

MagPurix Bacterial DNA Extraction Kit

Kat. č. ZP02006

Doba zpracování: 55-65 minut pro MagPurix 12S

55-75 minut pro MagPurix 24

Použití Souprava MagPurix Bacterial DNA Extraction Kit je určena pro izolátor MagPurix, pro extrakci DNA z forenzních vzorků

Aplikace Nukleové kyseliny extrahované pomocí soupravy MagPurix Forensic DNA Extraction Kit MagPurix Bacterial DNA Extraction Kit lze použít v řadě následných aplikací včetně: PCR, qPCR, Sekvenování (NGS), Microarray, RFLP, Southern Blot Analýza

Počet testů 48 extrakcí

Složky soupravy

Složky soupravy	ZP02010-48
Reagenční kazeta	48 ks (6x8)
Reakční komora	48 ks (6x8)
Držák hrotu	48 ks (6x8)
Špička s filtrem	50 ks (50x1)
Prorážecí hrot	50 ks (50x1)
Zkumavka na vzorky (2 ml)	50 ks (50x1)
Eluční zkumavka (1,5 ml)	50 ks (50x1)
BL2 pufr	1ks (25 ml)
Čárové kódy programu	1 ks
Průvodce	1 ks

Obsah reakční kazety



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

jamka 1	Roztok proteinázy K	40 μ l
jamka 2	Lyzační pufr 3	720 μ l
jamka 3	Vazebný pufr 1	720 μ l
jamka 4	Roztok magnetických partikulí	800 μ l
jamka 5	Promývací pufr 1B	1000 μ l
jamka 6	Promývací pufr A	1000 μ l
jamka 7	Promývací pufr B	1000 μ l
jamka 8	Eluční pufr 1	1000 μ l
jamka 9	Eluční pufr 2	1000 μ l
jamka 10	prázdná	

Skladování

Souprava MagPurix Bacterial DNA Extraction Kit by měla být skladována při pokojové teplotě (15-25° C). Kazety s reagensy nikdy nezamrazujte. Za těchto podmínek jsou soupravy stabilní po dobu 18 měsíců.

Izolované purifikované nukleové kyseliny skladujte před provedením následné analýzy při 4°C (krátkodobě, méně než 10 dní) nebo ji rozdělte na části a uchovávejte při -70 ° C (dlouhodobě).

Výchozí materiál

- Bakteriální peleta / kolonie z kultury, tělesné tekutiny bez buněk, kapalná transportní média, moč, životní prostředí (voda, půda atd.)
- Pro použití s tkání fixovanou parafinem, doporučujeme extrahovat DNA pomocí extrakční soupravy MagPurix FFPE DNA (ZP02009)
- Pro použití s tkání, doporučujeme použít soupravu MagPurix Tissue DNA Extraction
- Typy a množství výchozího materiálu pro použití v purifikačních postupech bakteriální DNA MagPurix jsou uvedeny v následující tabulce,

Typ vzorku	Cíková NK	Objem vzorku (objem výchozího materiálu)	Eluční objem
Bakteriální peleta	Genomová DNA	200-400 μ l / až 10^9 bakterií (okolo $OD_{600}=3$)	50-300 μ l
Bakteriální kolonie		200-400 μ l/1-3 kolonie	
Tkáň		200-400 μ l/1-30mg	
Moč		200-400 μ l/5-50ml moči	
Tělesné tekutiny bez buněk		200-400 μ l/tekutiny	
Kapalná transportní média		200-400 μ l/média	
POZNÁMKA: Před extrancí upravte objem vzorku na požadovanou hodnotu pomocí BL2B pufru			

Příprava vzorku

- Požadavky na přípravu vzorků jsou velmi závislé na typu výchozího materiálu. Kvůli rozdílům v konzistenci a viskozitě mohou i podobné typy vzorků vyžadovat různou manipulaci
- Pufr BL2B je určen na lýzu bakteriálních buněčných stěn * (dodává se v soupravě), použije se k resuspendaci bakteriální pelety před extrakcí procesu

