

Uživatelská příručka pro izolační soupravy SaMag

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

- **SaMag Bacterial DNA Extraction Kit (SM006)**



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

SaMag Bacterial DNA Extraction Kit

NÁZEV

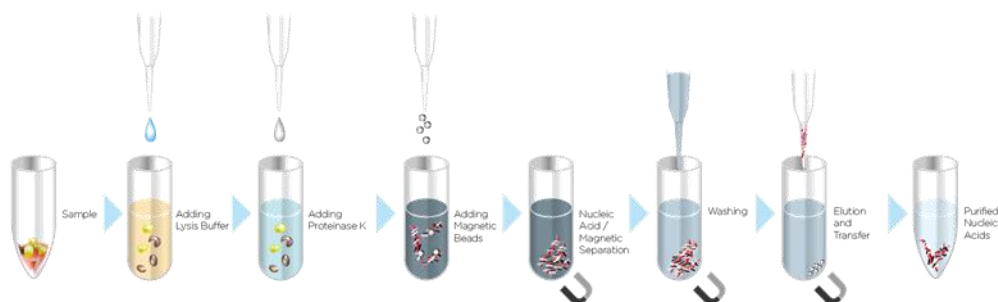
SaMag Bacterial DNA Extraction Kit

POUŽITÍ

Souprava SaMag Bacterial DNA Extraction Kit je navržena pro použití s automatickým izolátorem nukleových kyselin SaMag-12/24 pro extrakci genomové DNA pro Gram-pozitivní a Gram-negativní bakterie.

PRINCIP TESTU

Proces extrakce se skládá z kroků lýza, navázání nukleové kyseliny, promytí 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);
- 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

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 Well 2 Well 3 Well 4 Well 5 well 6 Well 7 Well 8 well 9 Well 10

well-1	Roztok proteinázy K	40 µl
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 Bacterial DNA Extraction Kit 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 alikvótech 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

Bakteriální pelet/kolonie z kultury, bezbuněčná tekutina, tekuté transportní médium, moč, environmentální materiál (voda, půda atd.). Pro izolaci DNA z řezů tkání v parafinovém bločku jako vstupní materiál, doporučujeme použít soupravu SaMag FFPE DNA Extraction kit (SM009).

Pro vstupní materiál typu tkání doporučujeme použít soupravu SaMag Tissue DNA Extraction kit (SM004).

PŘÍPRAVA VZORKU

Příprava vzorku pro izolaci je velmi závislá na typu vstupního materiálu. Přestože jsou vzorky podobné, konzistence a viskozita se může měnit, z tohoto důvodu je mnohdy nutné použít rozdílné postupy předpřípravy.

Pufr BL2 je speciálně určen pro lýzu bakteriálních stěn* (dodávaný se soupravou), použijte ho pro resuspendování bakteriálních peletů před samotným procesem extrakce.

* V případě izolace *Mycobacterium spp.* (e.g. MTB) použijte soupravu SaMag TB DNA Extraction kit (SM008).

Postupujte prosím podle uvedených doporučení níže pro zpracování primárních vzorků před samotnou extrakcí nukleových kyselin:

V případě použití viskózních vzorků (e.g. BAL, sputa nebo jiných mukózních biologických vzorků):

Doporučená předpříprava: Zkapalnění

- Pro zkapalnění připravte čerstvý zásobní roztok DTT * (např. 5× konc. DTT je cca 0.75%);
- Přidejte zásobní roztok DTT ke vzorku tak, aby finální koncentrace ve vzorku byla 0.15%;
- Inkubujte vzorky (např. třepáním při 850 rpm po dobu 30 min při 37 °C) než budou moci být pipetovány;
- Sedimentujte bakterie centrifugací při 14 000 x g po dobu 10 min;
- Odstraňte supernatant, resuspendujte pelet v 220 µl pufru BL2;
- Přeneste 200 µl suspenze do zkumavky pro vzorek (dodávaná se soupravou).

* Zkapalnění vzorku může být provedeno s použitím různých roztoků jako např. NALC (N-Acetyl-L-Cystein) -NaOH nebo jiné látky, které mohou naštěpit mukózní materiál.

V případě velkých objemů vzorků s malým nebo neznámým obsahem bakterií (např. moč**, voda z bazénu/říčního toku/vodních věží):

Doporučená předpříprava : Centrifugace

- Centrifugujte vzorek po dobu 10 min při 20,000 × g k zakoncentrování bakteriálních buněk v peletě;
- Odstraňte supernatant, resuspendujte pelet v 220 µl pufru BL2*;
- Odeberte 200 µl suspenze do zkumavky pro vzorky (dodávané se soupravou).

* Jestliže je v peletu písek nebo viditelné pevné částice, doporučujeme opětovně zcentrifugovat vzorek po inkubaci s pufrům BL2 nebo přefiltrovat nečistoty.

