



EliGene[®] Plant DNA Isolation Kit

Návod k použití

Balení:

Kat. č.	Velikost balení
414050P	50 Izolací
(Obsahuje Homogenization Pestles)	
414050	50 Izolací
(Neobsahuje Homogenization Pestles)	

Skladování:

Všechny reagentie 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
Detailní izolační protokol	3
Stručný izolační protokol	6
Řešení problémů	7



Úvod

EliGene® Plant DNA Isolation Kit je nejlepší volbou pro rychlou a jednoduchou izolaci DNA z rostlinných buněk. Využívá speciální homogenizační tloučky společně s efektivní technologií odstranění inhibitorů, což zaručuje vysoké výtěžky DNA izolované z různých vzorků, včetně listů *Arabidopsis*, tabáku, rajčete, broskve nebo višně. Mechanická homogenizace vzorku zabere jen pár minut na začátku izolace. Izolovaná DNA má vysokou čistotu a je následně připravena k použití v PCR, qPCR, Sangerově sekvenování nebo NGS aplikacích.

Vzorky jsou homogenizovány ve zkumavce tloučkem, pískem a pomocí chemických metod. Detergenty lyzují buňky a denaturují proteiny. V přítomnosti chaotropního detergentu je DNA vázána na spin filtr, promyta a eluována v Tris-HCl pufru bez EDTA.

Požadavky na vybavení

Mikrocentrifuga (12,000 x g)
Vortex
Termostat/Termoshaker
Stojánek pro mikrocentrifugační zkumavky
Pipety: 50 – 750 µl
Chladicí stojánek/led

Obsah kitu

Komponenty	Množství (50 izolací)
Homogenization Sand	13 gramů
Homogenization Pestles	50 ks
Homogenization Buffer P1	24 ml
Lysis Buffer P2	3 ml
Inhibitor Removal Buffer P3	10 ml
Binding Buffer P4	27 ml
Binding Buffer P5	27 ml
Wash Buffer P6	27 ml
Wash Buffer P7	27 ml
Elution Buffer P8	6 ml
1.5 ml Tubes	100 ks
Spin Filters (Units in 2 ml Collection Tubes)	50 ks
2 ml Tubes	50 ks
2 ml Collection Tubes	100 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 Safety Data Sheets. Reagencie označené jako hořlavé uchovávejte v bezpečné vzdálenosti od otevřeného ohně a jisker.

UPOZORNĚNÍ: Binding Buffer P5, Wash Buffer P6 a Wash Buffer P7 jsou hořlavé.

Recyklování Homogenization Pestles (plastových tloučků)

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

Detailní izolační protokol

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

Důležitá upozornění před použitím

Prosím noste rukavice po celý čas práce s kitem.

Pokud je v Lysis Buffer P2 precipitát, zahřejte láhev s bufferem na 60 °C a rozpustíte ho.

Pro efektivní eluci DNA ze spin filtru do Elution Buffer P8 je klíčové odstranění zbytkového etanolu ze spin filtru.

1. Do 1.5 ml zkumavky (součástí balení) přidejte 0,2 g Homogenization Sand a 0,05 g vzorku listu. Použijte Homogenization Pestle (tlouček) k rozmělnění vzorku, přidejte 450 µl Homogenization Buffer P1 a krátce zvertexujte.

Poznámka: Homogenizing Buffer P1 obsahuje roztok zabraňující degradaci nukleových kyselin a pomáhá odstranit proteiny a fenolické látky.

2. Přidejte 50 µl Lysis Buffer P2 a směs krátce zvertexujte. Inkubujte 10 minut při 70 °C s občasným promícháním.

Poznámka: Lysis Buffer P2 obsahující SDS a další složky potřebné pro kompletní lýzu buňky. Při nízké teplotě tvoří SDS bílý precipitát v lahvi. Zahřátím na 60 °C se SDS rozpustí. Lysis Buffer P2 může být použitý i když je zahřátý.

