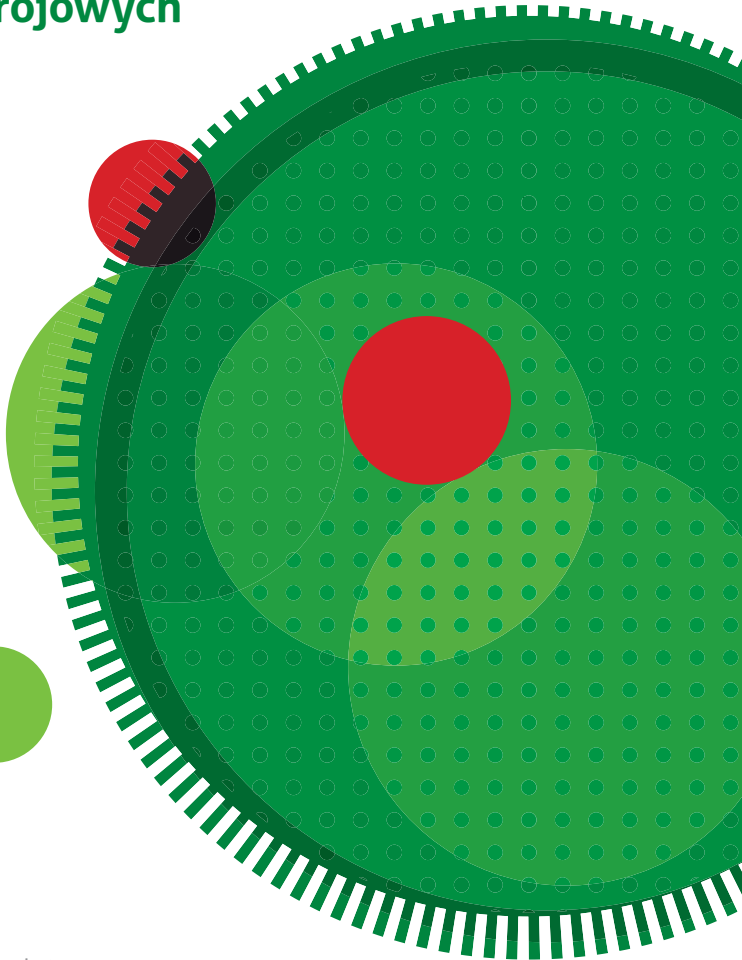


**Zestaw do izolacji DNA z krwi świeżej,
mrożonej, osocza, surowicy, kożuszków
leukocytarnych, limfocytów oraz
płynów ustrojowych**



I. PRZEZNACZENIE ZESTAWU

Zestaw **EXTRACTME DNA BLOOD KIT** przeznaczony jest do szybkiej i wydajnej izolacji genomowego DNA o wysokiej czystości z krwi świeżej lub mrożonej (ludzkiej lub ssaczey), osocza, surowicy, kożuszków leukocytarnych, limfocytów oraz płytnów ustrojowych. Protokół izolacji i składy buforów zostały zoptymalizowane w celu osiągnięcia zarówno wysokiej wydajności, jak i czystości izolowanego DNA. Produkt przeznaczony jest wyłącznie do użytku w celach badawczych.

II. SKŁAD I PRZECHOWYWANIE ZESTAWU

LICZBA IZOLACJI	10 IZOLACJI	50 IZOLACJI	250 IZOLACJI	¹ Warunki przechowywania
Nr katalogowy	EM05-010	EM05-050	EM05-250	
RBC Lysis Buffer (Red Blood Cell Lysis Buffer)	10 ml	50 ml	250 ml	TP
BL Buffer (Lysis Buffer)	3.8 ml	19 ml	94 ml	TP
▲ Proteinase K* (lyophilized)	1 szt.	1 szt.	5 szt.	-20°C ²
Proteinase Buffer	200 µl	320 µl	1.6 ml	TP
BB Buffer (conc.)** (Binding Buffer)	1.8 ml	10 ml	44 ml	TP
BW1 Buffer (conc.)** (Wash Buffer)	3.3 ml	17 ml	82 ml	TP
BW2 Buffer (conc.)** (Wash Buffer)	1.4 ml	9 ml	33 ml	TP
Elution Buffer	2 ml	10 ml	5 x 10 ml	TP
DNA Purification Columns	10 pcs	50 pcs	5 x 50 pcs	TP
Collection Tubes (2 ml)	10 pcs	50 pcs	5 x 50 pcs	TP

