

---

# Zestaw do izolacji DNA z żeli agarozowych



## I. PRZEZNACZENIE ZESTAWU

Zestaw **EXTRACTME DNA GEL-OUT KIT** przeznaczony jest do szybkiej i wydajnej izolacji fragmentów DNA bezpośrednio z żeli agarozowych (ze standardowej lub niskotopliwej agarozy w buforze TAE lub TBE). Podczas procesu ekstrakcji usunięte zostają agarosa, bromek etydyny oraz inne zanieczyszczenia obecne w próbce. Zestaw umożliwia oczyszczanie fragmentów DNA o wielkościach od 50 pz do 30 kpz, a także genomowego i plazmidowego DNA. Izolacja cząsteczek DNA mniejszych od 100 pz oraz większych od 10 kpz zachodzi jednak z obniżoną wydajnością. Protokół izolacji i składy buforów zostały zoptymalizowane w celu osiągnięcia zarówno wysokiego odzysku, 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	<sup>1</sup> Warunki przechowywania
Nr katalogowy	EM08-010	EM08-050	EM08-250	
<b>GB Buffer</b> (Binding Buffer)	5 ml	25 ml	125 ml	TP
<b>GW Buffer</b> (conc.) <sup>*</sup> (Wash Buffer)	3 ml	15 ml	75 ml	TP
<b>Elution Buffer</b>	2 ml	10 ml	5 x 10 ml	TP
<b>DNA Purification Columns</b>	10 szt.	50 szt.	5 x 50 szt.	TP
<b>Collection Tubes</b> (2 ml)	10 szt.	50 szt.	5 x 50 szt.	TP

<sup>1</sup> TP – temperatura pokojowa (+15°C do +25°C)

\* Przed pierwszym użyciem do **GW 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	150 IZOLACJI	250 IZOLACJI
Nr katalogowy	EM08-010	EM08-050	EM08-150	EM08-250
<b>GW Buffer</b>	3 ml	15 ml	45 ml	75 ml
<b>Etanol 96–100%</b>	12 ml	60 ml	180 ml	300 ml
Całkowita objętość	15 ml	75 ml	225 ml	375 ml

**▲ GB Buffer należy chronić przed dostępem światła.**

Wszystkie roztwory z zestawu należy przechowywać szczelnie zamknięte, aby uniknąć zmiany stężeń w wyniku parowania.

**Data ważności**

Data ważności zestawu przechowywanego w odpowiednich warunkach podana jest na etykietach produktu. Po otwarciu zestaw zachowuje stabilność przez okres 12 miesięcy.

### III. SPECYFIKACJA PRODUKTU

---

#### MATERIAŁ WYJŚCIOWY

Błoczek agarozowy o masie do 300 mg

#### ODZYSK

70–95% w zależności od wielkości fragmentu DNA  
(w zakresie 100–10.000 pz)

#### WIELKOŚĆ IZOLOWANYCH FRAGMENTÓW DNA

100–10.000 pz  
Możliwa jest również izolacja fragmentów DNA w zakresach 50–100 pz i 10–30 kpz, a także genomowego i plazmidowego DNA, lecz z obniżoną wydajnością.

#### POJEMNOŚĆ ZŁOŻA

ok. 25 µg DNA

#### CZAS IZOLACJI

16–20 minut

#### CZYSTOŚĆ DNA

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

---

## IV. PRZYGOTOWANIE PRÓBKKI

---

1. Prowadzić elektroforezę w żelu przygotowanym z agarozy niskotopliwej lub o standardowej temperaturze topnienia, w buforze TAE lub TBE, do momentu wystarczającego rozdzielania fragmentów DNA. Nie zaleca się stosować zbyt wysokiego napięcia podczas rozdziatu elektroforetycznego, gdyż może to spowodować wzrost temperatury buforu elektroforetycznego i doprowadzić do degradacji DNA. Należy używać świeżo przygotowanego buforu, zarówno do przeprowadzenia elektroforezy, jak i przygotowania żelu.
2. Zważyć jałową probówkę 1.5–2 ml typu Eppendorf.
3. Przy pomocy czystego i ostrego skalpela lub żyłki wyciąć prążek DNA w taki sposób, aby pozbyć się nadmiaru agarozy (całkowita masa wyciętego bloczka agarozy nie powinna przekraczać 300 mg). Skalpel oraz powierzchnia transiluminatora powinny być uprzednio oczyszczone np. przy pomocy 5% roztworu  $H_2O_2$ . Operację wycinania prążka DNA należy wykonać możliwie szybko, aby zminimalizować oddziaływanie promieniowania UV na izolowane DNA. Jest to szczególnie istotne, gdy wyizolowane DNA będzie bezpośrednio wykorzystywane w reakcjach sekwencjonowania i/lub klonowania.
4. Przenieść wycięty bloczek agarozowy do uprzednio zważonej, jałowej próbki 1.5–2 ml, a następnie zważyć. Jeśli masa bloczka agarozowego przekracza 300 mg należy podzielić bloczek na mniejsze fragmenty i przenieść do kolejnych probówek 1.5–2 ml.
5. Przed oczyszczaniem fragment agarozy zawierający DNA może być przechowywany w temp. +4°C lub -20°C nie dłużej niż tydzień, w szczelnie zamkniętej probówce, w warunkach wolnych od deoksyrybonukleaz (DNaz).

