



MAGBIO

"ZLEPŠUJEME NGS"

HighPrep HMW DNA Kit

Izolace
vysokomolekulární
DNA

Katalogová čísla HPHMW-D5, HPHMW-D96, HPHMW-D96x4
Příručka Revize 1
WI-72-127

- Izolace vysokomolekulární DNA z plné krve, kostní dřeně, slin, bukalních buněk, kultivovaných buněk, tkání a bakterií.
- Chemie založená na magnetických kuličkách

Protokol

Obsah

Popis produktu	1-2
Protokol: Extrakce HMW DNA z gramnegativních bakterií	3-5
Protokol: Extrakce HMW DNA z grampozitivních bakterií	6-8
Protokol: Extrakce HMW DNA z bukalních buněk nebo kultivovaných buněk	9-11
Protokol: Extrakce HMW DNA ze slin, plné krve a kostní dřeně	12-14
Protokol: Extrakce HMW DNA z tkáně	15-17
Průvodce řešením problémů	18
Objednávání a související informace o produktu	19

Pouze pro výzkumné účely

Informace v tomto dokumentu se mohou změnit bez předchozího upozornění.

MAGBIO GENOMICS, INC. SE ZŘÍKÁ VŠECH ZÁRUK TYKAJÍCÍCH SE TOHOTO DOKUMENTU, AŽ UŽ VÝSLOVNÝCH NEBO PŘEDPOKLÁDANÝCH, MIMO JINÉ VČETNĚ ZÁRUK PRODEJNOSTI NEBO VHODNOSTI PRO URČITÝ ÚČEL. V MAXIMÁLNÍM ROZSAHU POVOLENÉM ZÁKONEM NESMÍ SPOLEČNOST MAGBIO GENOMICS, INC. ODPOVĚDNÁ, AŽ UŽ NA ZÁKLADĚ SMLOUVY, DELIKTU, ZÁRUKY NEBO PODLE JAKÉHOKOLI ZÁKONA NEBO NA JAKÉMKOLI JINÉM ZÁKLADĚ, ZA ZVLÁŠTNÍ, NÁHODNÉ, NEPŘÍMÉ, SANKČNĚ NAHRAZOVANÉ, VÍCEÁNOSBNÉ NEBO NÁSLEDNÉ ŠKODY V SOUVISLOSTI S TÍMTO DOKUMENTEM NEBO V SOUVISLOSTI S NÍM, VČETNĚ, ALE NIKOLI VYLUČNĚ, JEHO POUŽÍVÁNÍ, AŽ UŽ JE PŘEDVÍDATELNÉ NEBO NE A AŽ UŽ SPOLEČNOST MAGBIO GENOMICS, INC. O MOŽNOSTI VZNIKU TAKOVÝCH ŠKOD INFORMOVÁNA.

TRADEMARKS

Ochranné známky zde uvedené jsou vlastnictvím společnosti MagBio Genomics, Inc. nebo jejich příslušných vlastníků.

Popis produktu

Sada HighPrep High Molecular Weight DNA Kit je speciálně navržena pro extrakci vysokomolekulární DNA (HMW DNA) v rozsahu velikostí 50-300+ kb. Souprava extrahuje HMW DNA z biologických vzorků, jako je plná krev, kostní dřeň, sliny, buňky, kultivované buňky, tkáň a bakterie. Souprava HighPrep High Molecular Weight DNA Kit využívá technologii založenou na magnetických kuličkách v kombinaci s chaotropními látkami k šetrné izolaci HMW DNA a odstranění inhibitorů. Takto purifikovaná HMW DNA je vhodná zejména pro analýzu na genomických platformách pro sekvenování s dlouhým čtením, včetně PacBio RSII/Sequel/Sequel II a Oxford Nanopore.

DNA přečištěná pomocí sady HighPrep High Molecular Weight DNA Kit je dobré kvality a čistoty. Souprava obsahuje RNázu A pro odstranění RNA. Přesná velikost extrahované DNA se liší v závislosti na matici vzorku, kvalitě výchozího materiálu a podmínkách zpracování.

Odchyly od doporučeného protokolu, zejména od pokynů pro míchání pipetou nebo víření, způsobí mechanické stříhání DNA a sníží průměrnou velikost fragmentů. Aby se maximalizovala velikost genomové DNA, protokoly pro tuto soupravu nezahrnují míchání vzorku pipetou nebo vířením během extrakčních postupů, s výjimkou kroku eluce.

Funkce

- Vynikající výtěžnost DNA a vysoká kvalita DNA z různých matic vzorků
- Zjednodušené, uživatelsky přívětivé protokoly, které odstraňují RNA a inhibitory
- Reprodukovatelná izolace DNA s vysokou molekulovou hmotností (50-300+ kb)
- Snadná automatizace a možnost snadného rozšíření
- Velký výkon při sekvenování nové generace, sekvenování třetí generace, genotypování, PCR, štěpení restrikcími enzymy a klonování.

Obsah sady a skladování

HighPrep HMW DNA Kit Katalogové číslo.	HPHMW-D5	HPHMW-D20	HPHMW-D96	HPHMW-D96x4	Úložiště
Počet příprav	5	20	96	384	
HAS Buffer	2 ml	7 ml	30 ml	120 ml	15-25°C
Pufr HTS	1,8 ml	6 ml	25 ml	100 ml	15-25°C
HMW1 ^{Pufr1}	3 ml	11 ml	50 ml	200 ml	15-25°C
HMW2 ^{Pufr1}	2 ml	6 ml	30 ml	120 ml	15-25°C
MB Eluční pufr	1,2 ml	5 ml	20 ml	80 ml	15-25°C
Roztok Pro K2	125 µl	420 µl	2 ml	8 ml	2-8°C
MAG-HM1 ^{Částice3}	55 µl	210 µl	1 ml	4 ml	2-8°C
RNáza ^{A4}	30 µl	110 µl	500 µl	2 ml	2-8°C

¹ Před použitím je třeba přidat etanol. Viz "Příprava činidel".