* Pro mycobacterium spp. (Např. MTB) použijte pro lýzu bakteriální buněčné stěny pufr BL3 (pufr BL3 je dodáván v soupravě extrakce ZP02008 MagPurix TB DNA)

Tabulka:**Příprava vzorku pro extrakci bakteriálních nukleových kyselin**

Typ vzorku	Procedura
Viskózní vzorky Např. BAL, sputum nebo ostatní mukózní vzorky	Doporučená předběžná úprava: zkapalnění <ol style="list-style-type: none">1. Připravte čerstvý zásobní roztok DTT ke zkapalnění * (např. 5x koncentrace DTT koncentrace je asi 0,75%)2. Upravte konečnou koncentraci DTT ve vzorku na 0,15% přidáním zásobního roztoku DTT.3. Inkubujte vzorek (např. za stálého třepání při 850 otáčkách za minutu po dobu 30 minut při teplotě 37 ° C), dokud se nedá snadno pipetovat.4. Centrifugujte bakterie do pelety při 14 000 x g po 10 minut5. Odstraňte supernatant a přidejte k peletě 220µl pufru BL2B6. Přeneste 200 µl do vzorkové zkumavky (dodává se v soupravě) <p>* Zkapalnění by mohlo být provedeno použitím jiných roztoků, jako je NALC (N-acetyl-L-cystein) -NaOH nebo jiné látky, které mohou trávit slizniční materiál</p>
U velkých objemných vzorků tekutin, které mají nízké nebo neznámé bakteriální zátěže např. moč, voda shromážděná z bazénu / říčního potoka / věže	Doporučená předběžná úprava: odstředění <ol style="list-style-type: none">1. Centrifugujte vzorek po dobu až 10 minut při 20 000 × g, abyste koncentrovali bakteriální buňky v peletě2. Vyhoďte supernatant a resuspendujte peletu v 220 µl BL2B*3. Přeneste 200 µl do zkumavky na vzorky (dodává se v soupravě) <p>* Pokud byla v peletě písek nebo jiná viditelná částice, znovu odstředte po ošetření pufrům BL2B nebo odfiltrujte prach.</p>
Pro bezbuněčné tělesné kapliny např. CSF, BAL, aspiráty	Doporučená předběžná úprava: Metoda 1 - odstředění <ol style="list-style-type: none">1. Centrifugací stočte bakterie do pelet při 14000 x g po dobu 10 min2. Resuspendujte bakteriální pelety v 220 µl pufru BL2B3. Přeneste 200 µl suspenze do zkumavky na vzorky (dodává se v soupravě)

