

Novabeads Blood Genomic DNA KIT

Zestaw do izolacji genomowego DNA z krwi świeżej i mrożonej (pobranej na EDTA, cytrynian)

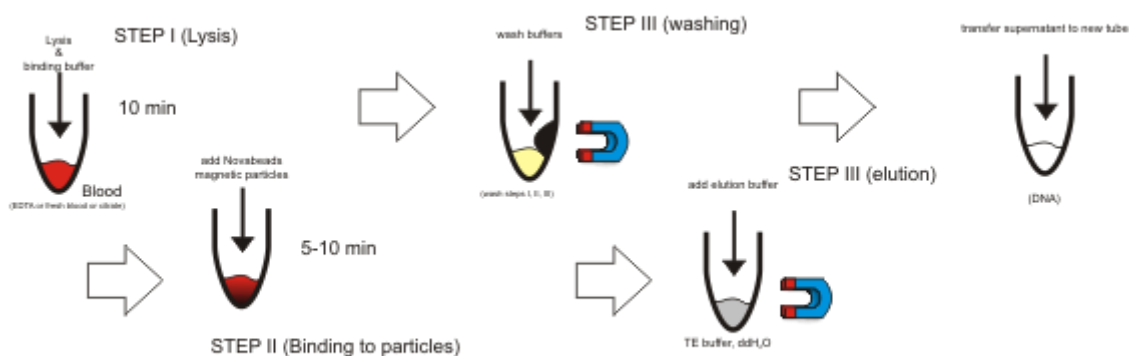
Novabeads Blood Genomic DNA KIT jest nowej generacji narzędziem w technikach biologii molekularnej umożliwiającym izolację genomowego DNA z krwi. Metoda oparta jest o zastosowanie w pełni syntetycznego kompozytowego złoża magnetycznego selektywnie wiążącego kwasy nukleinowe. Specjalnie dobrany skład buforów wiążących i płuczących pozwala uzyskać DNA o bardzo wysokiej jakości i czystości zarówno z krwi świeżej jak i mrożonej. Izolowany DNA nie ulega fragmentacji w trakcie procesu oczyszczania. Brak inhibitorów reakcji następczych pozwala na bezpośrednie zastosowanie oczyszczonych kwasów nukleinowych w innych technikach biologii molekularnej, takich jak:

- reakcja PCR
- sekwencjonowanie DNA zautomatyzowane i manualne
- defosforylacja
- fosforylacja
- ligacja
- badanie oddziaływań DNA-białko
- trawienie enzymami restrykcyjnymi.



Złoża magnetyczne w odróżnieniu od standardowych złóż stosowanych do izolacji i oczyszczania DNA umożliwiają pełną automatyzację tego procesu. Procedura nie wymaga użycia specjalistycznego sprzętu takiego jak wirówka lub pompa próżniowa.

Protokół izolacji DNA z krwi pobranej na EDTA:



Novabeads DNA purification system

W skład zestawu wchodzi:

1. Cząstki magnetyczne – **Magnetic Particles**
2. Bufor do lizy - **Lysis Buffer**
3. Bufor do wiązania – **Binding Buffer**
4. Bufor do płukania - **PreWash Buffer**
5. Bufor do płukania - **Wash Buffer**
6. Bufor do elucji - **TE Buffer**

Zestaw nie zawiera:

1. Statywu magnetycznego
2. 80% etanolu.

UWAGA! Przed przystąpieniem do pracy należy dokładnie wymieszać wszystkie bufony i cząstki magnetyczne oraz zapoznać się z protokołem reakcji..

Protokół izolacji genomowego DNA z krwi świeżej lub mrożonej:

1. Do 100 μ l krwi lub 50 μ l lizatu erytrocytarnego dodać 400 μ l **Lysis Buffer**, następnie mieszaninę **dokładnie zworteksować**. Inkubować 5-10 min w temp. pokojowej. (*)
2. Po zakończeniu inkubacji dodać 100 μ l **Binding Buffer** (**). Zawartość probówki bardzo **dokładnie zworteksować**.
3. Dodać 10 μ l **Magnetic Particles** (cząstek magnetycznych). Zawartość probówki **dokładnie zworteksować**. Inkubować 5-10 min w temp. pokojowej.
4. Probówkę umieścić w statywie magnetycznym, a następnie po zebraniu się cząstek magnetycznych odrzucić supernatant.
5. Do cząstek magnetycznych dodać 1 ml **PreWash Buffer**. Zawartość probówki wymieszać przez kilkukrotne jej odwrócenie (**nie worteksować!**). Mieszać należy do chwili całkowitego oderwania się cząstek od powierzchni probówki.
6. Probówkę umieścić w statywie magnetycznym, po zebraniu się cząstek magnetycznych odrzucić supernatant.
7. Do cząstek magnetycznych dodać 1 ml **PreWash Buffer**. Zawartość probówki wymieszać przez kilkukrotne jej odwrócenie. Mieszać należy do chwili całkowitego oderwania się cząstek od powierzchni probówki (**nie worteksować!**). Inkubować 5 min w temp. pokojowej.
8. Probówkę umieścić w statywie magnetycznym, po zebraniu się cząstek magnetycznych odrzucić supernatant.
9. Do cząstek magnetycznych dodać 1 ml **Wash Buffer**. Zawartość probówki wymieszać przez kilkukrotne jej odwrócenie. (**nie worteksować!**)

