaga 2: Aktywację należy wykonać przed rozpoczęciem procedury izolacji DNA.

2. Zwirować odpowiednią ilość hodowli drożdży, tak aby masa osadu komórek nie przekraczała 100 mg. Dokładnie usunąć supernatant i zawiesić osad w 300 μ l buforu **Lyse BG**.

Uwaga 1: Dokładne zawieszenie drożdży jest niezbędne do oczyszczania DNA z wysoką wydajnością.

Uwaga 2: Ze względu na duże różnice w tempie wzrostu i wielkości komórek różnych szczepów drożdży, należy empirycznie ustalić optymalną objętość zwirowanej hodowli (np. 4 ml 24-godzinnej hodowli większości szczepów *Pichia pastoris*), tak aby nie przekraczać 100 mg masy osadu drożdżowego przypadającego na jedną kolumnkę.

Uwaga 3: W przypadku drożdży, przed użyciem Lyse BG do 1 ml dodać 1 μ l β -merkaptoetanolu (β -ME). Po dodaniu β -ME Lyse BG jest stabilny przez 1 miesiąc.

3. Wirować z prędkością 11000 x g przez 1 min, dokładnie usunąć supernatant i ponownie zawiesić w 225 μ l buforu **Lyse BG**.

4. Dodać odpowiedni enzym np.: lyticase. Dodać również 2 μ l **RNase A**. Dokładnie wymieszać. Inkubować 30 min w 30°C.

Uwaga 1: 50 U lyticase/zymolase na 1×10^7 komórek. Objętość dodanego enzymu nie powinna przekroczyć 50 μ l.

5. Dodać 15 μ l **Proteiny K** do zawiesiny komórek i dokładnie wymieszać poprzez kilkukrotne odwracanie probówki lub worteksować 3 sek.

6. Inkubować 30 min w 55°C.

7. Dodać 225 μ l buforu **Sol BG** i dokładnie wymieszać poprzez kilkukrotne odwracanie probówki lub worteksować 3 sek.

8. Inkubować 5 min w 55°C.

9. Worteksować 15 sek.
10. Lizat wirować w mikrowirówce przez 2 min z prędkością 11000 x g, a następnie przenieść klarowny supernatant do nowej probówki 2 ml.
11. Dodać 250 μ l alkoholu etylowego (96-100%).
- Uwaga 1:** Po dodaniu etanolu może stracić się osad.
12. Dokładnie wymieszać przez worteksowanie i nanieść (razem z osadem jeżeli powstał) na minikolumnę.
13. Wirować przez 1 min z prędkością 11000 x g. Wylać przesącz i umieścić minikolumnę z powrotem w probówce odbierającej.
14. Dodać 600 μ l buforu płuczącego **Wash BGX** do minikolumny. Wirować przez 1 min z prędkością 11000 x g.
15. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i umieścić minikolumnę z powrotem w probówce odbierającej.
16. Dodać 300 μ l buforu płuczącego **Wash BGX** do minikolumny. Wirować przez 2 min z prędkością 11000 x g.
17. Minikolumnę umieścić w nowej probówce typu Eppendorf 1.5-2 ml. Dodać 100 μ l buforu **Elution** ogrzanego do 80°C.
- Uwaga 1:** Dodanie buforu eluującego centralnie na powierzchnię membrany zapewnia uzyskanie maksymalnej wydajności odzysku DNA. Należy unikać dotykania ścianek minikolumny mikropipetą, aby nie przenosić śladów DNA pomiędzy kolejnymi minikolumnami.
- Uwaga 2:** Do elucji DNA można używać alternatywnie:
1. Buforu 5-10 mM Tris-HCl, pH 7.5-8.5 (zalecany w przypadku długotrwałego przechowywania DNA w -20°C).
 2. Jałową wodę destylowaną wysokiej jakości (zalecane pH 7.5-8.5)
 3. Buforu TE (nie zalecany w przypadku sekwencjonowania DNA)
 4. Innych buforów do celów specjalnych, o pH i stężeniu soli zbliżonym do buforu 5-10 mM Tris-HCl, pH 7.5.
18. Minikolumnę pozostawić na 2 min w temperaturze pokojowej.
19. Wirować minikolumnę przez 2 min z prędkością 11000 x g.
20. Usunąć minikolumnę, zamknąć probówkę. DNA jest gotowe do dalszych analiz/manipulacji, może być przechowywane w 2÷8°C lub zamrożone w -20°C (należy unikać wielokrotnego zamrażania i rozmrażania DNA).

