



EliGene® Blood DNA Isolation Kit

Návod k použití

Balení:

Kat. číslo	Velikost balení
411050	50 izolací

Skladování:

Všechny reagenty a komponenty kitu musejí být přepravovány při pokojové teplotě (15 - 30 °C). Proteináza K musí být po přepravě skladována při 2 - 8 °C. Při dodržení těchto skladovacích podmínek si kit plně udrží svou aktivitu, dokud neuběhne expirační doba uvedená na kitu.

Obsah

Úvod	2
Požadavky na vybavení	2
Obsah kitu	2
Preventivní opatření	2
Detailní izolační protokol	3
Stručný izolační protokol	5
Řešení problémů	6



Úvod

EliGene® Blood DNA Isolation Kit je navržený pro rychlou izolaci genomické a mitochondriální DNA z lidské krve (čerstvé, zmražené nebo skladované při 4 °C) a *buffy coat*. V přítomnosti detergentu a proteinázy K jsou buňky lyzovány a proteiny denaturovány. V přítomnosti chaotropního činidla je DNA vázána na spin filtr, promyta a eluována v TRIS-HCl pufru bez EDTA. DNA je připravena k použití v PCR, qPCR a sekvenování.

Požadavky na vybavení

Mikrocentrifuga (12,000 x g)
Vortex
Termostat/Termoshaker
Stojan pro mikrocentrifugační zkumavky
Pipety: 20 – 700 µl

Obsah kitu

Komponenty	Množství (50 izolací)
Lysis Buffer B1	12 ml
Binding Buffer B2	12 ml
Wash Buffer B3	27 ml
Wash Buffer B4	27 ml
Elution Buffer S5	12 ml
Proteinase K (20 mg/ml)	1 ml
Spin Filters (Units in 2 ml Tubes)	50 ks
2 ml Collection Tubes	100 ks
1.5 ml Lysis Tubes	50 ks

Preventivní opatření

Při používání produktu prosím používejte ochranné rukavice a vyhněte se kontaktu reagensů s kůží. V případě kontaktu reagensů s kůží omyjte zasažené místo proudem tekoucí vody. Zabraňte požití. V případě kontaktu nebo náhodného požití nahlédněte do MSDS protokolu.

Reagencie označené jako hořlavé uchovávejte v bezpečné vzdálenosti od otevřeného ohně a jisker.

UPOZORNĚNÍ: Binding Buffer B2, Wash Buffer B3 a Wash Buffer B4 jsou hořlavé.



Podrobný izolační protokol

Důrazně doporučujeme prostudovat si následující informace před prvním použitím EliGene® Blood DNA Isolation Kitu.

Důležitá upozornění před použitím

Prosím noste rukavice po celý čas práce s kitem.

Pokud je v Lysis Buffer B1 precipitát, zahřejte láhev s pufrem na 50 °C a rozpustěte ho.

Pro efektivní eluci DNA ze spin filtru do Elution Buffer B5 je klíčové odstranění zbytkového etanolu ze spin filtru.