¹ TP – temperatura pokojowa (+15°C do +25°C)

² Roztwór **Proteinase K** należy przechowywać w temperaturze **-20°C**.

* Przed pierwszym użyciem do próbki zawierającej liofilizat **Proteinase K** należy dodać 320 µl Proteinase Buffer (w zestawie na 10 izolacji należy dodać 200 µl buforu)

** Przed pierwszym użyciem do **BB, BW1 i BW2 Buffer** należy dodać odpowiednią ilość **96–100%** etanolu (informacja na etykietach oraz w poniższej tabeli). Po dodaniu etanolu zalecane jest oznaczenie butelki.

LICZBA IZOLACJI	10 IZOLACJI	50 IZOLACJI	250 IZOLACJI
Nr katalogowy	EM05-010	EM05-050	EM05-250
BB Buffer	1.8 ml	10 ml	44 ml
Etanol 96–100%	2.7 ml	15 ml	66 ml
Całkowita objętość	4.5 ml	25 ml	110 ml
BW1 Buffer	3.3 ml	17 ml	85 ml
Etanol 96–100%	3.3 ml	17 ml	82 ml
Całkowita objętość	6.6 ml	34 ml	164 ml
BW2 Buffer	1.4 ml	9 ml	33 ml
Etanol 96–100%	3.3 ml	21 ml	77 ml
Całkowita objętość	4.7 ml	30 ml	110 ml

Wszystkie bufony w zestawie należy przechowywać szczelnie zamknięte, aby uniknąć zmiany stężeń w wyniku parowania.

Data ważności

Data ważności zestawu podana jest na etykiecie produktu. Po otwarciu zestaw zachowuje stabilność przez okres 12 miesięcy.

III. SPECYFIKACJA PRODUKTU

MATERIAŁ WYJŚCIOWY

krew świeża lub mrożona (do 1 ml) , osocze, surowica, kożuszki leukocytarne, limfocyty, płyny ustrojowe (do 200 µl)

WYDAJNOŚĆ IZOLACJI

3–10 µg DNA z 200 µl ludzkiej krwi

POJEMNOŚĆ ZŁOŻA

ok. 27 µg DNA

CZAS IZOLACJI

ok. 25 minut (włączając czas inkubacji)

CZYSTOŚĆ DNA

$A_{260}/A_{280} = 1,7-1,9$

IV. PRZYGOTOWANIE PRÓBKII

W przypadku krwi świeżej, przed przystąpieniem do izolacji próbkę należy zmieszać z odpowiednią ilością antykoagulantu (EDTA, cytrynian). Jeśli do próbki był już uprzednio dodany antykoagulant, ten etap należy pominąć.

Próbkę krwi można przechowywać w obecności antykoagulantów (EDTA, cytrynian) w temp. +4°C (do 24 h) lub w postaci zamrożonej (preferowana temp. -80°C). Należy unikać częstego rozmrażania i zamrażania próbek przed izolacją DNA. Przed pobraniem odpowiedniej objętości krwi do izolacji należy dokładnie wymieszać krew przez odwracanie probówki, z której materiał ma zostać pobrany. W przypadku krwi mrożonej należy odczekać kilka minut do całkowitego rozmrożenia próbki.

