



Uživatelská příručka pro SaMag izolační soupravu

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

- **SaMag Plant DNA Extraction Kit (SM014)**



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

SaMag Plant DNA Extraction Kit

NÁZEV

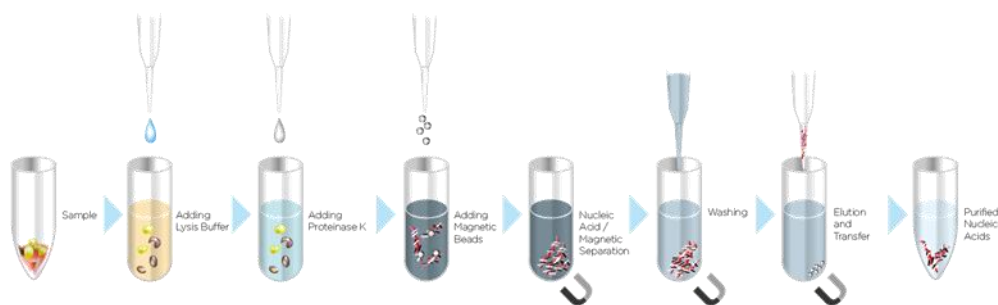
SaMag Plant DNA Extraction Kit

POUŽITÍ

SaMag Plant DNA Extraction Kit je určen pro použití s automatickým extrakčním systémem nukleových kyselin SaMag-12/24 pro izolaci genomové DNA z rostlin (listů, semen a spór) a houbové tkáně. Pro purifikaci lze použít až 100 mg materiálu.

PRINCIP TESTU

Proces extrakce se skládá z kroků lyzace, 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 POSKYTOVANÝ SE SOUPRAVOU

- Reagenční kazeta (Reagent Cartridge), 48 ks (6x8);
- Reakční nádobka (Reaction 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);
- Kolonka s filtrem (Filter Column), 50 ks (50x1);
- Sběrná zkumavka (Collection Tube), 50 ks (50x1);
- RNase A (10 mg/ml), 1x0,5ml;
- Pufr PLA (Buffer PLA), 25ml;
- Pufr PLB (Buffer PLB), 25 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 Systém (Sacace Biotechnologies, Itálie)
- Jednorázové vyšetřovací rukavice, bez pudru
- Mikropipety
- Biohazardní box
- Třepací vodní lázeň nebo temomixér

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	
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	

SKLADOVÁNÍ

Souprava SaMag Plant DNA Extraction Kit by měla být skladována při pokojové teplotě (15-25°C). Reagenční kazety chraňte před mrazem. Za takových podmínek je souprava stabilní do zvedeného data expirace.

Před provedením následné analýzy skladujte purifikovanou DNA při teplotě 4°C (krátkodobě) nebo její alikvóty při teplotě -20/-80°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

Vzorky rostlinné tkáně nebo hub.

Rostliny: pokud možno nasbírejte mladé materiály (listy, jehlice), které obsahují více buněk na hmotnost. Po sběru můžete skladovat rostlinnou tkáň při teplotě -80°C nebo ji usušit/lyofilizovat a skladovat při pokojové teplotě. Před extrakcí DNA musí být rostlinný materiál mechanicky narušen s lyzačním puřrem (Buffer PLA nebo PLB). Po homogenizaci odstraňte zbytky a usazeniny pomocí centrifugace přes filtrační membránu. Odeberte čirý průtok a inkubujte s RNázou A před izolací.

Vzorky hub: odeberte mycelium přímo z kultivační misky nebo tekuté kultury; v případě tekuté kultury oddělte první peletové buňky od supernatantu centrifugací před rozpadem a lýzou. Je možno použít čerstvé, mražené nebo lyofilizované vzorky hub.

ODBĚR BIOLOGICKÝCH VZORKŮ A SKLADOVÁNÍ

Požadavky na přípravu vzorků jsou vysoce závislé na typu výchozího materiálu. V důsledku rozdílu v konzistenci a viskozitě mohou dokonce i podobné typy vzorků vyžadovat odlišnou manipulaci. Níže uvedené kroky popisují některá doporučení pro zpracování primárních vzorků. Pro lepší výtěžnost vždy použijte homogenizátor k ošetření rostlinné tkáně a před extrakcí přidejte RNázu A k vzorku.