3. Centrifugujte lyzační zkumavku 3 minuty při 10 000 x g a pokojové teplotě.



- UPOZORNĚNÍ:** Nepřekračujte 10 000 x g, zkumavky by se mohly rozbít.
4. Přeneste supernatant (přibližně 450 µl) do čisté 1.5 ml Tube (součástí balení), přidejte 175 µl Inhibitor Removal Buffer P3 a vortexujte 5 vteřin. Inkubujte 4-5 minut na ledu nebo v chladícím stojánku při -4 °C.
Poznámka: Inhibitor Removal Buffer P3 obsahuje činidlo na vysrážení organických non-DNA a anorganických složek jakými jsou proteiny, fenolické látky a polysacharidy.
 5. Centrifugujte zkumavku 3 minuty při 10 000 x g a pokojové teplotě.
 6. Přeneste až do 500 µl supernatantu do čisté 2 ml Tube (součástí balení). Pracujte opatrně, aby nedošlo k narušení peletu.
Poznámka: Pelet obsahuje organické non-DNA a anorganické složky. Pro docílení co nejlepších izolačních výsledků se vyhněte porušení peletu.
 7. Přidejte 500 µl Binding Buffer P4 a vortexujte 5 vteřin. Krátce stočte, abyste odstranili roztok z víčka zkumavky.
Poznámka: Binding Buffer P4 obsahuje chaotropní soli, které poskytují optimální podmínky pro vazbu DNA, avšak ne pro organické non-DNA a anorganické složky.
 8. Přidejte 500 µl Binding Buffer P5 a vortexujte 5 vteřin. Krátce stočte, abyste odstranili roztok z víčka zkumavky.
Poznámka: Binding Buffer P5 obsahuje etanol, který poskytuje optimální podmínky pro vazbu DNA, avšak ne pro organické non-DNA a anorganické složky.
 9. Přemístěte maximálně 750 µl supernatantu do Spin filtru a při pokojové teplotě 1 minutu centrifugujte při 10 000 x g. Odstraňte odstředěný roztok ve 2 ml Tube a přidejte zbývajících 750 µl supernatantu do spin filtru. Znovu 1 minutu centrifugujte při 10 000 x g a pokojové teplotě.
Poznámka: DNA přilne díky chaotropním solím k silikátové membráně spin filtru. Tekutá složka procházející skrz membránu obsahuje nenavázaný buněčný materiál.
 10. Přemístěte spin filtr do nové 2 ml Collection Tube (součástí balení).
 11. Přidejte 500 µl Wash Buffer P6 do spin filtru. Centrifugujte 1 minutu při 10 000 x g.
Poznámka: Wash Buffer P6 je promývací roztok na bázi etanolu, který pročistí DNA navázanou na spin filtru od nečistot.
 12. Vyjměte spin filtr a odstraňte roztok z 2 ml Collection Tube. Poté umístěte spin filtr zpátky do stejné 2 ml Collection Tube.



13. Přidejte 500 µl Wash Buffer P7 do spin filtru. Centrifugujte 1 minutu při 10 000 x g.
Poznámka: Wash Buffer P7 je promývací roztok na bázi etanolu, který pročistí DNA navázanou na spin filtru od nečistot.

14. Vyjměte spin filtr a odstraňte roztok z 2 ml Collection Tube. Poté umístěte spin filtr zpátky do stejné 2 ml Collection Tube.

15. Pro vysušení membrány spin filtru znovu centrifugujte 2 minuty při 12 000 x g.
Poznámka: Membrána spin filtru je zcela vysušena od etanolvých zbytků, čímž se zvýší výtěžnost DNA v elučním kroku.

16. Opatrně vyjměte spin filtr a přemístěte ho do nové 2 ml Collection Tube (součástí balení).

17. Přidejte 100 µl Elution Buffer P8.
Poznámka: Pro zvýšení výtěžnosti inkubujte 5 minut při 65 °C.

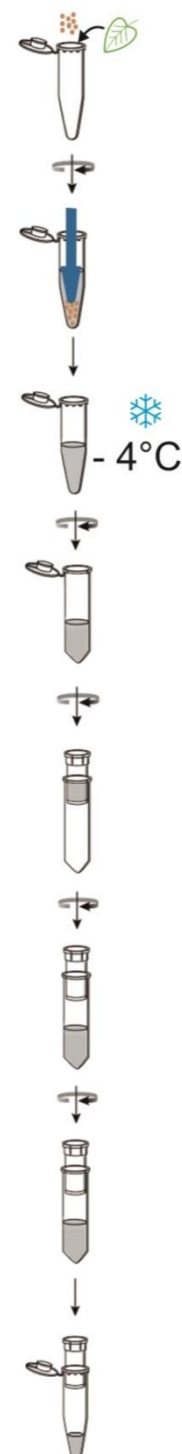
18. Centrifugujte 1 minutu při 10 000 x g.