W niektórych przypadkach możliwe jest **powstanie trwałego skrzepu** czerwonych komórek krwi. Skrzep należy dokładnie rozbić poprzez intensywne worteksowanie lub/i pipetowanie krwi zmieszanej z buforem RBC Lysis Buffer. Następnie należy prowadzić izolację zgodnie z protokołem, a przed naniesieniem lizatu na złożę minikolumny (pkt. 11 Protokołu izolacji) dodać dodatkowy etap wirowania 60 s przy 11 000–21 000 x g, a na złożę nanieść supernatant z nad powstałego osadu.

Podczas izolacji z kożuszków leukocytarnych lub limfocytów nie należy stosować więcej niż 5×10^6 komórek.

Gdy objętość próbki krwi jest mniejsza niż 200 µl, należy dodać Elution Buffer lub roztworu PBS (brak w zestawie) do całkowitej objętości 200 µl, a następnie przejść do kroku 1 Protokołu izolacji (dla próbek krwi lub kożuszków leukocytarnych) lub kroku 5 (dla osocza, surowicy, limfocytów i płynek ustrojowych).

V. PRZED PRYZYSTĄPIENIEM DO IZOLACJI

1. Każdy z odczynników zestawu należy wymieszać.
2. Należy pamiętać o rozpuszczeniu liofilizatu **Proteinase K** w odpowiedniej ilości buforu do proteinyzy.
3. W przypadku wytrącenia osadu w buforach, butelkę z roztworem należy ogrzać do temp. **37°C (BB, BW1, BW2 Buffer)** lub **50–60°C** (pozostałe bufory) i inkubować, aż do całkowitego rozpuszczenia osadu, mieszając co kilka minut, a następnie schłodzić do temp. pokojowej.
4. Nagrząć termoblok lub łaźnię wodną do temp. **55°C**.
5. Należy pamiętać, aby wszystkie etapy izolacji przeprowadzać w temp. pokojowej, jeśli nie zalecono inaczej.

VI. PROTOKÓŁ IZOLACJI

Izolując DNA z krwi z lub kożuszków leukocytnych należy rozpocząć procedurę izolacji od kroku 1. Przy izolowaniu z osocza, surowicy, limfoców lub płynów ustrojowych należy rozpocząć procedurę izolacji od kroku 5.

1. Pobrać **200–1000 µl krwi** i przenieść do probówki typu Eppendorf (1.5–2 ml), a następnie dodać **1 objętość buforu** do lizy erytrocytów **RBC Lysis Buffer** (np. pobierając 200 µl krwi do izolacji należy dodać 200 µl buforu RBC Lysis Buffer).
 - ▲ Gdy objętość próbki jest mniejsza niż 200 µl, uzupełnić roztworem PBS lub Elution Buffer do 200 µl, a następnie dodać 200 µl RBC Lysis Buffer.
2. Dokładnie wymieszać przez odwracanie probówki, aż powstanie klarowny czerwony roztwór.
3. Wirować 4 min przy 8600 x g.
 - ▲ Nie zaleca się zwiększania prędkości wirowania, gdyż może to utrudnić późniejsze zawieszanie powstałego osadu białych krwinek w buforze lizującym.
4. Ostrożnie usunąć pipetą supernatant z nad osadu białych krwinek.
5. Dodać **375 µl BL Buffer**.
 - ▲ W przypadku izolacji z krwi lub kożuszków leukocytnych należy dokładnie zawiesić osad komórek poprzez pipetowanie.
 - ▲ W przypadku izolacji z surowicy osocza, limfocytów lub płynów ustrojowych zawiesić osad komórek poprzez kilkukrotne odwrócenie probówki.
6. Dodać **6 µl Proteinase K** i wymieszać przez worteksowanie.
7. Inkubować 10 min w temp. **55°C**.
 - ▲ Jeśli osad białych krwinek nie został całkowicie zawieszony w buforze lizującym, należy przedłużyć czas inkubacji do momentu całkowitej lizy komórek, intensywnie worteksując co 60–120 s.
8. Dodać **400 µl buforu wiążącego BB Buffer** i dokładnie wymieszać.