Přeprava a skladování

- ² Roztok Pro K se dodává v roztoku připraveném k použití. Dodává se při pokojové teplotě. Skladujte při teplotě 2-8 °C.
- ³ MAG-HM1 Částice se dodávají při pokojové teplotě. Skladujte při teplotě 2-8 °C.
- ⁴ RNáza A se dodává v roztoku připraveném k použití. Dodává se při pokojové teplotě. Skladujte při teplotě 2-8 °C.

Bezpečnostní informace

Při práci s chemikáliemi vždy noste vhodný laboratorní plášť, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Další informace naleznete v příslušných bezpečnostních listech (SDS). Bezpečnostní listy lze stáhnout ze záložky "Dokumenty k výrobku" při prohlížení tohoto výrobku na adrese www.magbiogenomics.com.

Příprava činidel

Před použitím si připravte následující součásti každé soupravy:

Katalogové číslo	Komponenta	Přidejte 100% etanol	Úložiště
HPHMW-D5	HMW1 pufr	3 ml	Pokožová teplota 15-25 °C
	HMW2 pufr	5 ml	

Katalogové číslo	Komponenta	Přidejte 100% etanol	Úložiště
HPHMW-D20	HMW1 pufr	11 ml	Pokožová teplota 15-25 °C
	HMW2 pufr	15 ml	

Katalogové číslo	Komponenta	Přidejte 100% etanol	Úložiště
HPHMW-D96	HMW1 pufr	50 ml	Pokožová teplota 15-25 °C
	HMW2 pufr	75 ml	

Katalogové číslo	Komponenta	Přidejte 100% etanol	Úložiště
HPHMW-D96x4	HMW1 pufr	200 ml	Pokožová teplota 15-25 °C
	HMW2 pufr	300 ml	

USA/Kanada: +1 301-302-0144 | Web: www.magbiogenomics.com | E-mail: info@magbiogenomics.com
Evropa: +49 7250 33 13 403 | Web: www.magbiogenomics.com | E-mail: info.europe@magbiogenomics.com

Protokol: Extrakce HMW DNA z gramnegativních bakterií

Vybavení a činidla, která musí dodat uživatel

Formát jedné zkumavky

- 1,5 ml mikrozkušavky s proteinem LoBind (snižuje kontaminaci proteiny a zvyšuje čistotu DNA)
- Magnetický stojanový separátor pro 1,5 ml mikrozkušavky (MagStrip Magnet Stand (Cat# MBMS-12))
- Širokopřůchodné pipetovací špičky (200 μ l a 1000 μ l pipetovací špičky s aerosolovou bariérou)
- Minirotátor zkumavek
- Mikrocentrifuga (s rotorem pro zkumavky o objemu 1,5 ml-2 ml)
- Minicentrifuga
- Vortexer
- Vodní lázeň, termomixér nebo tepelný blok s teplotou 55 °C
- 100% etanol
- 70% etanol
- 1X PBS

Co je třeba udělat před zahájením

- Ujistěte se, že HMW1 pufr a HMW2 pufr jsou připraveny podle části Příprava činidel na straně 2.
- Při manuální extrakci DNA nastavte vodní lázeň, termomixér nebo topné bloky na 55 °C.
- HMW1 pufr může během skladování vykazovat precipitáty. Pokud se precipitáty objeví, zahřejte lahvičku před použitím na 37 °C.
- Před použitím se ujistěte, že částice MAG-HM1 jsou znovu suspendovány vířením.


Tipy pro zpracování

- Vyvarujte se opakovaného rozmrazování vzorků a vzorky správně skladujte, aby nedošlo ke stříhu DNA. Používejte zkumavky s nízkou vazbou, abyste zabránili vazbě DNA na stěny zkumavky.
- Používejte pomalou a jemnou techniku pipetování, abyste během extrakce udrželi DNA neporušenou. Abyste zabránili stříhu DNA, používejte široké pipetovací špičky a vyhněte se víření.

Protokol

Požadavky na vstup do buňky: Požadavky: 1 ml kultury s hodnotou OD600 1 nebo blízkou 1. Přetížení bakteriálních buněk povede k neúčinné lýze a nízké čistotě DNA.


- U bakterií s hodnotami > 1 OD zvažte zvýšení extrakčních činidel nebo zředění vzorku.

 **Částice MAG-HM1** před použitím zahřejte na pokojovou teplotu po dobu nejméně 30 minut.

1. Bakteriální buňky sbírejte odstředováním kultury při 16 000 x g po dobu 1 minuty při 4 °C. Pelety lze zpracovat jako čerstvé pelety nebo zmrazit. K odstředění kultury použijte zkumavky Protein LoBind.
2. Supernatant z kultury zlikvidujte a přidejte 180 μ l 1X PBS. Pipetujte vzorek nahoru a dolů, abyste bakteriální pelety znovu suspendovali v PBS. Ujistěte se, že nejsou vidět žádné hrudky buněk a vzorek vypadá homogenně.