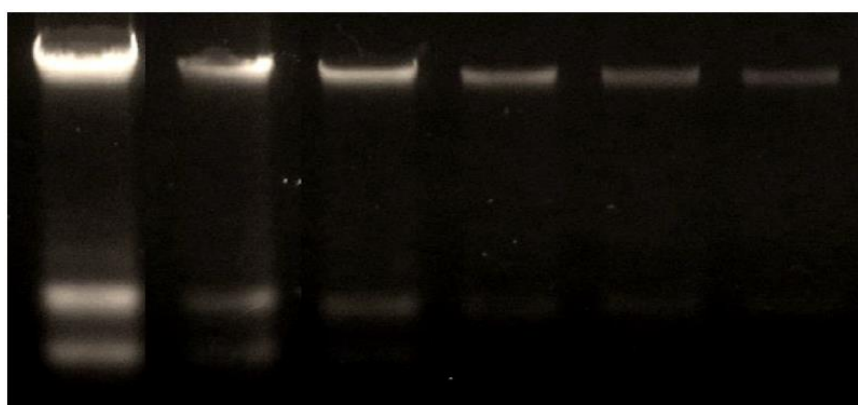
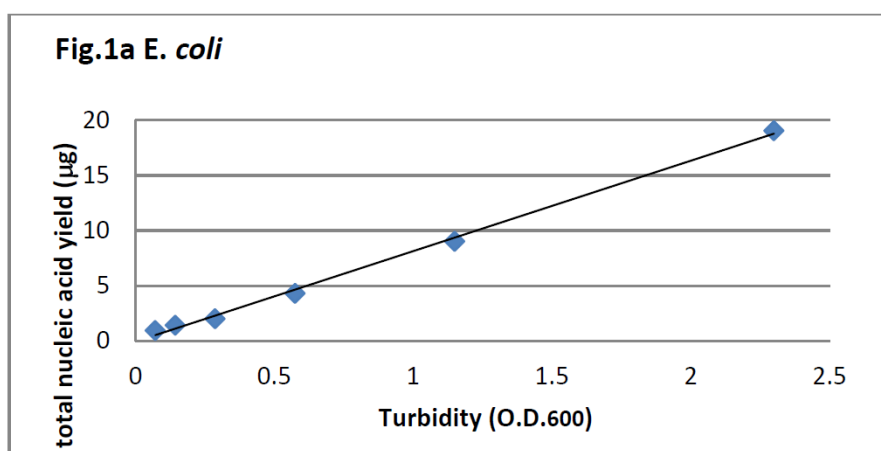
	<p>Metoda 2 - Bez odstředění</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Přeneste 200 µl vzorku do 1,5 ml centrifugační zkumavky 2. Přidejte 200 µl pufru BL2B do vzorku (1: 1) 3. Míchejte pomocí vortexu po dobu 5-10 s 4. Přeneste 400 µl vzorku do zkumavky na vzorky (dodává se v soupravě)
<p>Stěry Např. oční, nasální, hrtanové nebo ostatní stěry</p>	<p>Metoda 1</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Vzorky odeberte a přeneste do 2 ml PBS obsahujícího běžný fungicid. Inkubujte 30 minut při pokojové teplotě 2. Bakteriální pelety získáte centrifugujíc při 14000 xg po dobu 10 minut 3. Resuspendujte bakteriální pelety v 220 µl pufru BL2B (dodává se v soupravě) 4. Přeneste 200 µl suspenze do zkumavky pro vzorky (dodává se v soupravě) <p>Metoda 2 - bez odstředění</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Tampon vzorku umístěte do 440 µl pufru BL2B, inkubujte 30 minut při pokojové teplotě 2. Přeneste 400 µl do zkumavky pro vzorek
<p>Pro některé gram-pozitivní bakteriální druhy. Zvláště u vzorků, které obsahují částice. např. stolice</p>	<p>Doporučená předběžná úprava: Mechanická homogenizace</p> <p>Postupujte podle pravidelných postupů homogenizace v laboratoři.</p> <p>Pro některé typy vzorků lze výtěžnost DNA zlepšit provedením tohoto kroku homogenizace před přidáním pufru BL2B a proteínasy K</p>
<p>Izolace genomové DNA ze suspenze bakteriální kultury</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Napipetujte 1 ml bakteriální kultury do 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky a centrifugujte při 5000xg po dobu 5 minut 2. Vyhodte supernatant 3. Přidejte 220 µl pufru BL2B do pelet a promíchejte vortexem po dobu 5-10 sekund 4. Přeneste 200 µl suspenze do zkumavky pro vzorky (dodává se v soupravě)
<p>Izolace genomové DNA z bakteriální kolonie na misce</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Přeneste 1-3 bakteriální kolonie z kultivační desky s inokulační smyčkou a suspendujte v 220 µl BL2B za intenzivního míchání 2. Přeneste 200 µl suspenze do zkumavky pro vzorek