9. Próbkę intensywnie wortexować przez 15–20 s.
10. Całość **lizatu** przenieść do minikolumny ze złożem, umieszczonej w probówce odbierającej i wirować 60 s przy 11 000–15 000 x g.
11. Przenieść minikolumnę do nowej probówki odbierającej (2 ml).
12. Dodać do minikolumny **600 µl** buforu płuczącego **BW1 Buffer** i wirować 30 s przy 11 000–15 000 x g.
13. Wylać przesącz z probówki odbierającej i umieścić w niej z powrotem minikolumnę.
14. Dodać do minikolumny **400 µl BW2 Buffer** i wirować 30 s przy 11 000–15 000 x g.
15. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i umieścić ponownie minikolumnę w probówce odbierającej.
16. Wirować 60–120 s przy 15 000–21 000 x g.
 - ▲ Bufor płuczący zawiera alkohol, który może powodować inhibicję niektórych reakcji enzymatycznych, a także obniżenie wydajności elucji, dlatego istotne jest jego całkowite usunięcie przed etapem elucji.
17. Ostrożnie wyjąć suchą minikolumnę z probówki odbierającej i umieścić ją w jałowej probówce 1.5 ml typu Eppendorf.
18. Nanieść **50-100 µl Elution Buffer** centralnie na złożo w minikolumnie.
 - ▲ Możliwa jest zmiana objętości buforu elucyjnego w zakresie 20–200 µl.
19. Inkubować minikolumnę z buforem przez 120 s w temperaturze pokojowej.
20. Wirować 60 s przy 11 000–15 000 x g.
21. Minikolumnę usunąć, a wyizolowane DNA przechowywać w temp. **+4°C** lub **-20°C** w zależności od dalszych analiz.

VII. BEZPIECZEŃSTWO I POSTĘPOWANIE Z PRODUKTEM

RBC Lysis Buffer



Uwaga

H319, H412
P264, P273, P305+P351+P338

Proteinase K (lyophilized)



Niebezpieczeństwo

H315, H319, H334, H335
P261, P271, P304+P340, P342+P311

BL Buffer



Uwaga

H319
P264, P305+P351+P338

BB Buffer



Niebezpieczeństwo

H318, H302, H332, H315, H412
P280, P261, P305+P351+P338, P301+P312 P330,
P304+340 P312

BW1 Buffer



Niebezpieczeństwo

H318, H315, H412
P280, P305+P351+P338 P310

H302 Działa szkodliwie po połknięciu. **H315** Działa drażniąco na skórę. **H318** Powoduje poważne uszkodzenie oczu. **H319** Działa drażniąco na oczy. **H332** Działa szkodliwie w następstwie wdychania. **H334** Może powodować objawy alergii lub astmy lub trudności w oddychaniu w następstwie wdychania. **H335** Może powodować podrażnienie dróg oddechowych. **H412** Działa szkodliwie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki.

P261 Unikać wdychania pyłu/dymu/gazu/mgły/par/rozpylonej cieczy. **P264** Dokładnie umyć ręce po użyciu. **P271** Stosować wyłącznie na zewnątrz lub w dobrze wentylowanym pomieszczeniu. **P273** Nie wypuszczać do środowiska. **P280** Stosować rękawice ochronne/ odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy. **P305+P351+P338** W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać. **P342+P311** W przypadku wystąpienia objawów ze strony układu oddechowego: Skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUC lub z lekarzem. **P304+P340** W przypadku dostania się do dróg oddechowych: Wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić warunki do odpoczynku w pozycji umożliwiającej swobodne oddychanie. **P312** W przypadku złego samopoczucia skontaktować się z ośrodkiem zatruc lub lekarzem. **P301+P312 P330** W przypadku połknięcia: W przypadku złego samopoczucia skontaktować się z ośrodkiem zatruc lub lekarzem. Wypłukać usta. **P310** Natychmiast skontaktować się z ośrodkiem zatruc lub lekarzem.