## V. PRZED PRZYSTĄPIENIEM DO IZOLACJI

---

1. Każdy z odczynników zestawu należy wymieszać.
2. Należy upewnić się czy do **GW Buffer** został dodany etanol. Jeśli nie, należy dodać odpowiednią ilość **96–100% etanolu** (ilości podane są na etykietach oraz w tabeli w sekcji II).
3. Nagrząć termoblok lub łaźnię wodną do temp. 50°C.
4. Należy pamiętać, aby wszystkie etapy izolacji przeprowadzać w temp. pokojowej, jeśli nie zalecono inaczej.
5. W przypadku wytrącenia osadu w buforach, butelkę z roztworem należy ogrzać do temp. **37°C (GW Buffer)** lub **50–60°C** (pozostałe bufory) i inkubować, aż do całkowitego rozpuszczenia osadu, mieszając co kilka minut, a następnie schłodzić do temp. pokojowej.

## VI. PROTOKÓŁ IZOLACJI

---

1. Wyciąć z żelu bloczek agarozowy zawierający DNA, a następnie umieścić w probówce 1.5–2 ml typu Eppendorf.
  - ▲ Masa bloczka agarozowego nie powinna przekraczać 300 mg. Więcej wskazówek znajduje się w sekcji IV. Przygotowanie próbki.
2. Dodać **500 µl GB Buffer** i wymieszać poprzez kilkukrotne odwracanie próbówki.
3. Inkubować mieszaninę w temp. **50°C** przez **5–10 min** lub do momentu całkowitego rozpuszczenia agarozy. Podczas inkubacji kilka razy mieszać próbkę poprzez kilkukrotne odwracanie próbówki.
  - ▲ Przed przystąpieniem do dalszych czynności należy upewnić się, że agarozą została całkowicie rozpuszczona.
  - ▲ Kolor mieszaniny powinien być żółty. Jeżeli po rozpuszczeniu agarozy roztwór zmienił barwę na różową, należy dodać 10 µl 3 M roztworu octanu sodu o pH 5.2 i wymieszać.
4. Krótko odwirować próbkę w celu odzyskania resztek roztworu z wieczka próbówki, a następnie przenieść maksymalnie **800 µl mieszaniny** na złożę minikolumny umieszczonej w probówce odbierającej i wirować **60 s** przy 11 000–15 000 x g.
  - ▲ Jeżeli mieszanina ma większą objętość niż 800 µl, po odwirowaniu wyłączyć przesącz z próbówki odbierającej, umieścić w niej z powrotem minikolumnę i nanieść pozostałą część mieszaniny na złożę.
5. Przenieść minikolumnę do nowej próbówki odbierającej (2 ml).
6. Dodać do minikolumny **700 µl GW Buffer** i wirować **30 s** przy 11 000–15 000 x g.

7. Wylać przesącz z probówki odbierającej i umieścić w niej z powrotem minikolumnę.
8. Powtórzyć etapy 6–7.
9. Wirować **60–120 s** przy 15 000–21 000 x g.
  - ▲ GW Buffer zawiera alkohol, który może powodować inhibicję niektórych reakcji enzymatycznych, a także obniżenie wydajności elucji, dlatego istotne jest jego całkowite usunięcie przed etapem elucji.
10. Ostrożnie wyjąć suchą minikolumnę z probówki odbierającej i umieścić ją w jałowej probówce 1,5 ml typu Eppendorf.
11. Nanieść **50 µl Elution Buffer** centralnie na złożę w minikolumnie.
  - ▲ Możliwa jest zmiana objętości buforu elucyjnego w zakresie 20–200 µl.
12. Inkubować minikolumnę z buforem elucyjnym przez **120 s** w temperaturze pokojowej.
13. Wirować **60 s** przy 11 000–15 000 x g.
14. Minikolumnę usunąć, a wyizolowane DNA przechowywać w temp. **+4°C** lub **-20°C** do czasu dalszych analiz.

## VII. BEZPIECZEŃSTWO I POSTĘPOWANIE Z PRODUKTEM

---

### GB Buffer



#### Uwaga

H302, H312, H332, H412

P273, P301+P312 P330, P304+P340 P312, EUH032

---

**EUH032** W kontakcie z kwasami uwalnia bardzo toksyczne gazy. **H302** Działa szkodliwie po połknięciu. **H312** Działa szkodliwie w kontakcie ze skórą. **H332** Działa szkodliwie w następstwie wdychania. **H412** Działa szkodliwie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki. **P273** Unikać uwalniania do środowiska. **P301+P312 P330** W przypadku połknięcia: W przypadku złego samopoczucia skontaktować się z ośrodkiem zatruc lub lekarzem. Wypluć usta. **P304+P340 P312** W przypadku dostania się do dróg oddechowych. Wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić warunki do odpoczynku w pozycji umożliwiającej swobodne oddychanie. W przypadku złego samopoczucia skontaktować się z ośrodkiem zatruc lub lekarzem.