DOBÓR ZESTAWU W ZALEŻNOŚCI OD RODZAJU IZOLOWANEGO MATERIAŁU			AGAROSE – OUT	BACTERIAL & YEAST GENOMIC	BIO – TRACE	BASIC	BONE	CELL CULTURE	FOOD	HUMAN BLOOD RNA	PCR / DNA CLEAN-UP	PLANT & FUNGI	PLASMID MINIPREP	QUICK BLOOD	SHORT / DNA CLEAN-UP	SOIL	STOOL	SWAB EXTRACT	TISSUE	TISSUE & BACTERIAL	UNIVERSAL DNA/RNA /PROTEIN	UNIVERSAL RNA	UNIVERSAL RNA /miRNA	MICELLULA DNA	
DNA	GENOMOWE	BAKTERIE	X																	X					
		DROŻDZE	X																						
		HODOWLE KOMÓRKOWE							X											X	X				
		ROŚLINY I GRZYBY											X												
		KREW													X										
		GLEBA															X								
		KAŁ																X							
		WYMAZY																	X						
		TKANKI STAŁE																			X	X			
		TKANKI PŁYNNNE																			X	X			
		OGONY GRYZONI																			X	X			
		WŁOSY																			X	X			
		OWADY																			X	X			
		MOCZ																			X	X			
		KOŚCI						X																	
		ŚLADY BIOLOGICZNE			X																				
	ŻYWNOŚĆ									X															
	PLAZMIDOWE	BAKTERIE				X								X											
		DROŻDZE		X																					
	IZOLACJA Z AGAROZY		X			X																			
OCZYSZCZANIE PO PCR I REAKCJACH ENZYMATYCZNYCH					X						X				X									X	
DNA/RNA/BIAŁKA Z JEDNEJ PRÓBKII		TKANKI ZWIERZĘCE																			X				
		ROŚLINY																				X			
		BAKTERIE																				X			
		DROŻDZE																				X			
		HODOWLE KOMÓRKOWE																				X			
RNA	CAŁKOWITE POWYŻEJ 200 RYBONUKLEOTYDÓW	TKANKI ZWIERZĘCE																					X		
		ROŚLINY																					X		
		BAKTERIE																					X		
		DROŻDZE																					X		
		HODOWLE KOMÓRKOWE																					X		
		KREW LUDZKA									X														
	miRNA + CAŁKOWITE RNA	TKANKI ZWIERZĘCE																						X	
		ROŚLINY																						X	
		HODOWLE KOMÓRKOWE																						X	

GeneMATRIX to syntetyczne membrany nowej generacji wiążące DNA i RNA, wykorzystujące selektywne właściwości wiązania kwasów nukleinowych przez kompozytowy SiO₂. W celu osiągnięcia wysokiej wydajności i czystości otrzymanych kwasów nukleinowych, opracowano wyspecjalizowane buforowe wiążące i płuczające, projektowane pod kątem optymalnego wykorzystania właściwości nowych membran. Zastosowanie gotowych do użycia membran, umieszczonych w kolumnkach wirowniczych (ang. Spin-format) w połączeniu ze specjalną konstrukcją naszych minikolumn, istotnie poprawia jakość uzyskanego preparatu DNA lub RNA. Celem monitorowania kompletnego wymieszania roztworów oraz ułatwienia procedury izolacji DNA, część roztworów wyznakowano barwnikami.

W efekcie przekazujemy w Państwa ręce zestawy składające się z nowych złożeń i buforów reakcyjnych, których użycie gwarantuje szybkie, proste, bezpieczne i jednocześnie wydajne otrzymanie ultraczystych kwasów nukleinowych. Uzyskane DNA lub RNA nadaje się bezpośrednio do zastosowań w technikach biologii molekularnej, m.in.: trawienia enzymami restrykcyjnymi, defosforylacji/fosforylacji, ligacji, badań oddziaływania białko-DNA, sekwencjonowania, blottingu, translacji *in vitro*, otrzymywania cDNA, hybrydyzacji. Dodatkową zaletą zestawów jest powtarzalność właściwości zarówno membran jak i buforów wiążących, ponieważ przygotowanie komponentów odbywa się w EURx sp. z o.o.

GeneMATRIX Bacterial & Yeast Genomic DNA Purification Kit jest przeznaczony do szybkiej izolacji genomowego DNA z różnorodnych grup fizjologicznych bakterii oraz różnorodnych gatunków i szczepów drożdży. Oczyszczona DNA nie zawiera zanieczyszczeń m.in. takich jak: RNA, białka, lipidy, barwniki, detergenty, organiczne inhibitory enzymów, związki buforowe, sole, kationy dwuwartościowe. Próbkę poddana zostaje lizie w obecności specjalnego buforu, naruszającego strukturę ściany komórkowej oraz lizozymu lub w przypadku drożdży lyticase. Proteinaza K degraduje białka komórkowe oraz uwalnia genomowe DNA z wiążących je białek oraz eliminuje nukleazy komórkowe. Dodanie specjalnego buforu wytwarza warunki do selektywnego wiązania DNA do membrany **GeneMATRIX**. Podczas krótkiego wirowania następuje wiązanie DNA do membrany, natomiast niezwiązane zanieczyszczenia pozostają w wycieku z kolumny. Ich śladowe pozostałości na membranie są skutecznie usuwane w trakcie dwóch etapów płukania. Elucję oczyszczonego DNA wykonuje się buforem niskosolnym, np.: zawierającym Tris-HCl, TE lub wodą destylowaną. Oczyszczony preparat DNA nadaje się do bezpośredniego użytku. Nie wymaga dalszej precipitacji etanolem.