

Uživatelská příručka pro izolační soupravy SaMag

Pro použití s automatickými extrakčními systémy **SaMag-12** a **SaMag-24** od společnosti Sacace Biotechnologies

- **SaMag Tissue DNA Extraction Kit (SM004)**



Sacace Biotechnologies Srl
via Scalabrini, 44 – 22100 – Como – Italy Tel +390314892927 Fax +390314492493
mail: info@sacace.com web: www.sacace.com

SaMag Tissue DNA Extraction Kit

NÁZEV

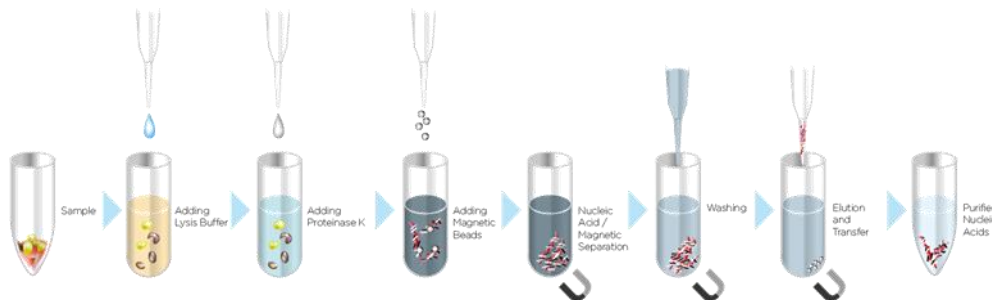
SaMag Tissue DNA Extraction Kit

POUŽITÍ

Souprava SaMag Tissue DNA Extraction Kit je navržena pro použití s automatickým izolátorem nukleových kyselin SaMag-12/24 pro izolaci genomové DNA z různých typů zvířecích tkání, vzorků stěrů a krevních barviv.

PRINCIP TESTU

Proces extrakce se skládá z kroků lyze, navázání nukleové kyseliny, omytí a eluce jak je znázorněno na obrázku níže.



Připravené nukleové kyseliny jsou vhodné pro aplikace, jako je qPCR, sekvenování (NGS), microarray, RFLP, Southern blot nebo jakékoliv enzymatické manipulace.

MATERIÁL POSKYTNUTÝ SE SOUPRAVOU

- Reagenční kazeta (Reagent cartridge), 48 ks (6x8);
- Reakční nádobka (Reagent chamber), 48 ks (2x 6x4);
- Držák na špičku (Tip holder), 48 ks (2x 6x4);
- Špička s filtrem (Filtered tip), 50 ks (50x1);
- Propichovací kolík (Piercing pin), 50 ks (50x1);
- Zkumavka na vzorek (Sample tube; 2 ml), 50 ks (50x1);
- Eluční zkumavka (Elute tube; 1,5 ml), 50 ks (50x1);
- Proteináza K (10mg/ml) 1x1 ml;
- Pufr BL2 (1x25 ml);
- List s čárovými kódy, 1 list;

Obsahuje reagentie pro provedení 48 testů.

POŽADOVANÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ SOUPRAVY

- Izolátor SaMag-12/24 Automatic Nucleic Acids Extraction System (Sacace Biotechnologies, Itálie)
- Jednorázové vyšetřovací rukavice, bezpudrové
- Mikropipety
- Biohazardní box
- Vodní lázeň s třepáním nebo termomixer

OMEZENÍ POUŽITÍ PRODUKTU

Všechna činidla mohou být používána výlučně v diagnostice in vitro. Použití tohoto přípravku by mělo být omezeno na personál vyškolený v technikách amplifikace DNA. Pro dosažení optimálních výsledků je třeba přísně dodržovat pokyny v uživatelské příručce. Pozornost by měla být věnována datům expirace uvedených na balení a označování všech komponent. Nepoužívejte soupravu po uplynutí doby použitelnosti.

OBSAH REAGENČNÍ KAZETY



well-1	Prázdna pozice	
well-2	Lyzační pufr 2	720 µl
well-3	Vazebný pufr 1	720 µl
well-4	Roztok s magnetickými kuličkami	800 µl
well-5	Promývací pufr 1	1000 µl
well-6	Promývací pufr 2	1000 µl
well-7	Promývací pufr 3	1000 µl
well-8	Eluční pufr 1	1000 µl
well-9	Eluční pufr 2	1000 µl
well-10	Prázdna pozice	

SKLADOVÁNÍ

Souprava SaMag Tissue DNA Extraction by měla být skladována při pokojové teplotě (15-25 °C). Reagenční kazety chraňte před mrazem. Za dodržení těchto podmínek vydrží tyto soupravy být stabilní po dobu 12 měsíců.

Před provedením navazujících analýz skladujte vyizolovanou DNA při teplotě 4°C (krátkodobě), nebo v alikvótách a skladujte při teplotě -70 °C (dlouhodobě).