PŘÍPRAVA VZORKU

Typ vzorku	Postup
Rostlinná tkáň	1- homogenizace použitím vhodného homogenizátoru 2- přidejte 440 µl rostlinného lyzačního pufru* 3- energicky promíchejte 4- inkubujte směs 10 min. při teplotě 65°C v termomixéru (100 rpm) nebo několikrát promíchejte během inkubace v tepelném bloku nebo vodní lázni 5- odstraňte lyzát přes filtrační membránu ve sběrné zkumavce 6- krátce centrifugujte při otáčkách 6000xg 7- přidejte 10 µl RNase A, dobře promíchejte, inkubujte 10 min. při pokojové teplotě 8- přeneste do zkumavky na vzorek 9- začněte izolaci
Kvasinky / houby	A) Suspenze 1- centrifugujte 3 min. při otáčkách 6000xg 2- odstraňte supernatant 3- přidejte 440 µl rostlinného lyzačního pufru*, vortexujte 30 sek. 4- inkubujte směs 10 min. při teplotě 65°C v termomixéru (1000 rpm) nebo několikrát promíchejte během inkubace v tepelném bloku nebo vodní lázni 5- odstraňte lyzát přes filtrační membránu ve sběrné zkumavce 6- krátce centrifugujte při otáčkách 6000xg 7- přeneste 400 µl do zkumavky na vzorek 8- začněte izolaci B) Kolonie kultur 1- inokulační kličkou odeberte 1-3 kolonie z kultivační destičky, vytvořte suspenzi s 440 µl rostlinného lyzačního pufru*, energicky promíchejte 2- inkubujte směs 10 min. při teplotě 65°C v termomixéru (1000 rpm) nebo několikrát promíchejte během inkubace v tepelném bloku nebo vodní lázni 3- odstraňte lyzát přes filtrační membránu ve sběrné zkumavce 4- krátce centrifugujte při otáčkách 6000xg 5- odeberte 400 µl suspenze do zkumavky na vzorek 6- začněte izolaci

* 1. Poskytujeme 2 typy lyzačních pufrů: PLA a PLB pro práci s různými typy rostlinných tkání. Před extrakcí nového typu rostlinné tkáně tyto 2 lyzační pufrů pro získání optimálního postupu lýzy a lepší výtěžnost DNA (viz níže uvedená tabulka očekávaných výsledků).

* 2. Jestliže lyzační pufr obsahuje vysrážené krystalky, před použitím jej zahřejte na 65°C.

PŘÍKLAD VÝSLEDKŮ

Rostlina	Typ tkáně	Koncentrace (ng/µl)
Sója- 100 mg	semeno	5-12 (PLA) / 50-80 (PLB)
Rýže- 20 mg	semeno	5-8 (PLA) / 15-25 (PLB)
<i>Arabidopsis</i> - 100 mg	list	2-5 (PLA) / 5-7 (PLB)
Rajče- 100 mg	list	20-40 (PLA)
Kukuřice- 100 mg	list	10-15 (PLA) / 25-60 (PLB)
<i>Tectaria</i> - 100 mg	list	5-10 (PLA)
<i>Aspidistra</i> - 100mg	list	3-6 (PLA)
<i>Pharius</i> - 100 mg	list	20-25 (PLA) / 50-100 (PLB)
Zázvor- 100 mg	list	3-8 (PLA) / 20-25 (PLB)

PROTOKOL

Chcete-li provést extrakci, spusťte přístroj SaMag-12/24, otevřete dvířka a postupujte podle pokynů uvedených v uživatelské příručce SaMag v kapitole 2.3 "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 zkumavky se vzorky do stojánu pro vzorky
 7. Vložte 1,5 ml Eluční zkumavku(y) do stojánu pro vzorky, s otevřeným víčkem
 8. V biohazardním boxu napipetujte 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. Pomocí čárového kódu vyberte protokol soupravy pro extrakci rostlinné DNA, příslušný počáteční objem a objem eluce (doporučené hodnoty jsou 400 µl pro objem vzorku a 50 µl pro objem eluce).
- 12 b. V případě použití SaMag-12 ver. 3.x EVO vyberte pomocí dotykového rozhraní sadu pro extrakci rostlinné DNA (kód 2014).**

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

DNA izolovaná pomocí kitu SaMag Plant DNA Extraction Kit je stabilní nejvýše 1 rok při teplotě -20°C, pro dlouhodobé skladování uchovávejte DNA při teplotě -70°C.

*** NIKDY NEZAPOMEŇTE VLOŽIT REAKČNÍ NÁDOBKY 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