

MagPurix Tissue DNA Extraction Kit

Kat. č. ZP02004-48

Doba zpracování: 45-55 minut pro MagPurix 12

45-60 minut pro MagPurix 24

Použití Souprava MagPurix Tissue DNA Extraction Kit je určena pro izolátor MagPurix, pro extrakci genomové DNA z 10-400µl z řady vzorků, jako tkáň, stěr a krevní vzorek.

- **Pro extrakci z FFPE fixovaných vzorků je doporučen extrakční kit: ZP02009 MagPurix FFPE DNA Extraction Kit**

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

Počet testů 48 extrakcí

Složky soupravy

Složky soupravy	ZP02001-48
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 (2ml)	50 ks (50x1)
Eluční zkumavka (1,5 ml)	50 ks (50x1)
Proteináza K (10mg/ml)	1 ks (1ml)
BL2 Pufr	1 ks (25ml)
Čárové kódy programu	1 ks
Průvodce	1 ks

Obsah reakční kazety



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

Skladování

Souprava MagPurix Tissue DNA Extraction Kit by měla být skladována při pokojové teplotě (15-25° C). Kazety s reagenциemi 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

Typy a množství výchozího materiálu pro použití s izolační soupravou MagPurix Tissue DNA jsou uvedeny v následující tabulce,

TY vzorku	Požadovaná nukleová kyselina	Objem vzorku (množství výchozího materiálu)	Eluční objem
Tkáň	DNA	100-400 µl/10-40 mg	50-300µl
Usušené stěry (např. bukální stěr)		100-400µl/1 stěr nebo tampón (přidejte BL2 a proteinázu K k 100 - 400µl na extrakci)	
Usušený krevní vzorek			
Kontrola/Optimální vnitřní kontrola*	Přidejte kontroly / interní kontroly do extrakční procedury, pokud potřebná následná analýza (# viz kontrola / vnitřní kontrola na straně 34)		

* Disk s průměrem 3 mm, vystřížený z filtračního papíru se vzorkem suché krve, obsahuje bílé krvinky z přibližně 5 µl plné krve; doporučujeme použít jako výchozí materiál 4 takové disky

Výtěžek purifikované DNA

- Výtěžek DNA závisí na typu vzorku, počtu jaderných buněk ve vzorku a protokolu použitém pro izolaci DNA
- Tabulka uvedená níže uvádí výtěžky DNA získané z různých typů vzorků s použitím postupů extrakce MagPurix.

Tabulka: Výtěžek izolace DNA z různých vzorků

Typ vzorku	Množství vzorku	Typický výtěžek DNA
Kosterní sval	200 µl (40mg rozložené tkáně)	Až 9 µg
Srdeční tkáň	200 µl (20mg rozložené tkáně)	Až 12 µg
Slezina	200 µl (10mg rozložené tkáně)	Až 27 µg
Plíce	200 µl (10mg rozložené tkáně)	Až 17 µg
Ledviny	200 µl (10mg rozložené tkáně)	Až 18 µg
Játra	200 µl (10mg rozložené tkáně)	Až 40 µg
Buňky v bukálním stěru	1 stěr	1-5 µg
Suchá krev	1x3 mm disk	0,2-0,5 µg

- 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. Níže uvedené kroky popisují některé doporučení pro zpracování primárních vzorků.

Příprava vzorku

- Chcete-li extrahovat DNA z fixovaných vzorků (FFPE), použijte prosím MagPurix FFPE DNA Extraction Kit (ZP02009)
- Efektivní narušení a homogenizace vzorku materiálu je nezbytná pro izolaci genomové DNA z tkáně. Na druhé straně příliš rozsáhlé rozrušení a homogenizace povede k fragmentaci molekul genomové DNA s vysokou molekulovou hmotností
- Vždy čerstvě připravte tkáňový lyzát a okamžitě jej zpracujte. Lze uchovávat při teplotě -15 až -20 ° C nebo nižší, pokud má být izolace DNA odložena
- Při práci s tkání bohatou na RNA (např. tkáně s vysokou expresí genů, jako jsou játra a nádor), přidejte RNázu po inkubaci s Proteinázou K pro degradaci RNA a zvýšení výtěžku DNA.