3. Ke vzorku přidejte 20 µl **roztoku Pro K** a 200 µl **pufru HAS**. Pulzujte vortexem 1 sekundu x 5krát (maximální nastavení). Inkubujte při teplotě 55 °C ve vodní lázni (potřebuje pravidelné míchání - během inkubace zkumavku alespoň 3-5krát otočte) nebo inkubujte v termomixéru po dobu 30 minut (900 ot./min.).
4. Uvedte vzorek na pokojovou teplotu a přidejte 5 uL **RNázy A**. Pulzujte vortexem 1 sekundu x 5krát (maximální nastavení). Vzorek inkubujte při pokojové teplotě po dobu 3 minut.
5. Inkubujte vzorek při 70 °C ve vodní lázni (je třeba jej pravidelně míchat) nebo v termomixéru (2000 ot./min.) po dobu 10 minut.
6. Ke vzorku přidejte 290 uL 100% etanolu a 10 uL **částic MAG-HM1**. Pulzujte vortexem po dobu 1 sekundy x 5krát (maximální nastavení).
 ⚠ *Před použitím částice MAG-HM1 dobře protřepejte, aby byly resuspendovány.*
7. Umístěte vzorek na minirotor a otáčejte jím při pokojové teplotě po dobu 10 minut. Je normální, že se během rotace vytvoří hrudky kuliček a DNA. Hrudky nerozbíjejte. Krátce roztočte zkumavku na minicentrifuze po dobu 2 sekund.
8. Umístěte vzorek na magnetické separační zařízení na 5 minut nebo dokud se kuličky z roztoku zcela nevyčistí. Supernatant zlikvidujte odpipetováním kapaliny. Ujistěte se, že jste z uzávěru zkumavky odstranili veškerou zbytkovou kapalinu.
 ⚠ *Při odsávání supernatantu nenarušujte přitahované kuličky.*
9. Vyjměte vzorek z magnetického separačního zařízení.
10. Přidejte 500 µl **HMW1 pufru** a vzorek umístěte na minirotor. Jemně otáčejte při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Krátce roztočte zkumavku na minicentrifuze po dobu 2 sekund.
11. Umístěte vzorek na magnetické separační zařízení na 5 minut nebo dokud se kuličky z roztoku zcela nevyčistí. Supernatant zlikvidujte pipetováním. Ujistěte se, že jste z uzávěru zkumavky odstranili veškerou zbytkovou kapalinu.
 ⚠ *Při odsávání supernatantu nenarušujte přitahované kuličky.*
12. Vyjměte vzorek z magnetického separačního zařízení.
13. Opakujte kroky 10-12 pro druhé promývání **pufrem HMW1**.
14. Přidejte 500 µl **HMW2 pufru** a vložte vzorek na minirotor. Jemně otáčejte při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Krátce roztočte zkumavku na minicentrifuze po dobu 2 sekund.
15. Umístěte vzorek na magnetické separační zařízení na 5 minut nebo dokud se kuličky z roztoku zcela nevyčistí. Supernatant zlikvidujte odpipetováním kapaliny. Ujistěte se, že jste z uzávěru zkumavky odstranili veškerou kapalinu.
 ⚠ *Při odsávání supernatantu nenarušujte přitahované kuličky.*
16. Vyjměte vzorek z magnetického separačního zařízení.
17. Opakujte kroky 14-15 pro druhé promývání **pufrem HMW2**.
18. Ponechte vzorek na magnetickém separačním zařízení a nechte magnetické kuličky 5 minut vysychat při pokojové teplotě. Odstraňte zbytkovou kapalinu pipetou.
 ⚠ *Je velmi důležité, abyste ze zkumavky zcela odstranili veškerou kapalinu.*

19. Ke vzorku přidejte 50-100 µl **MB Elution Buffer**. K míchání vzorku nepoužívejte pipetu ani vortex. Nejprve vzorek inkubujte při 55 °C v termomixéru (2000 ot./min.) po dobu 5 minut. Poté vzorek vyjměte z inkubace při 55 °C a jemně jej promíchejte pulzním vířením po dobu 1 sekundy. Nakonec vzorek inkubujte při 55 °C dalších 5 minut.
20. Vraťte vzorek na magnetické separační zařízení na 5 minut nebo dokud se **částice MAG-HM1** zcela nevyčistí od **MB Elution Buffer**.
21. Přeneste eluát (vyčištěný supernatant) do nové 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky a uchovávejte při teplotě 4 °C pro další použití. Pro dlouhodobé skladování uchovávejte DNA při -20 °C.

 *HMW DNA opakovaně nezmrazujte a nerozmrazujte. Tím se DNA rozpadne na menší kousky.*

Protokol: Extrakce HMW DNA z gram pozitivních bakterií

Vybavení a činidla, která musí dodat uživatel

Formát jedné zkumavky

- 1,5 ml mikrozkušavky s proteinem LoBind (snižuje kontaminaci proteiny a zvyšuje čistotu DNA)
- Magnetický stojanový separátor pro 1,5 ml mikrozkušavky (MagStrip Magnet Stand (Cat# MBMS-12))
- Širokopřůchodné pipetovací špičky (200 µl a 1000 µl pipetovací špičky s aerosolovou bariérou)
- Minirotátor zkumavek
- Mikrocentrifuga (s rotorem pro zkumavky o objemu 1,5 ml-2 ml)
- Minicentrifuga
- Vortexer
- Vodní lázeň, termomixér nebo tepelný blok s teplotou 55 °C
- 100% etanol
- 70% etanol
- Zásobní roztok lysozymu (100 mg/ml)
- 1X PBS

Co je třeba udělat před zahájením

- Ujistěte se, že HMW1 pufr a HMW2 pufr jsou připraveny podle části Příprava činidel na straně 2.
- Při manuální extrakci DNA nastavte vodní lázeň, termomixér nebo topné bloky na 55 °C.
- HMW1 pufr může během skladování vykazovat sraženiny. Pokud se precipitáty objeví, zahřejte lahvičku před použitím na 37 °C.
- Před použitím se ujistěte, že částice MAG-HM1 jsou znovu suspendovány vířením.

Tipy pro zpracování

- Vyvarujte se opakovaného rozmrazování vzorků a vzorky správně skladujte, aby nedošlo ke stříhu DNA.
- Používejte zkumavky s nízkou vazbou, abyste zabránili vazbě DNA na stěny zkumavky.
- Používejte pomalou a jemnou techniku pipetování, abyste během extrakce udrželi DNA neporušenou.
- Abyste zabránili stříhu DNA, používejte široké pipetovací špičky a vyhněte se víření.

Protokol

Požadavky na vstup do buňky: Požadavky: 1 ml kultury s hodnotou OD₆₀₀ 1 nebo blízkou 1. Přetížení bakteriálních buněk povede k neúčinné lýze a nízké čistotě DNA.


- U bakterií s hodnotami > 1 OD zvažte zvýšení extrakčních činidel nebo zředění vzorku.

⚠ Částice MAG-HM1 před použitím zahřejte na pokojovou teplotu po dobu nejméně 30 minut.

