

Uživatelská příručka pro izolační soupravy SaMag

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

▪ SaMag Total RNA/DNA Extraction Kit (SM015)

Typ vzorku	Objem vzorku (množství výchozího materiálu)	Eluční objem
Plná krev	200-400 μl * (WBC okolo 10^6)	50-200 μl **
Mononukleární buňky periferní krve	Až 50 μl (suspenze 200 μl s puřrem RL)	
Tkáň	10-40 mg (lyzovaná a v suspenzi s puřrem RL)	
Kultury buněk	200-400 μl suspenze primárních nebo kultivovaných buněk	
Kontroly / Interní kontrola	Přidejte kontroly/Interní kontrolu během extrakce, jestliže je třeba analýza následného procesu	

* u krevních buněk je třeba před extrakcí provést manuální RBC lýzu

** po izolaci ihned uskladněte RNA/DNA při teplotě -60°C až -80°C , nedoporučujeme opakovaně rozmrazovat



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

SaMag Total RNA/DNA Extraction Kit

NÁZEV

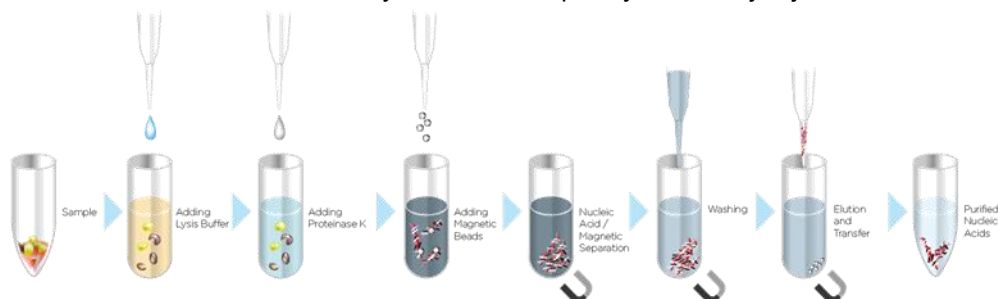
SaMag Total RNA/DNA Extraction Kit

POUŽITÍ

Souprava SaMag Total RNA/DNA Extraction Kit je navržena pro použití s automatickým izolátorem nukleových kyselin SaMag-12/24 pro extrakci celkové RNA/DNA z plné krve, krevních buněk, zvířecí tkáně, tkáně nebo kultivovaných buněk.

PRINCIP TESTU

Proces extrakce se skládá z kroků lýza, navázání, 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);
- RL A pufr, 25 ml;
- RL B pufr, 25 ml;
- Kolonka s filtrem (Filter column), 50 ks;
- Sběrná zkumavka (Collection tube), 50 ks;
- List s čárovými kódy, 1 list;
- Proteináza K, 10 mg/ml (1 ml)

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

POTŘEBNÉ REAGENCIE, KTERÉ NEJSOU SOUČÁSTÍ SOUPRAVY

Reagencie v následující tabulce jsou potřebné, ale nejsou součástí dodávaného kitu Total RNA/DNA:

Činidlo	Popis	Příprava
β-mercaptoethanol (β-ME)	β-ME redukuje disulfidové vazby, nevratně denaturuje a eliminuje RNázu během lýzy buněk	Přidejte 10 μl β-ME na 1 ml RL lyzačních pufrů*, můžete jej skladovat při pokojové teplotě nanejvýš 1 měsíc
Lyzační pufr na červené krevní buňky	Lyzuje erythrocyty v plné krvi	10xRBC lyzační pufr (100 ml) 8,29 g NH ₄ Cl (1,5M)
(RBC lyzační pufr)	(lýza erythrocytů (RBC))	1 g KHCO ₃ (100mM) 0,0372 g Na ₂ EDTA (10mM) Upravte pH na 7,2-7,4 pomocí HCl 0,2 mm filtrovaný, skladujte 6 měsíců při teplotě +4°C Před použitím naředte čerstvý 10x
DNáza	Odstraňuje DNA kontaminaci	Novagen RNase-free DNase I (69182-3CN)
10x DNase pufr	Odstraňuje DNA kontaminaci	0,5M Tris-HCl 25mM MgCl ₂ 5mM CaCl ₂

* RL pufrы jsou pufrы RLA a RLB. S β-ME pracujte v digestoři a ve vhodném ochranném oděvu.