UPOZORNĚNÍ A OPATŘENÍ

- Při manipulaci se vzorky a činidly používejte rukavice na jedno použití, pracovní oděv a ochranu očí. Po práci si důkladně umyjte ruce.
- Nepipetujte ústy.
- Nejezte, nepijte, nekuřte, nepoužívejte kosmetiku, nebo nemanipulujte s kontaktními čočkami v laboratorních prostorách.
- Nepoužívejte soupravu po uplynutí doby použitelnosti.
- Zlikvidujte všechny vzorky a nevyužitá činidla v souladu s místními předpisy.
- Vzorky by měly být považovány za potenciálně infekční a mělo by s nimi být pracováno v biohazard boxu v souladu s biologickou bezpečností úrovně 2 nebo podle jiných vhodných bezpečnostních postupů.
- Všechny vylité části vzorků nebo činidel ihned vyčistěte za použití dezinfekčního prostředku, jako je např. 0,5% chlornan sodný, nebo jiným vhodným dezinfekčním prostředkem.
- Vyhněte se kontaktu vzorků a činidel s pokožkou, očima a sliznicemi. Pokud tyto roztoky přijdou do kontaktu s těmito částmi těla, okamžitě vypláchněte vodou a ihned vyhledejte lékařskou pomoc.
- Bezpečnostní listy (MSDS) jsou k dispozici na vyžádání.
- Použití tohoto výrobku by mělo být omezeno na pracovníky vyškolené v technikách amplifikace DNA.
- Workflow v laboratoři musí postupovat jednosměrným způsobem, začátek je v prostoru extrakce a pohybuje se ve směru amplifikace a detekce. Nevracejte vzorky, zařízení a chemikálie do oblasti, kde jste provedli předchozí krok.

VSTUPNÍ MATERIÁL

Typy a množství vstupních vzorků pro použití se soupravou SaMag Tissue DNA jsou uvedeny níže v tabulce:

Typ vzorku	Nukleová kyselina	Objem vzorku (Množství vstupního materiálu)	Eluční objem
Tkáň	DNA	100-400 µl/10-40 mg	100-300µl
Vzorky suchých stěrů (e.g. Bukální buňky)		100-400 µl/1 stěr nebo kartáček (pro extrakci přidejte pufr BL2 a proteinázu K k 100-400 µl)	
Vysušená krev		100-400 µl/4 disky*	
Kontrola/Volitelná interní kontrola	Přidejte kontroly/interní kontroly do extrakčního procesu pokud to vyžadují následné analýzy.		

* disk s průměrem 3mm vytlačený z filtračního papíru obsahující zaschlou krev obsahující bílé krvinky z cca 5 µl plné krve; doporučujeme použít 4 takové disky jako startovací materiál.

VÝTĚŽEK DNA

Výtěžky DNA závisí na typu vzorku, počtu buněk s jádry ve vzorku, a použitím protokolu pro izolaci DNA. Tabulka níže ukazuje očekávané výtěžky DNA z různých typů vzorku s použitím extrakčního postupu a soupravou SaMag Tissue DNA:

Typ vzorku	Množství vzorku	Typický DNA výtěžek
Skeletální sval	200 µl (40 mg naštěpené tkáně)	Až 9µg
Srdce	200 µl (20 mg naštěpené tkáně)	Až 12µg
Slezina	200 µl (10 mg naštěpené tkáně)	Až 27µg
Plíce	200 µl (10 mg naštěpené tkáně)	Až 17µg
Ledvina	200 µl (10 mg naštěpené tkáně)	Až 18µg
Játra	200 µl (10 mg naštěpené tkáně)	Až 40µg
Bukální buňky	1 Stěr	1-5 µg
Vyschlá krev	4 x 3 mm disky	0.2-0.5 µg

Požadavky na přípravu vzorku jsou vysoce závislé na typu výchozího materiálu. Vzhledem k rozdílu v konzistenci a viskozitě, mohou i podobné druhy vzorků vyžadovat odlišné zacházení. Následující kroky popisují některá doporučení pro zpracování primárních vzorků.

PŘÍPRAVA VZORKU

Pro pevné zvířecí tkáně:

1. Přenesení tkáně	Přenešte tkáň do 1.5 ml mikrocentrifugační zkumavky:		
	Č.	Typ vzorku	Doporučené množství vzorku
	1	Srdce	20 mg
	2	Sval	40 mg
3	Další tkáně	10 mg	
2. Přidání pufru BL2	Přidejte 100-400 µl poskytnutého pufru BL2. Ujistěte se, že jsou kousky tkáně plně ponořeny v pufru BL2.		
3. Přidání Proteinázy K	Přidejte 20 µl roztoku proteinázy K a vortexujte.		
4. Inkubace	Inkubujte při teplotě 55 °C ve vodní lázni s třepáním nebo termomixéru (nastavte na 1000rpm), dokud se tkáň zcela nezlyžuje. Poznámka: 1. Doba lyze se mění v závislosti na typu zpracovávané tkáně. Lyze je obvykle dokončena v průběhu 1-2 hodin. Lyze přes noc je možná, ale nemá vliv na přípravu a výtěžnost. 2. Pro inkubaci použijte termoblok, doporučujeme vortexovat několikrát během inkubace.		
5. Stočení a Přenos	Stočte a přenešte 100-400 µl supernatantu do zkumavky pro vzorek. Použijte pufr BL2 pro nastavení objemu vzorku. Volitelně: Použijte kolonku s filtrem (není součástí soupravy) pro odstranění zbytkových nečistot a mukózního materiálu před extrakcí, tím zvýšíte výtěžek DNA (20-100%).		