1. Bakteriální buňky sbírejte odstředováním kultury při 16 000 x g po dobu 1 minuty při 4 °C. Pelety lze zpracovat jako čerstvé pelety nebo zmrazit. K odstředění kultury použijte zkumavky Protein LoBind.
2. Supernatant z kultury zlikvidujte a přidejte 130 µl 1X PBS. Pipetujte vzorek nahoru a dolů, abyste bakteriální pelety znovu suspendovali v PBS. Ujistěte se, že nejsou viditelné hrudky buněk a vzorek vypadá homogenně.
3. Přidejte 50 µl lysozymu (100 mg/ml) a promíchejte poklepáním na zkumavku.

4. Vzorek inkubujte v termomixéru po dobu 30 minut (900 otáček za minutu) při 37 °C.
5. Přidejte 20 µl **roztoku Pro K** a 200 µl **pufru HAS**, pulzně vortexujte po dobu 1 sekundy (maximální nastavení) a inkubujte při 55 °C ve vodní lázni (je třeba zkumavku pravidelně míchat - během inkubace ji alespoň 3-5krát otočte) nebo v termomixéru po dobu 10 minut (2000 ot./min.).
6. Uvedte vzorek na pokojovou teplotu a přidejte 5 uL **RNázy A**. Pulzujte vortexem 1 sekundu x 5krát (maximální nastavení). Vzorek inkubujte při pokojové teplotě po dobu 3 minut.
7. Inkubujte vzorek při 70 °C ve vodní lázni (je třeba jej pravidelně míchat) nebo v termomixéru (2000 ot./min.) po dobu 10 minut.
8. Ke vzorku přidejte 290 uL 100% etanolu a 10 uL **částic MAG-HM1**. Pulzujte vortexem po dobu 1 sekundy x 5krát (maximální nastavení).
9. Umístěte vzorek na minirotor a otáčejte jím při pokojové teplotě po dobu 10 minut. Je normální, že se během rotace vytvoří hrudky kuliček a DNA. Hrudky nerozbíjejte. Krátce roztočte zkumavku na minicentrifuze po dobu 2 sekund.
10. Umístěte vzorek na magnetické separační zařízení na 5 minut nebo dokud se kuličky z roztoku zcela nevyčistí. Supernatant zlikvidujte pipetováním. Ujistěte se, že jste z uzávěru zkumavky odstranili veškerou zbytkovou kapalinu.
⚠ Při odsávání supernatantu nenarušujte přitahované kuličky.
11. Vyjměte vzorek z magnetického separačního zařízení.
12. Přidejte 500 µl **HMW1 pufru** a vložte vzorek na minirotor. Jemně otáčejte při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Krátce roztočte zkumavku na minicentrifuze po dobu 2 sekund.
13. Umístěte vzorek na magnetické separační zařízení na 5 minut nebo dokud se kuličky z roztoku zcela nevyčistí. Supernatant zlikvidujte odpipetováním kapaliny. Ujistěte se, že jste z uzávěru zkumavky odstranili veškerou zbytkovou kapalinu.
⚠ Při odsávání supernatantu nenarušujte přitahované kuličky.
14. Vyjměte vzorek z magnetického separačního zařízení.
15. Opakujte kroky 12-14 pro druhé promývání **pufrem HMW1**.
16. Přidejte 500 µl **HMW2 pufru** a vložte vzorek na minirotor. Jemně otáčejte při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Krátce roztočte zkumavku na minicentrifuze po dobu 2 sekund.
17. Umístěte vzorek na magnetické separační zařízení na 5 minut nebo dokud se kuličky z roztoku zcela nevyčistí. Supernatant zlikvidujte. Ujistěte se, že jste z uzávěru zkumavky odstranili veškerou zbytkovou kapalinu.
⚠ Při odsávání supernatantu nenarušujte přitahované kuličky.
18. Vyjměte vzorek z magnetického separačního zařízení.
19. Opakujte kroky 16-17 pro druhé promývání **pufrem HMW2**.
20. Ponechte vzorek na magnetickém separačním zařízení a nechte magnetické kuličky 5 minut vysychat při pokojové teplotě. Odstraňte zbytkovou kapalinu pipetou.
⚠ Je velmi důležité, abyste ze zkumavky zcela odstranili veškerou kapalinu.

21. Ke vzorku přidejte 50-100 µl **MB Elution Buffer**. K míchání vzorku nepoužívejte pipetu ani vortex. Nejprve vzorek inkubujte při 55 °C v termomixéru (2000 ot./min.) po dobu 5 minut. Poté vzorek vyjměte z inkubace při 55 °C a jemně jej promíchejte pulzním vířením po dobu 1 sekundy. Nakonec vzorek inkubujte při 55 °C dalších 5 minut.
22. Vraťte vzorek na magnetické separační zařízení na 5 minut nebo dokud se **částice MAG-HM1** zcela nevyčistí od **MB Elution Buffer**.
23. Přeneste eluát (vyčištěný supernatant) do nové 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky a uchovávejte při 4 °C nebo pro další použití. Pro dlouhodobé skladování uchovávejte DNA při -20 °C.

 *HMW DNA opakovaně nezmrazujte a nerozmrazujte. Tím se DNA rozpadne na menší kousky.*

Protokol: Extrakce HMW DNA z bukálních buněk nebo kultivovaných buněk

Vybavení a činidla, která musí dodat uživatel

Formát jedné zkumavky

- 1,5 ml mikrozkušavky s proteinem LoBind (snižuje kontaminaci proteiny a zvyšuje čistotu DNA)
- Magnetický stojanový separátor pro 1,5 ml mikrozkušavky (MagStrip Magnet Stand (Cat# MBMS-12))
- Širokopřůchodné pipetovací špičky (200 µl a 1000 µl pipetovací špičky s aerosolovou bariérou)
- Minirotátor zkumavek
- Mikrocentrifuga (s rotorem pro zkumavky o objemu 1,5 ml-2 ml)
- Minicentrifuga
- Vortexer
- Vodní lázeň, termomixér nebo tepelný blok s teplotou 55 °C
- 100% etanol
- 70% etanol
- Volitelně: může být vyžadován fosfátem pufovaný fyziologický roztok (PBS) nebo voda bez nukleáz.