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	Prázdna	
well-2	Lyzační pufr 1	720 μl
well-3	Vazebný pufr 1	1000 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	RNase-free water	1000 μl
well-9	RNase-free water	1000 μl
well-10	DNase pufr	1000 μl

SKLADOVÁNÍ

Souprava SaMag Total RNA/DNA Extraction by měla být skladována při pokojové teplotě (+15-25°C). Reagenční kazety chraňte před mrazem. Souprava je stabilní do data expirace při dodržení podmínek. Po izolaci RNA/DNA ihned uchovejte při teplotě -60°C až -80°C, nedoporučujeme opakované rozmrazování. Pro následující analýzu vždy pracujte s RNA/DNA na ledu. Pufrы RL A a RL B skladujte při +2-8°C.

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.
- Vyhnete 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.

ODBĚR VZORKŮ

Plná krev

1. Použijte čerstvý vzorek plné krve odebraný do 4 hodin, chlazený. Mražená krev není vhodná. Vzorek krve by měl být odebrán do zkumavky s antikoagulantem, nejlépe EDTA, mohu být použity i jiné jako je citrát nebo ACD.
2. Pro optimální výsledky by měly být krevní vzorky zpracovány co nejdříve po odběru a uchovávány při teplotě +2-8°C.
3. Před extrakcí proveďte lýzu erytrocytů (RBC).
4. Pokud použijete vzorky plné krve, které mají extrémně vysoké WBC (více než 10000/ μ l) nebo koncentrované PBMCs (mononukleární buňky) doporučujeme snížit vstupní objem pro izolaci (WBC menší než 5×10^6).

Tkáň

1. Aby se zabránilo degradaci intracelulární RNázou, je důležité, aby byla tkáň buď zmrazena v kapalném dusíku a skladována při teplotě -70°C, nebo zpracována okamžitě po vyříznutí.
2. Použití RNA stabilizačního činidla (např. RNA později) k ošetření tkáně je další možností ochrany RNA, pokud vzorek nemůže být okamžitě zamrazen. Zmrazené tkáně by neměly být během manipulace rozmrazeny (např. při vážení), doporučuje se udržovat vzorek na ledu během řezání nebo homogenizace s pufrem RLA.
3. Po homogenizaci použijte kolonku s filtrem (dodávaná s kitem) pro odstranění nerozpustného a viskózního lyzovaného materiálu.

Buňky

1. Buňky nebo izolované krevní buňky mohou být shromažďovány jako pelety a buď zmrazeny v kapalném dusíku a uchovány při teplotě -70°C nebo okamžitě zpracovány. Pro extrakci rozpustíte pelet v RLA pufru.
2. Je také možné, vzorky skladovat při teplotě -70°C v pufru RLA po narušení a homogenizaci. Vzorky mražené touto cestou jsou stabilní několik měsíců.

POZNÁMKA: je nezbytné použít správné množství výchozího materiálu, aby se dosáhlo optimálního výtěžku a čistoty RNA / DNA (viz tabulka níže). Použití nadbytečného množství není užitečné při extrakci celkové RNA / DNA.

VÝCHOZÍ MATERIÁL

Typ vzorku	Objem vzorku (množství výchozího materiálu)	Eluční objem
Plná krev	200-400 µl* (WBC okolo 10 ⁶)	50-200 µl**
Mononukleární buňky periferní krve (PBMCs)	Až 50 µl (suspenze 200 µl s pufrem RL)	
Tkáň	10-40 mg (lyzovaná a v suspenzi s pufrem RL)	
Kultury buněk	200-400 µl suspenze primárních nebo kultivovaných buněk	
Kontroly / Interní kontrola	Přidejte kontroly/Interní kontrolu během extrakce, jestliže je třeba analýza následného procesu	

* u krevních buněk je třeba před extrakcí provést manuální RBC lýzu

** po izolaci ihned uskladněte RNA/DNA při teplotě -60°C až -80°C, nedoporučujeme opakovaně rozmrazovat

PŘÍPRAVA VZORKU (PŘEDBĚŽNÁ ÚPRAVA)

