ELISABETH PHARMACON, spol. s r.o.
Rokycanova 4437/5
615 00 Brno-Židenice, Česká republika
IČ: 26258412, DIČ: CZ26258412
Tel.: +420 542 213 851
E-mail: info@elisabeth.cz
www.elisabeth.cz

EliGene® Tissue DNA Isolation Kit
Návod k použití

Balení:

Kat. č.	Velikost balení
413050P	50 Izolací
(Obsahuje Homogenization Pestles)	
413050	50 Izolaci
(Neobsahuje Homogenization Pestles)	

Skladování:

Všechny reagencie a komponenty kitu musejí být přepravovány při pokojové teplotě (15 - 30 °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 3
Recyklování Homogenization Pestles (plastových tloučků) 3
Podrobný izolační protokol 3
Stručný izolační protokol 6
Řešení problémů 7

ELISABETH PHARMACON, spol. s r.o.
Rokycanova 4437/5
615 00 Brno-Židenice, Česká republika
IČ: 26258412, DIČ: CZ26258412
Tel.: +420 542 213 851
E-mail: info@elisabeth.cz
www.elisabeth.cz

Úvod

EliGene® Tissue DNA Isolation Kit je určen pro izolaci genomové DNA z tkání. V přítomnosti chaotropního činidla je DNA navázána na spin filtr, promývána a eluována v Tris-HCl pufru bez EDTA. DNA je připravena k použití v PCR, qPCR a sekvenování.

Kvalita a výtěžek izolované DNA závisí na kvalitě tkáně, zdroji tkáně, stáří vzorku a množství tkáně. Měření koncentrace DNA závisí na zvoleném způsobu, např. spektrofotometrie měří jak dvojvláknovou, tak jednovláknovou DNA, zatímco fluorimetrie pomocí PicoGreen® (Molecular Probes, Inc.) měří pouze dvojvláknovou DNA. DNA izolovaná ze zmrazené tkáně je fragmentována více než z čerstvé tkáně, to může vést k rozmazaným proužkům na gelu. Starší vzorky a vzorky nižší kvality vedou rovněž k většímu rozmazání proužků na gelu. V těchto případech doporučujeme pomocí PCR amplifikovat kratší oblasti DNA.

Požadavky na vybavení

Mikrocentrifuga (12 000 x g)
Vortex
Termostat/Termoshaker, možnost inkubace při 65 °C
Pipety: 50 – 750 µl
Váhy

Obsah kitu

Komponenty	Množství (50 izolací)
Lysis Buffer T1	16,5 ml
Binding Buffer T2	14 ml
Binding Buffer T3	14 ml
Wash Buffer T4	27 ml
Wash Buffer T5	27 ml
Elution Buffer T6	6 ml
Homogenization Pestles (413050P)	50 ks
Homogenization Sand	13 g
1,5 ml Tubes	50 ks
Spin Filters (Units in 2 ml Collection Tubes)	50 ks
2 ml Collection Tubes	50 ks

Preventivní opatření

Při používání produktu prosím používejte ochranné rukavice a vyhněte se kontaktu reagencií s kůží. V případě kontaktu reagencií s kůží omyjte zasažené místo proudem tekoucí vody. Zabraňte požití. V případě kontaktu nebo náhodného požití nahlédněte do MSDS listů.
Reagencie označené jako hořlavé uchovávejte v bezpečné vzdálenosti od otevřeného ohně a jisker.

UPOZORNĚNÍ: Binding Buffer T3, Wash Buffer T4 a Wash Buffer T5 jsou hořlavé.

Recyklování Homogenization Pestles (plastových tloučků)

Inkubujte Homogenization Pestles 24 hodin v 0,2 M kyselině chlorovodíkové (HCl). Po inkubaci omyjte Homogenization Pestles sterilní destilovanou vodou.
Pokud máte problémy připravit 0,2 M roztok kyseliny chlorovodíkové, můžete kontaktovat naše obchodní oddělení na adrese info@elisabeth.cz. Můžeme Vám jej nabídnout.

Podrobný izolační protokol

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

Důležitá upozornění před použitím

- **Prosím noste rukavice po celý čas práce s kitem.**
- **Pokud je v Lysis Buffer T1 a/nebo v Binding Buffer T2, precipitát, zahřejte lahvičku s pufrem na 60 °C a rozpusťte ho.**
- **Pro efektivní eluci DNA ze spin filtru do Elution Buffer T6 je klíčové odstranění zbytkového etanolu ze spin filtru.**

1. Do 1,5 ml zkumavky (součástí balení) přidejte 0,2 g Homogenization Sand, 50 µl Lysis Buffer T1 a 15 – 20 mg vzorku tkáně. Použijte Homogenization Pestle (tlouček) k rozmělnění vzorku.
2. Přidejte 250 µl Lysis Buffer T1 a krátce zvortexujte.

   Poznámka: Lysis Buffer T1 obsahuje roztok zabraňující degradaci nukleových kyselin a pomáhá odstranit proteiny. Lysis Buffer T1 zahrnuje veškeré složky potřebné pro kompletní lýzu buňky a může být použitý i když je zahřátý.
3. Vzorek přemístěte do termostatu a inkubujte při teplotě 65 ° C po dobu 20 minut.
4. Přidejte 250 µl Binding Buffer T2 a zvortexujte, poté krátce stočte.