Co je třeba udělat před zahájením

- Ujistěte se, že HMW1 pufr a HMW2 pufr jsou připraveny podle části Příprava činidel na straně 2.
- Při manuální extrakci DNA nastavte vodní lázeň, termomixér nebo topné bloky na 55 °C.
- HMW1 pufr může během skladování vykazovat sraženiny. Pokud se precipitáty objeví, zahřejte lahvičku před použitím na 37 °C.
- Před použitím se ujistěte, že částice MAG-HM1 jsou znovu suspendovány vířením.

Tipy pro zpracování

- Vyvarujte se opakovaného rozmrazování vzorků a vzorky správně skladujte, aby nedošlo ke stříhu DNA.
- Používejte zkumavky s nízkou vazbou, abyste zabránili vazbě DNA na stěny zkumavky.
- Používejte pomalou a jemnou techniku pipetování, abyste během extrakce udrželi DNA neporušenou.
- Abyste zabránili stříhu DNA, používejte široké pipetovací špičky a vyhněte se víření.

Protokol


 **Částice MAG-HM1** před použitím zahřejte na pokojovou teplotu po dobu nejméně 30 minut.

1. Vzorek odstředíte při 2000 otáčkách za minutu po dobu 5 minut a odstraňte kapalně médium.
2. K peletě vzorku přidejte 200 µl **pufru HTS**.
3. Přidejte 20 µl **roztoku Pro K**. Pulzujte vortexem po dobu 1 sekundy (maximální nastavení). Inkubujte při 55 °C v termomixéru (2000 ot./min.) nebo ve vodní lázni (je třeba zkumavku pravidelně míchat - během inkubace ji alespoň 3-5krát otočte) po dobu 20 minut.
4. Vzorek odstředíte při 3000 x g po dobu 10 minut a lyzát přeneste do nové 1,5 ml zkumavky.

 **Nepřenášejte zbytky buněk.**

5. Ke vzorku přidejte 200 µl **pufri HAS**. Pulzujte vortexem po dobu 1 sekundy (maximální nastavení). Inkubujte při 70 °C po dobu 10 minut v termomixéru (2000 ot./min.).
6. Uvedte vzorek na pokojovou teplotu a přidejte 5 µl **RNázy A**. Pulzně vortexujte po dobu 1 sekundy (maximální nastavení) nebo několikrát poklepejte na zkumavku a inkubujte 3 minuty při pokojové teplotě.
7. Ke vzorku přidejte 435 uL 100% etanolu a 10 uL **částic MAG-HM1**. Pulzujte vortexem po dobu 1 sekundy x 5krát (maximální nastavení).
8. Umístěte vzorek na minirotor a otáčejte jím při pokojové teplotě po dobu 10 minut. Je normální, že se během rotace vytvoří hrudky kuliček a DNA. Hrudky nerozbíjejte. Krátce roztočte zkumavku na minicentrifuze po dobu 2 sekund.
9. Umístěte vzorek na magnetické separační zařízení na 5 minut nebo dokud se kuličky z roztoku zcela nevyčistí. Supernatant zlikvidujte pipetováním. Ujistěte se, že jste z uzávěru zkumavky odstranili veškerou zbytkovou kapalinu.
⚠ Při odsávání supernatantu nenarušujte přitahované kuličky.
10. Vyjměte vzorek z magnetického separačního zařízení.
11. Přidejte 500 µl **HMW1 pufri** a vzorek umístěte na minirotor. Jemně otáčejte při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Krátce roztočte zkumavku na minicentrifuze po dobu 2 sekund.
12. Umístěte vzorek na magnetické separační zařízení na 5 minut nebo dokud se kuličky z roztoku zcela nevyčistí. Supernatant zlikvidujte odpipetováním kapaliny. Ujistěte se, že jste z uzávěru zkumavky odstranili veškerou zbytkovou kapalinu.
⚠ Při odsávání supernatantu nenarušujte přitahované kuličky.
13. Vyjměte vzorek z magnetického separačního zařízení.
14. Opakujte kroky 10-12 pro druhé promývání **pufrem HMW1**.
15. Přidejte 500 µl **HMW2 pufri** a vložte vzorek na minirotor. Jemně otáčejte při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Krátce roztočte zkumavku na minicentrifuze po dobu 2 sekund.
16. Umístěte vzorek na magnetické separační zařízení na 5 minut nebo dokud se kuličky z roztoku zcela nevyčistí. Supernatant zlikvidujte odpipetováním kapaliny. Ujistěte se, že jste z uzávěru zkumavky odstranili veškerou zbytkovou kapalinu.
⚠ Při odsávání supernatantu nenarušujte přitahované kuličky.
17. Vyjměte vzorek z magnetického separačního zařízení.
18. Opakujte kroky 14-15 pro druhé promývání **pufrem HMW2**.
19. Ponechte vzorek na magnetickém separačním zařízení a nechte magnetické kuličky 5 minut vysychat při pokojové teplotě. Odstraňte zbytkovou kapalinu pipetou.
⚠ Je velmi důležité, abyste ze zkumavky zcela odstranili veškerou kapalinu.
20. Ke vzorku přidejte 50-100 µl **MB Elution Buffer**. K míchání vzorku nepoužívejte pipetu ani vortex. Nejprve vzorek inkubujte při 55 °C v termomixéru (2000 ot./min.) po dobu 5 minut. Poté vzorek vyjměte z inkubace při 55 °C a jemně jej promíchejte pulzním vířením po dobu 1 sekundy. Nakonec vzorek inkubujte při 55 °C dalších 5 minut.

20. Vraťte vzorek na magnetické separační zařízení na 5 minut nebo dokud se **částice MAG-HM1** zcela nevyčistí od **MB Elution Buffer**.
21. Přeneste eluát (vyčištěný supernatant) do nové 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky a uchovávejte při teplotě 4 °C pro další použití. Pro dlouhodobé skladování uchovávejte DNA při -20 °C.