Vzorek	Postup
Plná krev	<ol style="list-style-type: none"> 1. připravte 1 čerstvý RBC lyzační pufr 2. přidejte 2 objemy ledově studeného RBC lyzačního pufru k jednomu objemu vzorku krve 3. převraťte 3-5 krát, inkubujte na ledu 10-15 minut 4. centrifugujte při otáčkách 1000 x g 10 minut při teplotě +4°C 5. odstraňte supernatant 6. rozpusťte pelet ve 220 µl RLA pufru 7. přidejte 20 µl proteinázy K 8. použijte 200 µl pro izolaci
Mononukleární buňky periferní krve (PBMCs)	<ol style="list-style-type: none"> 1. resuspendujte PBMCs ve 220 µl RLA pufru 2. promíchejte vortexováním 10 sek. 3. přidejte 20 µl proteinázy K 4. použijte 200 µl pro izolaci
Tkáň	<ol style="list-style-type: none"> 1. přidejte 220 µl RLA pufru ke tkáni; ujistěte se že je vzorek zcela ponořen v pufru. Zvyšte množství vstupního pufru RLA až na 440 µl, pokud je vzorek tkáň velký. 2. homogenizujte tkáň homogenizérem 3. stočte lyzát 4. přeneste celý lyzát do kolonky s filtrem umístěné ve sběrné zkumavce 5. centrifugujte při otáčkách 1000 x g, 5 minut při teplotě +4°C 6. přidejte 20 µl proteinázy K 7. přeneste 200-400 µl do zkumavky na vzorek 8. proveďte izolaci
Kultivované buňky	<p>(Protokol 1) Suspenze kultury</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. odeberte buněčnou kulturu 2. centrifugujte při otáčkách 1000 x g, 5 minut při teplotě +4°C 3. odeberte celý supernatant 4. resuspendujte buněčný pelet s 220 µl RLA pufrem 5. promíchejte vortexováním 10 sek. 6. přidejte 20 µl proteinázy K 7. použijte 200 µl pro izolaci <p>(Protokol 2-1) Jednovrstvá kultura</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. trypsinizujte buňky 2. odeberte buňky do PBS 3. centrifugujte při otáčkách 300 x g, 5 minut při teplotě +4°C 4. odeberte supernatant 5. resuspendujte pelet s 220 µl RLA pufrem 6. promíchejte vortexováním 10 sek. 7. přidejte 20 µl proteinázy K 8. použijte 200 µl pro izolaci

	(Protokol 2-2) Jednovrstvá kultura 1. seškrabte buňky do 220-400 µl RLA pufru 2. promíchejte vortexováním 10 sek. 3. použijte 200-400 µl pro izolaci
DNA-free RNA extrakce	1. po programu extrakce celkové RNA/DNA 2. přidejte 2U DNázy I (není součástí kitu) do eluátu 3. inkubujte 10 minut při teplotě 37°C 4. přeneste směs do nové sterilní zkumavky na vzorek 5. pokračujte v novém protokolu "Total RNA/DNA" pro zahájení extrakce

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 soupravy Total RNA/DNA Extraction kit, požadovaný počáteční objem, eluční objem (navrhované hodnoty jsou 200 µl pro vstupní objem, 50 µl pro eluční objem)
- 12 b. V případě použití SaMag-12 ver. 3.x EVO vyberte pomocí dotykového rozhraní sadu pro extrakci celkové RNA (kód 2015).**

DCNBâA?5. J'd pUX 'dci yjhgUAU !%&j Yf"" 'l '9JC 'j mVYfH'j 'fcnl fUbfXchm c j f'cVfUnc j _mímd'gltc'Ubi ' &a `".

*** 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**

DNA extrahovaná se soupravou SaMag Total RNA/DNA Extraction Kit musí být ihned skladována při teplotě -60 až -80°C, nedoporučuje se opakované rozmrazování a zmrazování.



Sacace Biotechnologies Srl

via Scalabrini, 44 – 22100 – Como – Italy Tel +390314892927 Fax +390314492493

mail: info@sacace.com web: www.sacace.com