Pro tkáňové stěry:

1. Nastříhání	Opatrně uřízněte nebo ulomte koncové části tampónu nebo štětečku nad šroubovým uzávěrem 2ml zkumavky (není součástí dodávky) pomocí vhodného nástroje (např nůžky).
2. Přidání pufru BL2	Přidejte 100-400 µl pufru BL2 ke vzorku. Ujistěte se, že je vzorek plně ponořen do pufru BL2.
3. Přidání proteinázy K	Přidejte 20 µl proteinázy K a řádně vortexujte 10 s. Pokud zpracováváte stěr bukalních buněk, centrifugujte krátce zkumavku (při 10,000 x g, 30s), aby došlo k stlačení štětečku na dno zkumavky.
4. Inkubace	Inkubujte při 55 °C po dobu 15 min (umístěte do termomixéru nastaveného na 1000 rpm nebo vortexujte několikrát během inkubace, pokud používáte termoblok).
5. Centrifugace	Centrifugujte krátce zkumavku, abyste odstranili kapky z víčka.
6. Odstranění	Odstraňte tampón nebo kartáček ze zkumavky. Pinzetou přitlačte tampón nebo štěteček proti stěně zkumavky, abyste získali maximum objemu vzorku. Objem vzorku by měl být přibližně jako vnesený objem během přípravy (100-400 µl). *K nastavení objemu použijte pufr BL2.

Zaschlá krev:

1. Sběr	Odeberte 70 µl každého vzorku krve na kotouček naznačený na filtračním papíru. Nechte krev na vzduchu zaschnout. Můžete použít neošetřenou krev nebo krev obsahující antikoagulanty (EDTA, ACD, nebo heparin*). <i>*heparin má inhibiční efekt na amplifikační reakci nukleových kyselin</i>
2. Nastříhání	Pro každý vzorek zaschlé krve použijte manuální raznici, abyste vystříhli 4 disky o průměru 3mm.
3. Přidání pufru BL2	Přeneste všechny 4 disky do 1.5 ml mikrocentrigační zkumavky. Přidejte 220-440 µl BL2 ke vzorku.
4. Přidání proteinázy K	Přidejte 20 µl proteinázy K a vortexujte.
5. Inkubace	Inkubujte při 55 °C, 15 min v termomixeru (nastavte na 1000 rpm) nebo vortexujte v průběhu inkubace pokud použijete termoblok.
6. Centrifugace	Centrifugujte krátce zkumavku, aby došlo k odstranění kapek z víčka.
7. Přenos	Přeneste 100-400 µl supernatantu do zkumavky pro vzorek (součástí soupravy), přejděte k extrakci DNA.

PROTOKOL

Pro provedení extrakce v přístroji SaMag-12/24, otevřete dvířka a postupujte podle kroků uvedených v uživatelském manuálu v kapitole "Extrakce".

1. Vložte Kazetu(y)
2. **Vložte Reakční nádobku(y) ***
3. Vložte Držák špiček
4. Vložte Propichovací kolík(y)
5. Vložte Špičku(y) s filtrem
6. Vložte Zkumavku(y) se vzorkem do stojánku pro vzorky
7. Vložte 1,5 ml Eluční zkumavku(y) do stojánku pro vzorky s otevřeným víčkem
8. V biohazardním boxu přeneste vzorky do zkumavek pro vzorky
9. Pokud je součástí amplifikačního kitu Interní kontrola, přidejte ji.
10. Přeneste stojánek se vzorky do přístroje SaMag
11. Zavřete dvířka SaMag-12/24
12. Použijte čárový kód pro výběr protokolu soupravy Blood DNA Extraction kit, požadovaný počáteční objem, eluční objem

12b. V případě použití SaMag-12 ver. 3.x EVO vyberte pomocí dotykového rozhraní sadu pro extrakci tkáňové DNA (kód 2004).

POZNÁMKA: V případě použití SaMag-12 ver. 3.x EVO vyberte v rozhraní dotykové obrazovky typ stojanu 2 ml.

DNA extrahovaná pomocí soupravy SaMag Tissue DNA Extraction Kit je stabilní po dobu až jednoho roku při skladování při teplotě -20 °C, skladujte při teplotě -70 °C nebo nižší při dlouhodobém skladování.

*** NIKDY NEZAPOMEŇTE VLOŽIT REAKČNÍ NÁDOBKU PRO VŠECHNY VZORKY, JINAK MŮŽE DOJÍT K VYLITÍ PUFRŮ A POŠKOZENÍ PŘÍSTROJE, V TAKOVÉM PŘÍPADĚ SACACE BIOTECHNOLOGIES NENESE ŽÁDNOU ZODPOVĚDNOST**



Sacace Biotechnologies Srl
via Scalabrini, 44 – 22100 – Como – Italy Tel +390314892927 Fax +390314492493
mail: info@sacace.com web: www.sacace.com