10. Probówkę umieścić w statywie magnetycznym, po zebraniu się cząstek magnetycznych odrzucić supernatant.
11. Do cząstek magnetycznych dodać 1 ml **80% etanolu**. Zawartość probówki wymieszać do całkowitego oderwania cząstek magnetycznych od ścianki probówki (**nie worteksować!**). Inkubować 1 min.
12. Probówkę umieścić w statywie magnetycznym, po zebraniu się cząstek magnetycznych odrzucić supernatant.
13. W celu usunięcia pozostałości etanolu otworzyć probówki i odwrócić statyw następnie postawić w tej pozycji na bibule przez ok. 5 min.
14. Cząstki magnetyczne zawiesić przez worteksowanie w 50µl **TE Buffer**. Mieszaninę inkubować w temp. 65°C przez 5 min/ 800 rpm, a następnie przy otwartej probówce w temp. 65°C przez 5 min/ 800 rpm.
15. Supernatant przenieść do nowej probówki maksymalnie oczyszczając go z cząstek magnetycznych.

Uzyskany DNA przechowywać w temp. -20°C. W przypadku długotrwałego przechowywania zalecamy przechowywanie w temp. -70°C.

* Przed przystąpieniem do izolacji zalecamy dodanie 20ul 0,5M EDTA pH 8.0 na każde 100ul krwi i dokładne zworteksowanie mieszaniny. Krew po zmieszaniu z Lysis Buffer powinna mieć intensywnie czerwono-wiśniowy transparentny kolor. W przypadku izolacji DNA z lizatu erytrocytarnego warunkiem przeprowadzenia prawidłowej izolacji jest całkowite rozpuszczenie koagulatu białkowego w Lysis Buffer.

** Warunkiem przeprowadzenia prawidłowej izolacji jest całkowite rozpuszczenie koagulatu białkowego, który pojawia się po dodaniu **Binding Buffer**. Zawartość probówki należy wymieszać pipetując a następnie bardzo dokładnie zworteksować.

Uwaga! Krew jest tkanką bardzo niejednorodną. W przypadku postępującego procesu chorobowego jej skład ulega znacznej zmianie. Ilość DNA uzyskanego w procesie izolacji zależy przede wszystkim od ilości leukocytów, która nawet u zdrowych osób jest zmienna i wzrasta na przykład w wyniku wysiłku fizycznego, czy w okresie ciąży lub zmienia się w czasie postępującego procesu chorobowego. U osoby zdrowej możliwe jest uzyskanie do 2µg DNA ze 100µl krwi obwodowej (pobranej na EDTA). ilość DNA uzyskanego w trakcie izolacji może być bardzo zróżnicowana.

W przypadku znacznej leukopenii, aby uzyskać dostateczną ilość DNA do badań zalecamy wydłużenie czasu lizy i wiązania z cząstkami magnetycznymi do 10 -15 min oraz zmniejszenie ilości buforu do lizy **Lysis Buffer** do 250 ul z 400ul oraz proporcjonalnie buforu do wiązania **Binding Buffer**.

Najczęściej pojawiające się problemy podczas procesu izolacji i sposoby ich rozwiązania:

1. Eluat zabarwiony na kolor pomarańczowy lub czerwony, zanieczyszczenie eluatu hemem:
 - nadmierna hemoliza na etapie lizy komórkowej – należy skrócić czas lizy komórek.
 - niedostateczne płukanie w **Prewash Buffer** – należy płukać, aż do momentu oderwania się wszystkich cząstek od ścianki próbówki.
2. Niski stosunek OD 260/280nm
 - niedostateczne płukanie w **Prewash Buffer** – należy płukać, aż do momentu oderwania się wszystkich cząstek od ścianki próbówki.
 - zanieczyszczone zatyczki probówek. W czasie płukania należy pamiętać o dokładnym usunięciu roztworów płuczących z zatyczek probówek.
 - Niewystarczające zworteksowanie mieszaniny po podaniu **Binding Buffer**.
3. Etanol w eluacie.
 - wydłużyć czas drugiego etapu elucji do 10 min.
4. Niska wydajność reakcji.
 - Zbyt krótki czas inkubacji na etapie lizy komórkowej - wydłużyć czas lizy do 15 min.
5. Agregowanie cząstek magnetycznych na etapie płukań. Niewystarczające zworteksowanie mieszaniny po podaniu **Binding Buffer**.

Aby zapobiec parowaniu i krystalizacji odczynników, zlecamy zabezpieczenie parafilmem butelek z buforami po każdej izolacji.

Warunki przechowywania: +4° C

Lot nr

Exp. date

UWAGA! Pewne składniki buforów mogą działać silnie drażniąco. Podczas pracy ze wszystkimi związkami chemicznymi należy przestrzegać ogólnie obowiązujących przepisów BHP. Ten produkt został zaprojektowany

i wykonany wyłącznie do celów badawczych. Nie został przetestowany w kierunku zastosowania do celów diagnostycznych i do bezpośredniej produkcji leków oraz do celów związanych z produkcją leków.