19. Vyjměte spin filtr. Izolovaná DNA ve zkumavce je nyní připravena k použití pro další aplikace.
Poznámka: Elution Buffer P8 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. Přidejte 0,2 g Homogenization Sand a 0,05 g vzorku listu do 1.5 ml Tube (součástí balení). Pomocí Homogenization Pestle (tloučku) rozmělněte list a přidejte 450 μ l Homogenization Buffer P1 a promíchejte.
2. Přidejte 50 μ l Lysis Buffer P2, vortexováním lehce promíchejte a inkubujte 10 minut při 70 °C za občasného promíchání.
3. Centrifugujte 1.5 ml Tube 3 minut při 10 000 x g a pokojové teplotě.
4. Přemístěte supernatant do čisté 1.5 ml Tube (součástí balení), přidejte 175 μ l Inhibitor Removal Buffer P3 a vortexujte 5 vteřin. Poté 4 - 5 minut inkubujte na ledě.
5. Centrifugujte 3 minuty při 10 000 x g a pokojové teplotě.
6. Přemístěte až do 500 μ l supernatantu do čisté 2 ml Tube (součástí balení).
7. Přidejte 500 μ l Binding Buffer P4 a vortexujte 5 sekund. Krátce centrifugujte.
8. Přidejte 500 μ l Binding Buffer P5 a vortexujte 5 sekund. Krátce centrifugujte.
9. Přemístěte 750 μ l supernatantu do Spin filtru a 1 minutu centrifugujte při 10 000 x g a pokojové teplotě. Odstraňte odstředěný roztok a přidejte zbylý supernatant (po 750 μ l) do spin filtru. Znovu 1 minutu centrifugujte při 10 000 x g a pokojové teplotě.
10. Přemístěte spin filter do nové 2 ml Collection Tube (součástí balení).
11. Přidejte 500 μ l Wash Buffer P6. Centrifugujte 1 minutu při 10 000 x g.
12. Vyjměte spin filtr a odstraňte roztok z 2 ml Collection Tube. Poté umístěte spin filtr zpátky do stejné 2 ml Collection Tube.
13. Přidejte 500 μ l Wash Buffer P7. Centrifugujte 1 minutu při 10 000 x g.
14. Vyjměte spin filtr a odstraňte roztok z 2 ml Collection Tube. Poté umístěte spin filtr zpátky do stejné 2 ml Collection Tube.
15. Centrifugujte opět 2 minuty při 12,000 x g, aby došlo ke kompletnímu vysušení membrány spin filtru.
16. Opatrně vyjměte spin filtr a přemístěte ho do nové 2 ml Collection Tube (součástí balení).
17. Přidejte 100 μ l Elution Buffer P8 a 1 minutu centrifugujte při 10 000 x g.
18. Vyjměte spin filtr. Genomická DNA je připravena k použití pro další aplikace.





Řešení problémů

Vysušený vzorek listu

- V případě, že má vzorek velmi nízký obsah vody, začněte rozmělnění listu se 100 µl Homogenization Buffer P1.
- Vzorek řádně rozmělněte a přidejte 400 µl Homogenization Buffer P1.

Problémy s amplifikací DNA

- Zkontrolujte množství a čistotu DNA gelovou elektroforézou nebo spektrofotometrem. Příliš vysoké množství DNA může inhibovat PCR reakci.
- Rozředte templátovou DNA.

Eluovaný vzorek DNA je zeleně/hnědě zbarvený nebo dochází k ucpávání silikonového spin filtru

- Pokud dodržíte doporučení uvedená v tomto manuálu, žádné zbarvení DNA by se nemělo objevovat.
- Nepoužívejte více než 0,05 g listu.

Nízká výtěžnost DNA

Výtěžnost DNA může být nižší, pokud má vzorek listu vysoký obsah vody, byl skladován dlouhou dobu nebo opakovaně zmrazován a rozmrazován. Pokud máte problémy s nízkou výtěžností, zkontrolujte následující body:

- Přesvědčte se, že jste po přidání Lysis Buffer P2 směs dostatečně zvortexovali.
- Důležité je správné nastavení teploty pro lýzu.
- Nepřeskakujte krok odstranění zbytkového etanolu ze spin filtru. Je to klíčový krok pro efektivní eluci DNA z filtrovací mřížky do Elution Buffer P8.

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 použili Wash Buffer P6 a Wash Buffer P7.
- Používáte-li Nanodrop, používejte jako blank Elution Buffer P8.



DNA vyplavala z jamek při nanášení na gel

- Ve vzorku zůstaly zbytky Wash Buffer P7. Nepřeskakujte krok odstranění zbytkového etanolu ze spin filtru. Zároveň můžete prodloužit dobu vysoušení centrifugací na 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. Zbýlý 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