Poznámka: Binding Buffer T2 obsahuje chaotropní soli, které poskytují optimální podmínky pro vazbu DNA na spin filter, avšak ne pro organické non-DNA a anorganické složky.

5. Přidejte 250 µl Binding Buffer T3 a zvortexujte.

   Poznámka: Binding Buffer T3 obsahuje etanol, který poskytuje optimální podmínky pro vazbu DNA na spin filter, avšak ne pro organické non-DNA a anorganické složky.

6. Centrifugujte vzorek 2 minuty při 10 000 x g.
7. Přemístěte supernatant do spin filtru a centrifugujte 1 minutu při 8 000 x g při pokojové teplotě.

   Poznámka: DNA přilne díky chaotropním solím k silikátové membráně spin filtru. Tekutá složka procházející skrz membránu obsahuje nenavázaný buněčný materiál.

8. Vyjměte spin filtr a odstraňte roztok z 2 ml Collection Tube. Poté umístěte spin filtr zpět do stejné 2 ml Collection Tube.
9. Přidejte 500 µl Wash Buffer T4 do spin filtru. Centrifugujte 1 minutu při 8 000 x g.

   Poznámka: Wash Buffer T4 je promývací roztok na bázi etanolu, který pročistí DNA navázanou na spin filtru od nečistot.

10. Vyjměte spin filtr a odstraňte roztok. Poté umístěte spin filtr zpět do stejné 2 ml Collection Tube.
11. Přidejte 500 µl Wash Buffer T5 do spin filtru. Centrifugujte 1 minutu při 8 000 x g. Vyjměte spin filtr a odstraňte proteklý roztok. Poté umístěte spin filtr zpět do stejné 2 ml Collection Tube.

    Poznámka: Wash Buffer T5 je promývací roztok na bázi etanolu, který pročistí DNA navázanou na spin filtru od nečistot.

12. Centrifugujte 2 minuty při 12 000 x g pro úplné vyschnutí membrány spin filtru.

    Poznámka: Membrána spin filtru je zcela vysušena od etanolových zbytků, čímž se zvýší výtěžnost DNA v elučním kroku.

13. Opatrně vyjměte spin filtr a přemístěte ho do nové 2 ml Collection Tube (součástí balení).
14. Přidejte 50 – 100 µl Elution Buffer T6.

    Poznámka: Pro zvýšení výtěžnosti inkubujte 5 minut při 65 °C.

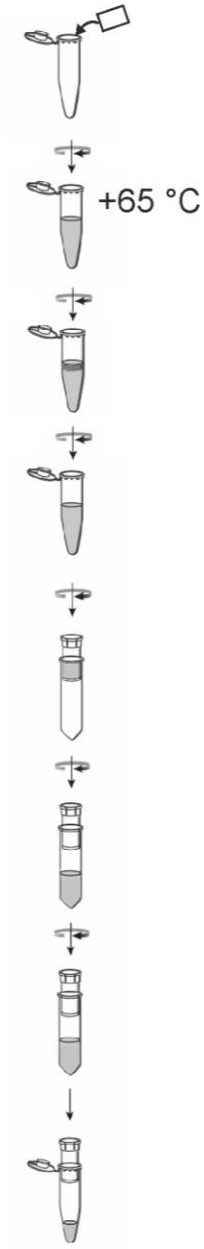
15. Inkubujte 1 minutu při pokojové teplotě. Centrifugujte 1 minutu při 10 000 x g.

    Poznámka: Elution Buffer T6 je 10 mM Tris-HCl. Uvolňuje DNA z filtru a ta přechází do 2 ml Collection Tube. DNA je uvolněna kvůli nepřítomnosti solí a etanolu.

16. Vyjměte spin filtr. Izolovaná DNA ve zkumavce je nyní připravena k použití pro další aplikace.

ELISABETH PHARMACON, spol. s r.o.
Rokycanova 4437/5
615 00 Brno-Židenice, Česká republika
IČ: 26258412, DIČ: CZ26258412
Tel.: +420 542 213 851
E-mail: info@elisabeth.cz
www.elisabeth.cz