 *HMW DNA opakovaně nezmrazujte a nerozmrazujte. Tím se DNA rozpadne na menší kousky.*

Protokol: Extrakce HMW DNA ze slin, plné krve a kostní dřevě

Vybavení a činidla, která musí dodat uživatel

Formát jedné zkumavky

- 1,5 ml mikrozkušavky s proteinem LoBind (snižuje kontaminaci proteiny a zvyšuje čistotu DNA)
- Magnetický stojanový separátor pro 1,5 ml mikrozkušavky (MagStrip Magnet Stand (Cat# MBMS-12))
- Širokoprůchodné pipetovací špičky (200 µl a 1000 µl pipetovací špičky s aerosolovou bariérou)
- Minirotátor zkumavek
- Mikrocentrifuga (s rotorem pro zkumavky o objemu 1,5 ml-2 ml)
- Minicentrifuga
- Vortexer
- Vodní lázeň, termomixér nebo tepelný blok s teplotou 55 °C
- 100% etanol
- 70% etanol
- 1X PBS

Automatizace

Pro skript Kingfisher™ Flex kontaktujte support@magbiogenomics.com.

- 1,2 ml 96 hlubokých jamek
- Širokohrdlé pipetovací špičky (200 µl a 1000 µl pipetovací špičky s aerosolovou bariérou)
- Mikrocentrifuga (s rotorem pro zkumavky o objemu 1,5 ml-2 ml)
- Minicentrifuga
- Vortexer
- 100% etanol
- 70% etanol
- 1X PBS

Co je třeba udělat před zahájením

- Ujistěte se, že HMW1 pufr a HMW2 pufr jsou připraveny podle části Příprava činidel na straně 2.
- Při manuální extrakci DNA nastavte vodní lázeň, termomixér nebo topné bloky na 55 °C.
- HMW1 pufr může během skladování vykazovat sraženiny. Pokud se precipitáty objeví, zahřejte lahvičku před použitím na 37 °C.
- Před použitím se ujistěte, že částice MAG-HM1 jsou znovu suspendovány vířením.

Tipy pro zpracování

- Vyvarujte se opakovaného rozmrazování vzorků a vzorky správně skladujte, aby nedošlo ke stříhu DNA.
- Používejte zkumavky s nízkou vazbou, abyste zabránili vazbě DNA na stěny zkumavky.
- Používejte pomalou a jemnou techniku pipetování, abyste během extrakce udrželi DNA neporušenou.
- Abyste zabránili stříhu DNA, používejte široké pipetovací špičky a vyhněte se víření.

Protokol

⚠ **Částice MAG-HM1** před použitím zahřejte na pokojovou teplotu po dobu nejméně 30 minut.

1. Do zkumavky o objemu 1,5 ml přidejte 20 µl **roztoku Pro K**.
2. Přidejte 100 µl **MB Elution Buffer**, 200 µl slin nebo plné krve a 300 µl **HAS Buffer**.
3. Pulzně vortexujte po dobu 1 sekundy (maximální nastavení) nebo zkumavku 5-10krát převraťte, aby došlo k promíchání, a vzorek inkubujte při 55 °C v termomixéru nebo ve vodní lázni (je třeba jej pravidelně míchat - během inkubace zkumavku alespoň 3-5krát převraťte) po dobu 20 minut.
4. Uvedte vzorek na pokojovou teplotu a přidejte 5 µl **RNázy A**. Inkubujte 3 minuty.
5. Ke vzorku přidejte 430 µL 100% etanolu a 10 µL **částic MAG-HM1**. Pulzujte vortexem po dobu 1 sekundy x 5krát (maximální nastavení).
6. Umístěte vzorek na minirotor a otáčejte jím při pokojové teplotě po dobu 10 minut. Je normální, že se během rotace vytvoří hrudky kuliček a DNA. Hrudky nerozbíjejte. Krátce roztočte zkumavku na minicentrifuze po dobu 2 sekund.
7. Umístěte vzorek na magnetické separační zařízení na 5 minut nebo dokud se kuličky z roztoku zcela nevyčistí. Supernatant zlikvidujte pipetováním. Ujistěte se, že jste z uzávěru zkumavky odstranili veškerou zbytkovou kapalinu.

⚠ *Při odsávání supernatantu nenarušujte přitahované kuličky.*

8. Vyjměte vzorek z magnetického separačního zařízení.
9. Přidejte 500 µl **HMW1 pufru** a vložte vzorek na minirotor. Jemně otáčejte při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Krátce roztočte zkumavku na minicentrifuze po dobu 2 sekund.
10. Umístěte vzorek na magnetické separační zařízení na 5 minut nebo dokud se kuličky z roztoku zcela nevyčistí. Supernatant zlikvidujte odpipetováním kapaliny. Ujistěte se, že jste z uzávěru zkumavky odstranili veškerou zbytkovou kapalinu.

⚠ *Při odsávání supernatantu nenarušujte přitahované kuličky.*

11. Vyjměte vzorek z magnetického separačního zařízení.
12. Opakujte kroky 9-11 pro druhé promývání **pufrem HMW1**.
13. Přidejte 500 µl **HMW2 pufru** a vložte vzorek na minirotor. Jemně otáčejte při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Krátce roztočte zkumavku na minicentrifuze po dobu 2 sekund.
14. Umístěte vzorek na magnetické separační zařízení na 5 minut nebo dokud se kuličky z roztoku zcela nevyčistí. Supernatant zlikvidujte pipetováním. Ujistěte se, že jste z uzávěru zkumavky odstranili veškerou kapalinu.

