



EliGene® Gel DNA MiniPrep

Návod k použití

Balení:

Kat. č.	Velikost balení
417050	50 Izolací

Skladování:

Všechny reagenty 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	2
Podrobný izolační protokol	3
Stručný izolační protokol	5
Řešení problémů	6



Úvod

EliGene® Gel DNA MiniPrep je navržen pro izolaci fragmentů DNA (80 bp až 10 kbp) ze standardního nebo nízkotajícího se agaróзовého gelu. V závislosti na velikosti fragmentů DNA je dosaženo až 90% výtěžku, když je DNA eluována v objemu 30 až 50 µl. EliGene® Gel DNA MiniPrep používá kremičité spinové kolonky pro zajištění vysoké koncentrace a kvality DNA izolované z agarózových gelů. DNA izolovaná pomocí EliGene® Gel DNA MiniPrep je okamžitě připravena k použití. Celý postup může být dokončen za méně než 20 minut, v závislosti na počtu zpracovaných vzorků. Všechna činidla jsou připravena k použití a EliGene® Gel DNA MiniPrep obsahuje všelik spotřební materiál. Poskytované pufrы byly optimalizovány a nevyžadují monitorování pH.

Požadavky na vybavení

Mikrocentrifuga (12,000 x g)

Vortex

Termostat/Termoshaker

Pipety: 20 – 750 µl

Obsah kitu

Komponenty	Množství (50 izolací)
Gel Solubilization Buffer G1	62,5 ml
Binding Buffer G2	12,5 ml
Wash Buffer G3	37,5 ml
Elution Buffer G4	3 ml
1,5 ml Tubes	100 ks
Spin Filters (Units in 2 ml Collection Tubes)	50 ks

Preventivní opatření

Při používání produktu prosím používejte ochranné rukavice a vyhněte se kontaktu reagentů s kůží. V případě kontaktu reagentů 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 G2 a Wash Buffer G3 jsou hořlavé.



Podrobný izolační protokol

Důrazně doporučujeme prostudovat si následující informace před prvním použitím EliGene® Gel DNA MiniPrep kitu.

Důležitá upozornění před použitím

- Prosím noste rukavice po celý čas práce s kitem.
- Pokud je v Gel Solubilization Buffer G1 precipitát, zahřejte lahvičku s pufrem na 60 °C a rozpustíte ho.
- Pro efektivní eluci DNA ze spin filtru do Elution Buffer G4 je klíčové odstranění zbytkového etanolu ze spin filtru.

1. Vyřízněte fragment DNA z agarózového gelu čistým ostrým skalpelem.

Poznámka: Minimalizujte velikost gelu, odeberte ze vzorku nadměrnou agarózu.

2. Odvažte plátek gelu ve 1,5 ml bezbarvé zkumavky (součást balení) a přidejte 3 objemy Gel Solubilization Buffer G1 k 1 objemu gelu (například přidejte 300 µl pufru G1 na každých 100 mg gelu).

Poznámka: V případě $\geq 2\%$ agarózových gelů přidejte 6 objemů Gel Solubilization Buffer G1. Nepoužívejte více než 400 mg gelového řezu. Celkový objem Gel Solubilization Buffer G1 je optimalizován pro 250 mg gelové řezu, v případě větších gelových řezů a/nebo $\geq 2\%$ agarózových gelů bude počet izolací snížen.

3. Inkubujte při 55 °C po dobu 10 minut nebo déle, dokud se gelové řezu úplně nerozpustí. Smíchejte vortexováním každé 3 minuty, abyste pomohli rozpustit řez gelu.
4. Do vzorku přidejte 1 objem Binding Buffer G2 a promíchejte.

Poznámka: Například, pokud má agarózový řez hmotnost 100 mg, přidejte 100 µl Binding Buffer G2. V tomto kroku vzorek necentrifugujte.

5. Vložte vzorek do spin filtru a centrifugujte při 10 000 x g po dobu 1 minuty při pokojové teplotě.

Poznámka: Maximální objem pro plnění je 800 µl. V případě větších objemů jednoduše znovu naneste a stočte.

6. Vyjměte spin filtr a odstraňte roztok. Poté umístěte spin filtr zpět do stejné 2 ml Collection Tube.

7. Přidejte 500 µl Gel Solubilization Buffer G1 do spin filtru. Centrifugujte 1 minutu při 10 000x g.



Poznámka: Tento krok odstraní všechny stopy agarózy. Tento krok je nutný, pokud bude DNA použita pro přímé sekvenování, transkripci in vitro nebo mikroinjektování.

8. Vyjměte spin filtr a odstraňte proteklý roztok. Poté umístěte spin filtr zpět do stejné 2 ml Collection Tube.

9. Přidejte 750 µl Wash Buffer G3 do spin filtru. Centrifugujte 1 minutu při 10 000 x g.

Poznámka Wash Buffer G3 je promývací roztok na bázi etanolu, který pročistí DNA navázanou na spin filtru od zbylých nečistot. Pokud bude DNA použita pro aplikace citlivé na sůl, nechte kolonku stát 3-5 minut po přidání Wash Buffer G3 před centrifugací.