Stručný izolační protokol



1. Do 1,5 ml zkumavky (součástí balení) přidejte 0,2 g Homogenization Sand, 50 µl Lysis Buffer T1 a 15 – 20 mg vzorku tkáně. Použijte Homogenization Pestle (tlouček) k rozmělnění vzorku.
2. Přidejte 250 µl Lysis Buffer T1 a krátce zvortexujte.
3. Vzorek přemístěte do termostatu a inkubujte při teplotě 65 ° C po dobu 20 minut.
4. Přidejte 250 µl Binding Buffer T2 a zvortexujte, poté krátce stočte.
5. Přidejte 250 µl Binding Buffer T3 a zvortexujte.
6. Centrifugujte vzorek 2 minuty při 10 000 x g.
7. Přemístěte supernatant do spin filtru a centrifugujte 1 minutu při 8 000 x g při pokojové teplotě.
8. Vyjměte spin filtr a odstraňte roztok z 2 ml Collection Tube. Poté umístěte spin filtr zpět do stejné 2 ml Collection Tube.
9. Přidejte 500 µl Wash Buffer T4 do spin filtru. Centrifugujte 1 minutu při 8 000 x g.
10. Vyjměte spin filtr a odstraňte roztok. Poté umístěte spin filtr zpět do stejné 2 ml Collection Tube.
11. Přidejte 500 µl Wash Buffer T5 do spin filtru. Centrifugujte 1 minutu při 8 000 x g. Vyjměte spin filtr a odstraňte proteklý roztok. Poté umístěte spin filtr zpět do stejné 2 ml Collection Tube.
12. Centrifugujte 2 minuty při 12 000 x g pro úplné vyschnutí membrány spin filtru.
13. Opatrně vyjměte spin filtr a přemístěte ho do nové 2 ml Collection Tube (součástí balení).
14. Přidejte 50 – 100 µl Elution Buffer T6.
15. Inkubujte 1 minutu při pokojové teplotě. Centrifugujte 1 minutu při 10 000 x g.
16. Vyjměte spin filtr. Izolovaná DNA ve zkumavce je nyní připravena k použití pro další aplikace.

ELISABETH PHARMACON, spol. s r.o.
Rokycanova 4437/5
615 00 Brno-Židenice, Česká republika
IČ: 26258412, DIČ: CZ26258412
Tel.: +420 542 213 851
E-mail: info@elisabeth.cz
www.elisabeth.cz

Řešení problémů

Pokud se DNA neamplifikuje

- Ujistěte se, že jste zkontrolovali výtěžky DNA a čistotu gelovou elektroforézou, UV spektrofotometrem nebo fluorimetrem (pomocí PicoGreen®, Molecular Probes, Inc.). Nadbytečné množství DNA by inhibovalo PCR reakci.
- Ujistěte se, že jste správně promíchali Wash Buffer T4 a T5, když se delší dobu nepoužívali. Složky izolačních roztoků se mohly oddělit.
- Zřeďte templátovou DNA.

Eluovaný vzorek DNA je zbarvený nebo ucpává spin filtr

- Pokud dodržujete doporučení v těchto pokynech, nesmí být v izolované DNA pozorováno žádné zbarvení.
- Pokud se kolonka ucpává, zvyšte objem T2 a T3 roztoku na 300 ul. V případě, že po kroku č. 7 neproteče celý objem a nad filtrem zůstane malá vrstva lyzátu, přidejte roztok T4 a pokračujte podle návodu. Pokud proteče celý objem kolonky, izolace je v pořádku. V případě, že roztok T4 neproteče, je třeba izolaci zopakovat s menší navážkou tkáně.
- Neizolujte více než 20 mg tkáně.

Nízká výtěžnost DNA

- Vezměte prosím na vědomí, že výtěžky a kvalita DNA se budou lišit a výtěžek bude nižší ve srovnání s čerstvou nebo zmrazenou tkání. Kvalita a koncentrace izolátu DNA je ovlivněna kvalitou tkáně, zdrojem tkáně, stářím vzorku a množstvím tkáně.
- Vezměte v úvahu, že různé měřicí metody vedou k různým koncentracím v závislosti na tom, zda se použije UV spektrometrie nebo fluorometrie. Spektrofotometrie měří jak dvouvláknovou, tak jednovláknovou DNA, zatímco fluorometrie pomocí PicoGreen® (Molecular Probes, Inc.) měří pouze dvojvláknovou DNA.
- Dbejte na to, aby byl vzorek dobře promíchán po přidání Lysis Buffer T1.
- Nastavte správně teplotu pro lýzu.
- Nepřeskakujte krok odstranění zbytkového etanolu ze spin filtru. Je to klíčový krok pro efektivní eluci DNA ze spin filtru do Elution Buffer T6.

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:

- Ujistěte se, že jste provedli promývací krok s Wash Buffer T5.
- Používáte-li Nanodrop, používejte jako blank Elution Buffer T6.

DNA vyplavala z jamek při nanášení na gel

- Ve vzorku zůstaly zbytky Wash Buffer T5. Nepřeskakujte krok odstranění zbytkového etanolu ze spin filtru. Zároveň můžete prodloužit dobu vysoušení centrifugací na 3 minuty.

Koncentrování DNA

Finální množství eluované DNA je 50 – 100 µl. DNA může být koncentrována přidáním 10 µl 3 M acetátu sodného (pH = 5,2) a převracením zkumavky 3 – 5krát k promíchání. Poté přidejte 200 µl studeného 100% etanolu, opět převracením zkumavky 3 – 5krát promíchejte a centrifugujte 15 minut při 12 000 x g a pokojové teplotě. Odstraňte supernatant a promyjte pelet DNA 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

REF	Katalogové číslo		Skladovací podmínky (teplotní limity)
LOT	Číslo šarže		Výrobce
	Datum expirace	Σ	Počet reakcí v balení