1. Napipetujte 200 µl plné krve do 1,5 ml Lysis Tube (součástí balení) a přidejte 20 µl proteinázy K.
Poznámka: Proteináza K rozkládá buněčnou stěnu a umožňuje lýzu buňky. Inkubace není potřebná.
2. Přidejte 200 µl Lysis Buffer B1 a vortexujte 15 sekund.
Poznámka: Lysis Buffer B1 je lyzující činidlo obsahující chaotropní soli a neionizující detergent.
3. Inkubujte vzorek 15 minut při 65 °C a krátce stočte, abyste odstranili roztok z víčka zkumavky.
Poznámka: Teplo napomáhá denaturaci proteinů a lýze.
4. Přidejte 210 µl Binding Buffer B2 a vortexujte 15 sekund. Krátce stočte, abyste odstranili roztok z víčka zkumavky.
Poznámka: Binding Buffer B2 obsahuje propanol a chaotropní soli, které poskytují optimální podmínky pro vazbu DNA.
5. Přemístěte celý lyzát (630 µl) do spin filtru a centrifugujte 1 minutu při 10 000 x g.
Poznámka: DNA přilne díky chaotropním solím k silikonové membráně spin filtru. Tekutá složka procházející skrz membránu obsahuje nenavázaný buněčný materiál jako denaturované proteiny a RNA.
6. Přemístěte spin filtr do nové 2 ml Collection Tube (součástí balení).
7. Přidejte 500 µl Wash Buffer B3 do spin filtru. Centrifugujte 1 minutu při 10 000 x g.
Poznámka: Wash Buffer B3 je promývací roztok, který pročistí DNA navázanou na spin filtru od nečistot.
8. Vyjměte spin filtr a odstraňte roztok z 2 ml Collection Tube. Poté umístěte spin filtr zpátky do stejné 2 ml Collection Tube.
9. Přidejte 500 µl Wash Buffer B4 do spin filtru. Centrifugujte 1 minutu při 10 000 x g.
Poznámka: Wash Buffer B4 je promývací roztok na bázi etanolu, který pročistí DNA navázanou na spin filtru od zbylých nečistot. Odstraňuje všechny zbytkové nečistoty soli.



10. Vyjměte spin filtr a odstraňte roztok. Poté umístěte spin filtr zpátky do stejné 2 ml Collection Tube.
11. Pro vysušení membrány spin filtru znovu centrifugujte 2 minuty při 12 000 x g.
Poznámka: Membrána spin filtru je zcela vysušena od etanolových zbytků pro zvýšení výtěžnosti DNA v elučním kroku.
12. Opatrně vyjměte spin filtr a přemístěte ho do nové 2 ml Collection Tube (součástí balení).
13. Přidejte 100 µl Elution Buffer B5.
Poznámka: Pro zvýšení výtěžnosti inkubujte 5 minut při 65 °C.
14. Centrifugujte 1 minutu při 10 000 x g.
15. Vyjměte spin filtr. Genomická DNA je nyní připravena k použití pro další aplikace.
Poznámka: Elution Buffer B5 je 10 mM Tris. Uvolňuje DNA z filtru a ta přechází do 2 ml Collection Tube. DNA je uvolněna kvůli nepřítomnosti solí a etanolu.



Stručný izolační protokol

1. Napipetujte 200 μ l plné krve do 1,5 ml Lysis Tube a přidejte 20 μ l proteinázy K.
2. Přidejte 200 μ l Lysis Buffer B1 a vortexujte 15 vteřin.
3. Inkubujte vzorek 15 minut při 65°C a krátce stočte, abyste odstranili roztok z víčka zkumavky.
4. Přidejte 210 μ l Binding Buffer B2 a vortexujte 15 vteřin. Krátce stočte, abyste odstranili roztok z víčka zkumavky.
5. Přemístěte celý lyzát (630 μ l) do spin filtru a centrifugujte 1 minutu při 10 000 x g.
6. Přemístěte Spin Filtr do nové 2 ml Tube.
7. Přidejte 500 μ l Wash Buffer B3 do spin filtru. Centrifugujte 1 minutu při 10 000 x g.
8. Vyjměte spin filtr a odstraňte roztok. Poté umístěte spin filtr zpátky do stejné 2 ml Collection Tube.
9. Přidejte 500 μ l Wash Buffer B4 do spin filtru. Centrifugujte 1 minutu při 10 000 x g.
10. Vyjměte spin filtr a odstraňte roztok. Poté umístěte spin filtr zpátky do stejné 2 ml Tube.
11. Pro vysušení membrány spin filtru znovu centrifugujte 2 minuty při 12 000 x g.
12. Opatrně vyjměte spin filtr a přemístěte ho do nové 2 ml Collection Tube.
13. Přidejte 100 μ l Elution Buffer B5. Centrifugujte 1 minutu při 10 000 x g.
14. Vyjměte spin filtr. Genomická DNA v 2 ml Tube je připravena k použití pro další aplikace.