⚠ *Při odsávání supernatantu nenarušujte přitahované kuličky.*

15. Vyjměte vzorek z magnetického separačního zařízení.
16. Opakujte kroky 13-14 pro druhé promývání **pufrem HMW2**.

17. Ponechte vzorek na magnetickém separačním zařízení a nechte magnetické kuličky 5 minut vysychat při pokojové teplotě. Odstraňte zbytkovou kapalinu pipetou.
⚠ Je velmi důležité, abyste ze zkumavky zcela odstranili veškerou kapalinu.
18. Ke vzorku přidejte 50-100 µl **MB Elution Buffer**. K míchání vzorku nepoužívejte pipetu ani vortex. Nejprve vzorek inkubujte při 55 °C v termomixéru (2000 ot./min.) po dobu 5 minut. Poté vzorek vyjměte z inkubace při 55 °C a jemně jej promíchejte pulzním vířením po dobu 1 sekundy. Nakonec vzorek inkubujte při 55 °C po dobu dalších 5 minut.
19. Vraťte vzorek na magnetické separační zařízení na 5 minut nebo dokud se **částice MAG-HM1** zcela nevyčistí od **MB Elution Buffer**.
20. Přeneste eluát (vyčištěný supernatant) do nové 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky a uchovávejte při 4 °C nebo pro další použití. Pro dlouhodobé skladování uchovávejte DNA při -20 °C.
⚠ HMW DNA opakovaně nezmrazujte a nerozmrazujte. Tím se DNA rozpadne na menší kousky.

Protokol: Extrakce HMW DNA z tkání

Vzorový vstup: Tento protokol je určen pro vzorek tkáně o hmotnosti 10 mg nebo méně. Pokud se zpracovává větší množství tkáně, je třeba odpovídajícím způsobem zvýšit množství pufru HTS a pufru HAS.

Vybavení a činidla, která musí dodat uživatel

Formát jedné zkumavky

- 1,5 ml mikrozkušavky s proteinem LoBind (snižuje kontaminaci proteiny a zvyšuje čistotu DNA)
- Magnetický stojanový separátor pro 1,5 ml mikrozkušavky (MagStrip Magnet Stand (Cat# MBMS-12))
- Širokopřůchodné pipetovací špičky (200 μ l a 1000 μ l pipetovací špičky s aerosolovou bariérou)
- Minirotátor zkumavek
- Mikrocentrifuga (s rotorem pro zkumavky o objemu 1,5 ml-2 ml)
- Minicentrifuga
- Vortexer
- Vodní lázeň, termomixér nebo tepelný blok s teplotou 55 °C
- 100% etanol
- 70% etanol
- Váha Vážicí papír
- Skalpel
- Suchý led pro zmrazené tkáně
- Kapalný dusík
- Volitelně: může být vyžadován fosfátem pufovaný fyziologický roztok (PBS) nebo voda bez nukleáz.

Co je třeba udělat před zahájením

- Ujistěte se, že HMW1 pufr a HMW2 pufr jsou připraveny podle části Příprava činidel na straně 2.
- Při manuální extrakci DNA nastavte vodní lázeň, termomixér nebo topné bloky na 55 °C.
- HMW1 pufr může během skladování vykazovat sraženiny. Pokud se precipitáty objeví, zahřejte lahvičku před použitím na 37 °C.
- Před použitím se ujistěte, že částice MAG-HM1 jsou znovu suspendovány vířením.

Tipy pro zpracování

- Vyvarujte se opakovaného rozmrazování vzorků a vzorky správně skladujte, aby nedošlo ke stříhu DNA. Používejte zkumavky s nízkou vazbou, abyste zabránili vazbě DNA na stěny zkumavky.
- Používejte pomalou a jemnou techniku pipetování, abyste během extrakce udrželi DNA neporušenou. Abyste zabránili stříhu DNA, používejte široké pipetovací špičky a vyhněte se víření.

Protokol


⚠ Částice MAG-HM1 před použitím zahřejte na pokojovou teplotu po dobu nejméně 30 minut.


1. Vložte až 10 mg tkáně do 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky.


⚠ Rozřezání tkáně na menší kousky ($\leq 1 \text{ mm}^3$) pomocí skalpelu může urychlit proces lýzy.


Volitelně: Pro zlepšení lýzy a zkrácení inkubační doby rozmělněte vzorek na jemný prášek v tekutém dusíku.


2. Ke každému vzorku přidejte 250 µl **pufru HTS**.
3. Přidejte 20 µl **roztoku Pro K**. Poklepejte na zkumavky, aby se důkladně promíchaly, nebo je 5-10krát převraťte. Inkubujte při 55 °C ve vodní lázni po dobu 30 minut (během inkubace třikrát obraťte) nebo použijte termomixér nastavený na 900 otáček za minutu.
4. Chcete-li odstranit kapalinu z uzávěrů zkumavek, minicentrifugujte zkumavky po dobu 2 sekund.
5. U vzorků tkání obsahujících materiál, který nelze během kroku lýzy zcela rozložit, odstředujte destičku při 10 000 x g při pokojové teplotě (15-30 °C) po dobu 5 minut, aby se nestrávený materiál peletoval.
6. Přeneste čirý lyzát do nové zkumavky o objemu 1,5 ml.
7. Do každé zkumavky se vzorkem přidejte 5 µl **RNázy A**. Pulzujte 1 sekundu a inkubujte 3 minuty při pokojové teplotě (15-30 °C).
8. Ke vzorku přidejte 200 µl **pufru HAS**, 5-10krát invertujte nebo pulzně vortexujte 1 s x 5krát (maximální nastavení) a inkubujte při 55 °C po dobu 10 minut. Během inkubace vzorek 5-10krát jemně převraťte, aby se jednou promíchal.


 *Od tohoto kroku není během zpracování extrakce povoleno žádné víření ani míchání pipetou, s výjimkou elučního kroku.*
9. Ke vzorku přidejte 290 µl 100% etanolu a 10 µl **částic MAG-HM1**. Jemně obraťte zkumavku 2-5krát promíchejte. Vzorek umístěte na rotátor a jemně otáčejte při pokojové teplotě po dobu 10 minut. Je normální, že se během rotace vytvoří hrudky kuliček a DNA. Hrudky nerozbíjejte. Krátce roztočte zkumavku na minicentrifuze po dobu 2 sekund.
10. Umístěte vzorek na magnetické separační zařízení na 5 minut nebo dokud **se částice MAG-HM1** z roztoku zcela nevyčistí. Odstraňte a zlikvidujte veškerou kapalinu.




 *Při odsávání supernatantu nenarušujte přitahované kuličky.*
11. Vyjměte vzorek z magnetického separačního zařízení. Přidejte 500 µl **HMW1 pufru** a umístěte vzorek na rotátor. Jemně otáčejte při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Krátce roztočte zkumavku na minicentrifuze po dobu 2 sekund.