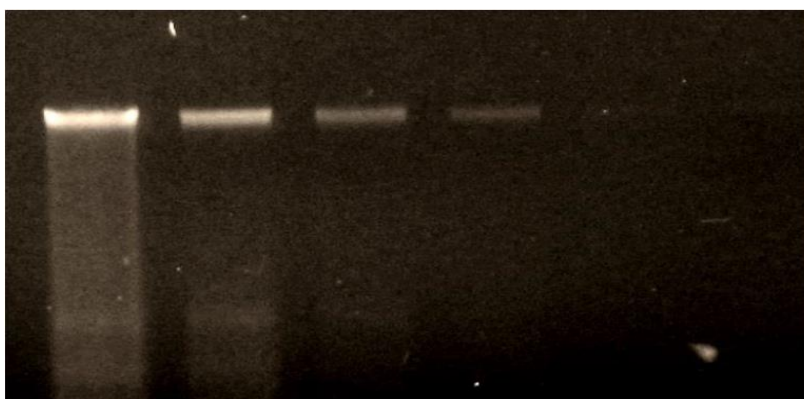
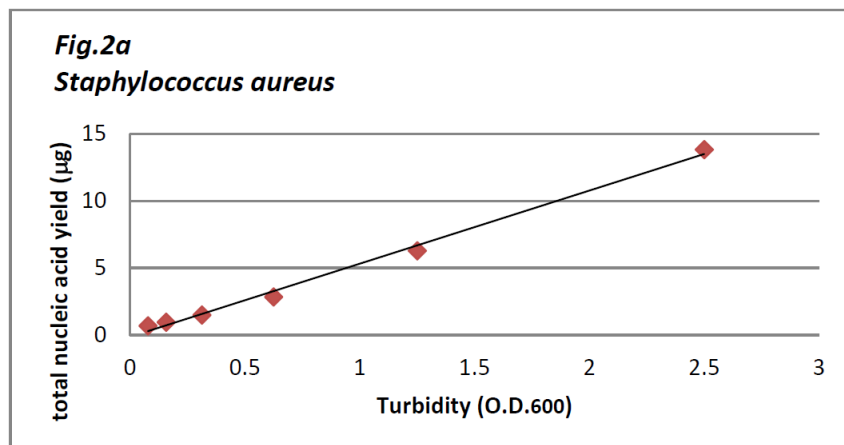
Inaktivace patogenních mikroorganismů	Doporučená předběžná úprava: převaření <ol style="list-style-type: none"> 1. Inkubujte vzorky při 95 ° C po dobu 10 minut 2. Krátce odstředte, abyste získali úplný objem vzorku ve spodní části zkumavky 3. Nechte vzorky vychladnout nebo ochladit na ledu a potom pokračujte podle následujících kroků podle typu vzorku
Výtěžek purifikované DNA	Výtěžky DNA závisí na typu vzorku, počtu bakterií ve vzorku a protokolu použitém pro čištění DNA

Výsledek

(1) Škálovitost

Souprava MagPurix Bacterial DNA Extraction kit byla použita pro extrakci NK z kultur *Escherichie coli* (ATCC25922) a *Staphylococcus aureus* (ATCC27154) v LB broth médiu při různé bakteriální hustotě (změřte optickou hustotu při 600 nm, OD₆₀₀). Bylo použito 200 µl bakteriální kultury pro extrakci a definován eluát v objemu 100 µl. Celkový výtěžek nukleové kyseliny s různou bakteriální hustotou byl měřen spektrofotometrem Nanodrop 2000 UV-Vis (obr. 1a a 2a) a analyzován elektroforézou na 1% TAE agarosovém gelu (obr. 1b a 2b). Výsledek ukázal, že extrakce nukleových kyselin v gram-negativních (*E. coli*) a gram-pozitivních (*S. aureus*) měla vynikající škálovitost.