K 200 μ l krve přidejte:
200 μ l Lysis Buffer B1
20 μ l proteinázy K.
Inkubujte 15 minut při 65 °C.



Přidejte 210 μ l Binding Buffer B2 a přemístěte celý lyzát do spin filtru.



Promyjte s 500 μ l Wash Buffer B3.



Promyjte s 500 μ l Wash Buffer B4.



Eluujte DNA do 100 μ l Elution Buffer B5.





Řešení problémů

Ucpávání silikonového spin filtru

Pokud dodržujete doporučení uvedená v tomto manuálu, silikonová membrána by se neměla ucpávat. Přesto uvádíme řešení nejčastějších příčin ucpávání membrány:

- Nedokončená lýza buněk. Přesvědčte se, že jste po přidání Lysis Buffer B1 směs dostatečně zvortexovali a nezapomněli jste přidat proteinázu K. Důležité je také správné nastavení teploty.
- Nepoužívejte více než 200 µl lidské krve. Pro ostatní živočišné druhy začněte s 50 – 100 µl krve rozředěné PBS pufrem do 200 µl.
- Krev musí být ošetřena antikoagulanty pro zamezení tvorby krevních sraženin. Nepoužívejte spin filtr na sraženou krev. Pokud se vám v krvi vytvořily sraženiny, odstraňte je ze vzorku a použijte pouze tekutou část.

Nízká výtěžnost DNA

Průměrná výtěžnost z 200 µl lidské krve je přibližně 4 µg DNA. Výtěžnost DNA může být nižší, pokud byla DNA skladována dlouhou dobu nebo opakovaně zmrazována a rozmrazována. Pokud máte problémy s nízkou výtěžností, zkontrolujte také následující body:

- Nedostatečná lýza buněk. Přesvědčte se, že jste po přidání Lysis Buffer B1 směs dostatečně zvortexovali a nezapomněli jste přidat Proteinázu K.
- Důležité je správné nastavení teploty pro lýzu.
- Nemíchejte spolu proteinázu K a Lysis Buffer B1 před použitím.
- Nepřeskakujte krok odstranění zbytkového etanolu ze spin filtru. Je to klíčový krok pro efektivní eluci DNA ze spin filtru do Elution Buffer 5.

DNA má nízký poměr A260/280

Poměr A260/280 pro čistou DNA by se měl pohybovat v rozmezí 1,7 – 1,9. Poměr nižší než 1,6 může poukazovat na znečištění DNA proteiny. Máte-li problémy s nízkým poměrem A260/280 zkontrolujte následující:

- Přesvědčte se, že jste nejprve použili Wash Buffer B3 a až následně Wash Buffer B4
- Používáte-li Nanodrop, používejte jako blank Elution Buffer B5.

DNA vyplavala z jamek při nanášení na gel

- Ve vzorku zůstaly zbytky Wash Buffer B4. Nepřeskakujte krok odstranění zbytkového etanolu ze spin filtru. Zároveň můžete prodloužit dobu vysoušení centrifugací na 1 – 2 minuty.



Koncentrování DNA

Finální množství eluované DNA je 100 µl. DNA může být koncentrována přidáním 4 µl 5M NaCl a převrácením zkumavky 3 – 5krát k promíchání. Poté přidejte 400 µl 100% studeného etanolu, opět převrácením zkumavky 3 – 5krát promíchejte a centrifugujte 15 minut při 12 000 x g a pokojové teplotě. Odstraňte supernatant a promyjte DNA pelet 70% etanolem. Zbylý etanol nechejte odpařit pomocí exsikátoru a resuspendujte DNA na požadovaný objem pomocí PCR vody nebo pufru.

Výrobce:

ELISABETH PHARMACON, spol. s r. o.

Rokycanova 4437/5, Brno-Židenice 615 00

info@elisabeth.cz | www.elisabeth.cz | tel.: +420 542 213 851



Katalogové číslo



Číslo šarže



Datum expirace



Skladovací podmínky (teplotní limity)



Výrobce



Počet reakcí v balení