10. Vyjměte spin filtr a odstraňte roztok. Poté umístěte spin filtr zpět do stejné 2 ml Collection Tube.

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

Poznámka: Spin filtr by měl být úplně vysušen od etanolvých zbytků, aby se dosáhlo maximálního uvolnění DNA z membrány spin filtru v elučním kroku. Zbytkový etanol z Wash Buffer G3 může inhibovat následné enzymatické reakce.

12. Opatrně vyjměte spin filtr a přemístěte ho do nové 1,5 ml zkumavky (součást balení).

13. Přidejte 50 µl Elution Buffer G4 přímo na membránu spin filtru.

Poznámka: Pro zvýšení koncentrace DNA přidejte 30 µl Elution Buffer G4.

14. Inkubujte 2 minuty při pokojové teplotě. Centrifugujte 1 minutu při 10 000 x g.

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

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



Stručný izolační protokol

1. Vyřízněte fragment DNA z agarózového gelu čistým ostrým skalpelem.
2. Odvažte plátek gelu do 1,5 ml bezbarvé zkumavky (součást dodávky) a přidejte 3 objemy Gel Solubilization Buffer G1 k 1 objemu gelu.
3. Inkubujte při 55 °C po dobu 10 minut nebo déle, dokud se gelové řezy úplně nerozpustí. Smíchejte vortexováním každé 3 minuty.
4. Do vzorku přidejte 1 objem Binding Buffer G2 a promíchejte.
5. Vložte vzorek do spin filtru a centrifugujte při 10 000 x g po dobu 1 minuty při pokojové teplotě.
6. Vyjměte spin filtr a odstraňte roztok. Poté umístěte spin filtr zpět do stejné 2 ml Collection Tube.
7. Přidejte 500 µl Gel Solubilization Buffer G1 do spin filtru. Centrifugujte 1 minutu při 10 000x g.
8. Vyjměte spin filtr a odstraňte proteklý roztok. Poté umístěte spin filtr zpět do stejné 2 ml Collection Tube.
9. Přidejte 750 µl Wash Buffer G3 do spin filtru. Centrifugujte 1 minutu při 10 000 x g.
10. Vyjměte spin filtr a odstraňte roztok. Poté umístěte spin filtr zpět do stejné 2 ml Collection Tube.
11. Centrifugujte 2 minuty při 12 000 x g pro úplné vyschnutí membrány spin filtru.
12. Opatrně vyjměte spin filtr a přemístěte ho do nové 1,5 ml zkumavky (součást balení).
13. Přidejte 50 µl of Elution Buffer G4 přímo na membránu spin filtru. Inkubujte 2 minuty při pokojové teplotě.
14. Inkubujte 2 minuty při pokojové teplotě. Centrifugujte 1 minutu při 10 000 x g.
15. Vyjměte spin filtr. Izolovaná DNA ve zkumavce je nyní připravena k použití pro další aplikace.





Řešení problémů

Nízký nebo žádný výtěžek

- Po přidání Gel Solubilization Buffer G1 k gelovému řezu, zkumavku promíchejte každé 2-3 minuty během inkubace při 55 °C. DNA zůstane v jakékoli nerozpuštěné agaróze.
- 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.
- Nezapomeňte vzorek po přidání Gel Solubilization Buffer G1 a Binding Buffer G2 dobře promíchat.
- Nepřeskakujte krok odstranění zbytkového etanolu ze spin filtru. Je to klíčový krok pro efektivní eluci DNA ze spin filtru do Elution Buffer G4.
- Přibližně 80 až 90% DNA lze získat z gelového řezu ≤ 400 mg.

Problémy s DNA v downstreamových aplikacích

- Vysoká koncentrace soli v eluátu. Upravte promývací krok inkubací kolony po dobu 5 minut při pokojové teplotě po přidání 750 ul Wash Buffer G3.
- Eluát obsahuje zbytkový etanol. Zbytky Wash Buffer G3 zůstávají v izolátu vzorky. Nevynechávejte krok s odstraňováním zbytkového etanolu ze spin filtru.
- Eluát kontaminovaný agarózou. Gelový řez je neúplně rozpuštěný nebo váží > 400 mg, opakujte postup.

DNA vyplavala z jamek při nanášení na gel

- Ve vzorku zůstaly zbytky Wash Buffer G3. Nepřeskakujte krok odstranění zbytkového etanolu ze spin filtru. Zároveň můžete prodloužit dobu vysoušení centrifugací na 3 minuty nebo můžete použít náš nanášecí pufr (pro více informací kontaktujte naše obchodní oddělení).



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