** pro detekci sexuálně přenosných chodob (např. *Chlamydia trachomatis*) z moči doporučujeme použít soupravu SaMag STD DNA Extraction kit (kód SM007)

V případě bezbuněčných tělních tekutin (např. mozkomíšní mok (CSF), bronchoalveolární laváže (BAL), aspiráty):

Doporučená předpříprava : Centrifugace

Metoda 1

- Centrifugujte vzorek při 14 000 x g do dobu 10 min, abyste získali bakteriální pelet
- Resuspendujte bakteriální pelet v 220 µl pufru BL2
- Odeberte 200 µl suspenze do zkumavky pro vzorky (dodávané se soupravou).

Metoda 2 – bez centrifugace

- Odeberte 200 µl vzorku do 1.5 ml mikrocentrifugační zkumavky
- Přidejte 200 µl pufru BL2 ke vzorku (1:1)
- Vortexujte po dobu 5-10 s
- Odeberte 400 µl suspenze do zkumavky pro vzorky (dodávané se soupravou).

V případě vzorků stěrů (např. z očí, nosní, faryngální, nebo jiné stěry*):

Metoda 1

- Odeberte vzorek a umístěte v 2 ml sterilního pufru PBS. Inkubujte po dobu 30 min při pokojové teplotě;
- Centrifugujte vzorek při 14 000 x g po dobu 10 min, abyste získali bakteriální pelet;
- Resuspendujte bakteriální pelet v 220 µl pufru BL2 (dodávaný se soupravou);
- Odeberte 200 µl suspenze do zkumavky pro vzorky (dodávané se soupravou).

Metoda 2- bez centrifugace

- Umístěte vzorek stěru do 440 µl pufru BL2, inkubujte po dobu 30 min při pokojové teplotě. Přeneste 400 µl do zkumavky pro vzorek.

* pro urogenitální stěry doporučujeme použít soupravu SaMag STD DNA Extraction kit (kód SM007)

Zvýšení efektivity lyze pro určité druhy bakterií (např. Gram-pozitivní druhy):

Doporučená předpříprava : Enzymatické štěpení

- Centrifugujte vzorek po dobu 10 min při 14,000 × g k zakoncentrování bakteriálních buněk v peletě;
- Resuspendujte bakteriální pelet v 200 µl příslušného roztoku enzymu*;
- Inkubujte alespoň 30 min při 37 °C;
- Přidejte 220 µl pufru BL2. Vortexujte;
- Odeberte 200 µl supenze do zkumavky pro vzorky (dodávané se soupravou).

* enzymový roztok: 20 mg/ml lysozym nebo 200 µg/ml lysostafin; 20 mM Tris-HCl, pH 8.0; 2 mM EDTA; 1.2% Triton)

Pro některé druhy gram-pozitivních bakterií. Speciálně pro vzorky, které obsahují částice (např. stolice):

Doporučená předpříprava : Mechanická homogenizace

- Postupujte podle běžných homogenizačních postupů zavedených v laboratoři.
- Pro některé typy vzorků může být výtěžek DNA zvýšen, pokud provedete homogenizaci před přidáním pufru BL2 a proteinázy K

Izolace genomové DNA ze suspenze bakteriální kultury:

- Pipetujte 1 ml bakteriální kultury do 1.5 ml mikrocentrifugační zkumavky a centrifugujte při 5000xg po dobu 5 min;
- Odstraňte supernatant;
- Přidejte 220 µl pufru BL2 k peletu a zamíchejte vortexováním po dobu 5-10s;
- Odeberte 200 µl supenze do zkumavky pro vzorky (dodávané se soupravou).

Izolace genomové DNA z bakteriální kultury na petriho misce:

- Odeberte 1-3 bakteriální kolonie z kultury na misce pomocí inokulační kličky a resuspendujte v 220 µl pufru BL2 řádným mícháním;
- Odeberte 200 µl supenze do zkumavky pro vzorky (dodávané se soupravou).

Inaktivace patogenních organismů ve vzorku:

Doporučená předpříprava : Povaření

- Inkubujte vzorky při 95 °C po dobu 10 min
- Centrifugujte krátce pro kompletní převedení vzorku na dno zkumavky z víčka.
- Nechte vzorky zchladit nebo zchladte na ledu, poté přeneste 100-400 µl zchlazeného vzorku do zkumavky pro vzorek.

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(y) 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, požadovaný počáteční objem, eluční objem (navrhovanými hodnotami jsou 400 µl pro vstupní objem vzorku, 50 µl pro eluční objem).
- 12 b. V případě použití SaMag-12 ver. 3.x EVO vyberte pomocí dotykového rozhraní sadu pro extrakci bakteriální DNA (kód 2006).**

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

DNA extrahovaná pomocí soupravy SaMag Bacterial 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 SE NENESE ŽÁDNOU ZODPOVĚDNOST**