 *HMW1 pufr musí být před použitím zředěn 100% etanolem.*
12. Umístěte vzorek na magnetické separační zařízení na 2 minuty nebo dokud **se částice MAG-HM1** z roztoku zcela nevyčistí. Odstraňte a zlikvidujte veškerou kapalinu.

 *Při odsávání supernatantu nenarušujte přitahované kuličky.*
13. Opakujte kroky 11-12 pro druhé promývání **pufrem HMW1**.
14. Vyjměte vzorek z magnetického separačního zařízení. Přidejte 500 µl **HMW2 pufru** a umístěte vzorek na rotátor. Jemně otáčejte při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Krátce roztočte zkumavku na minicentrifuze po dobu 2 sekund.

 *HMW2 pufr musí být před použitím zředěn 100% etanolem.*
15. Umístěte vzorek na magnetické separační zařízení na 2 minuty nebo dokud **se částice MAG-HM1** z roztoku zcela nevyčistí. Odstraňte a zlikvidujte veškerou kapalinu.

 *Při odsávání supernatantu nenarušujte přitahované kuličky.*
16. Opakujte kroky 14-15 pro druhé promývání **pufrem HMW2**.

17. Ponechte vzorek na magnetickém separačním zařízení a nechte magnetické kuličky 5 minut vysychat při pokojové teplotě. Odstraňte zbytkovou kapalinu pipetou.
 *Je velmi důležité, abyste ze zkumavky zcela odstranili veškerou kapalinu.*
18. Ke vzorku přidejte 50-100 µl **MB Elution Buffer**. K míchání vzorku nepoužívejte pipetu ani vortex.
 *Před zahřátím nemíchejte pipetou kuličky a eluční pufr, protože hmotnost shluků roztříští fragmenty DNA.*
19. Vzorek inkubujte při 55 °C po dobu 5 minut a poté jej vyjměte z inkubace při 55 °C. Jemně vzorek 5krát promíchejte pipetou. Poté vzorek inkubujte při 55 °C dalších 5 minut.
20. Vraťte vzorek na magnetické separační zařízení na 5 minut nebo dokud se **částice MAG-HM1** zcela nevyčistí od **MB Elution Buffer**.
21. Pomocí širokohrdlé pipety P200 přeneste eluát (vyčištěný supernatant) do vhodné skladovací nádoby. Uchovávejte DNA při teplotě 4 °C pro další použití. Pro dlouhodobé skladování uchovávejte DNA při -20 °C.
 *HMW DNA opakovaně nezmrazujte a nerozmrazujte. Tím se DNA rozpadne na menší kousky.*

Průvodce řešením problémů

Při řešení případných problémů použijte tuto příručku. Pro další pomoc se obraťte na technickou podporu prostřednictvím:

Telefon: USA/Kanada, +1 301-302-0144. Evropa, +49 7250 33 13 403

E-mail: USA/Kanada, support@magbiogenomics.com. Evropa, info.europe@magbiogenomics.com

Příznaky	Možné příčiny	Komentáře
Nízká výtěžnost DNA	Zmrazené vzorky nejsou po rozmrazení řádně promíchány	Rozmrazte zmrazené vzorky při pokojové teplotě a jemně je promíchejte převrácením.
	Krev je příliš stará	Nejlepší výtěžnost se získává z čerstvé krve
	Nízké hladiny leukocytů	Nízký počet bílých krvinek vede ke snížení výtěžnosti
	Neúplná resuspenze MAG-HM1 Částice	Před použitím resuspendujte částice MAG-HM1 prudkým vířením.
	Ztráta částic MAG-HM1 během provozu	Při odsávání supernatantu se vyvarujte narušení částic MAG-HM1.
	DNA zůstává navázána na MAG-HM1 Částice	Zvyšte eluční objem a inkubujte 15 minut. Směs pipetujte 50 až 100krát
	Ethanol se do pufru HMW1 nebo HMW2 nepřidává.	Přidejte absolutní 100% etanol do pufru HMW1 nebo HMW2 (pokyny viz strana 2).
MAG-HM1 Částice se z roztoku zcela nevyčistí	Příliš krátká doba magnetizace	Prodloužení doby sběru na magnetu.
Eluovaná DNA obsahuje gelovitý materiál	Krev je příliš stará	Želatinový materiál odstraňte odstředěním. Doporučujeme použít čerstvou krev
		Jako eluční pufr použijte 8 mM NaOH
Problémy v navazujících aplikacích	Nedostatečné množství DNA ve výchozím materiálu	Použijte více výchozího materiálu
	Přenos etanolu	Částice MAG-HM1 před elucí zcela vysušte.

Objednávání

Sada pro DNA s vysokou molekulovou hmotností

Katalogové číslo	Produkt	Popis	Přípravky
HPHMW-D96	Sada HighPrep HMW DNA (96 předloh)	Izolace vysokomolekulární DNA z plné krve, kostní dřeně, slin, bukalních buněk, kultivovaných buněk, tkání a bakterií.	96
HPHMW-D96x4	Sada HighPrep HMW DNA (384 předloh)		384

Související produkty

HighPrep PCR PB

Katalogové číslo	Produkt
PB-60005	HighPrep PCR PB (5 ml)
PB-60050	HighPrep PCR PB (50 ml)

Krátký vyčerpávač fragmentů - 10

Katalogové číslo	Produkt	Popis
SFD10-D50	Krátký vyčerpávač fragmentů - 10	Deplece fragmentů DNA < 10 kb

Magnetická separační zařízení

Katalogové číslo	Popis
MYMAG-96	Ruční magnetické separační zařízení (formát 96 jamek mikrotitračních destiček)
MYMAG-96X	Magnetické separační zařízení (kruhový formát 96 jamek)
MBMS-12	Magnetový stojan MagStrip (1,5 ml x 12)
MBMS-31550	Kombinace 15 ml a 50 ml magnetického stojanu (3 x 15 ml a 3 x 50 ml)