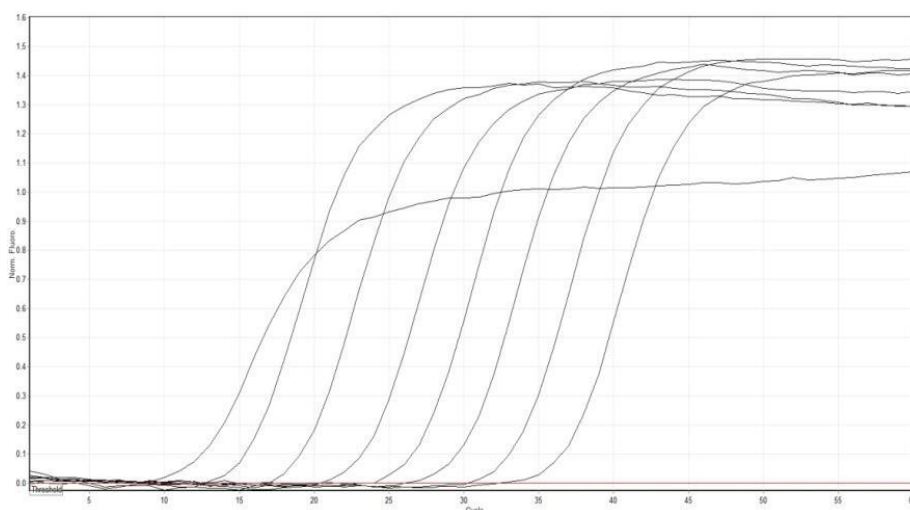




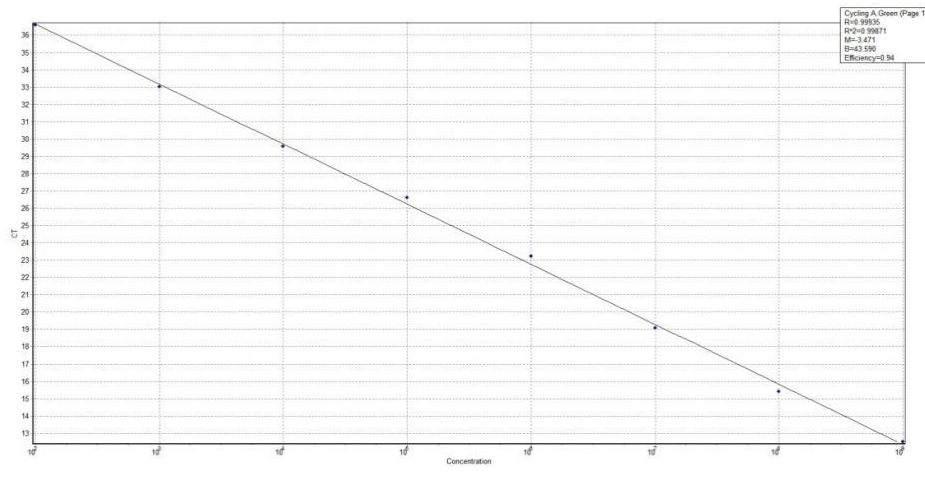
(2) Citlivost

Bylo připraveno sériové ředění kultury *Staphylococcus aureus* (ATCC27154) v rozmezí 10⁹-10¹ kopií / ml). 200 µl vzorku byl extrahován a eluován do 100 µl. 25 µl eluátu bylo použito pro SYBR Green real-time PCR reakci, která detekuje specifický gen *Staphylococcus aureus*. Při detekci kontaminace (asi 5 kopií na PCR reakci) lze detekovat až 20 kopií (přibližně 10² kopií / ml bakterie ve vzorku), což dokazuje vynikající citlivost a linearitu izolačního postupu (obr. 3a a 3b)

Obr. 3a



Obr. 3b



Kontroly / interní kontrola

Použití vhodných kontrol pro následnou analýzu:

Typ	Popis	Umístění
Pozitivní kontrola	Použití vzorku pozitivního pro cíl	Vložte do zkumavky pro vzorek
Negativní kontrola	Použití vzorku negativního pro cíl nebo vodu (NTC)	Vložte do zkumavky pro vzorek
Interní kontrola (IC)	Použití definovaného množství kontroly	Umístěte do zkumavky na vzorky nebo do kulaté jamky reakční komory

Kontrola kvality

V souladu se systémem řízení kvality společnosti ZINEXTS, který je certifikován podle ISO, každá řada soupravy MagPurix Bacterial DNA Extraction Kit je testována na základě předem stanovených specifikací pro zajištění konzistentní kvality produktu.