Pro pevné živočišné tkáně

1. Přenos tkáně	<p>Přenešte tkáň do 1,2ml centrifugační zkumavky:</p> <table border="1"><thead><tr><th>Č.</th><th>Typ vzorku*</th><th>Doporučené množství vzorku**</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Srdce</td><td>20mg</td></tr><tr><td>2</td><td>Sval</td><td>40mg</td></tr><tr><td>3</td><td>Ostatní tkáně</td><td>10mg</td></tr></tbody></table> <p>* Nařezejte tkáň na malé kousky, nebo použijte homogenizátor – zvýšíte tím efektivitu lýzy tkáně a zlepšíte výtěžek DNA ** Pokud použijete větší kvanta, než doporučená, bude třeba zvýšit množství použitého BL2 Pufru a Proteinázy K (To ale jen v případě, že tkáň nebude lyzována kompletně)</p>	Č.	Typ vzorku*	Doporučené množství vzorku**	1	Srdce	20mg	2	Sval	40mg	3	Ostatní tkáně	10mg
Č.	Typ vzorku*	Doporučené množství vzorku**											
1	Srdce	20mg											
2	Sval	40mg											
3	Ostatní tkáně	10mg											
2. Přidat BL2 Pufr	Přidejte 220-440 µl dodaného BL2 pufru. Ujistěte se, že tkáň je v pufru zcela ponořena.												
3. Přidat Proteinázu K	Přidejte 20 µl Proteinázy K a směs jemně promíchejte												
4. Inkubace	<p>Inkubujte při teplotě 55 ° C v protřepávané vodní lázni nebo termomixeru (1000r.p.m.), dokud není tkáň zcela lyzována.</p> <p>Poznámka</p> <ol style="list-style-type: none">1. Doba lýzy se liší v závislosti na typu tkáně. Lýza je obvykle ukončena za 1-2 hodiny. Je také možné nechat lýzu probíhat přes noc.2. Použijte tepelný blok a během inkubace několikrát promíchejte												
5. Odstranění RNA RNázou (volitelné)	<ol style="list-style-type: none">1. Inaktivujte Proteinázu K zvýšením teploty na 70°C po 10min2. Přidejte RNázu A (není součástí dodávky) do lyzátu, a inkubujte 10 minut												
6. Centrifugace a přenos	<p>Odstředte a přenešte čistý supernatant do zkumavky. Pro úpravu objemu vzorku použijte BL2 Pufr. Pokračujte v extrakci DNA z tkáně</p> <p>Volitelné Použití filtrační kolony (ZA030118, není součástí dodávky) pro odstranění zbytkových nečistot a mukózní tkáně před extrakcí DNA, může podstatně zvýšit výtěžek DNA (20-100%)</p>												

Pro vzorky stěrů

1. Odstřížení	Opatrně vystříhnete nebo rozlomte koncovou část tamponu nebo kartáčku do 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky pomocí vhodného nástroje (např. nůžek)
2. Přidat BL2 Pufř	Přidejte 220-440 µl dodaného BL2 pufřu. Ujistěte se, že tkáň je v pufřu zcela ponořena.
3. Přidat Protenázu K	Přidejte 20 µl Protenázy K a směs jemně promíchejte Poznámka Při zpracování vzorků z kartáčků pro bukalní stěry zkumavka, krátce odstředte (při 10000 x g po dobu 30 sekund), aby se kartáček klesl na dno zkumavky.
4. Inkubace	Inkubujte při teplotě 55 ° C v protřepávané vodní lázni nebo termomixeru (1000r.p.m.). Poznámka <ol style="list-style-type: none">1. Doba lýzy se liší v závislosti na typu tkáň. Lýza je obvykle ukončena za 1-2 hodiny. Je také možné nechat lýzu probíhat přes noc.2. Použijte tepelný blok a během inkubace několikrát promíchejte
5. Centrifugace	Krátce odstředte, abyste stáhli kapky z víčka zkumavky
6. Odstranění nástroje	Odstraňte ze zkumavky tampon nebo kartáček. Použitím pinzety zmáčkněte tampón nebo kartáček opakovaně o vnitřní stěnu zkumavky, abyste získali maximální objem vzorku. Objem vzorku by měl zhruba odpovídat nastavenému objemu (200-400 µl) – případně dorovnejte BL2 Pufřem.
7. Přenos	Přeneste supernatant do reakční zkumavky a pokračujte izolací DNA.

Vzorek zaschlé krve

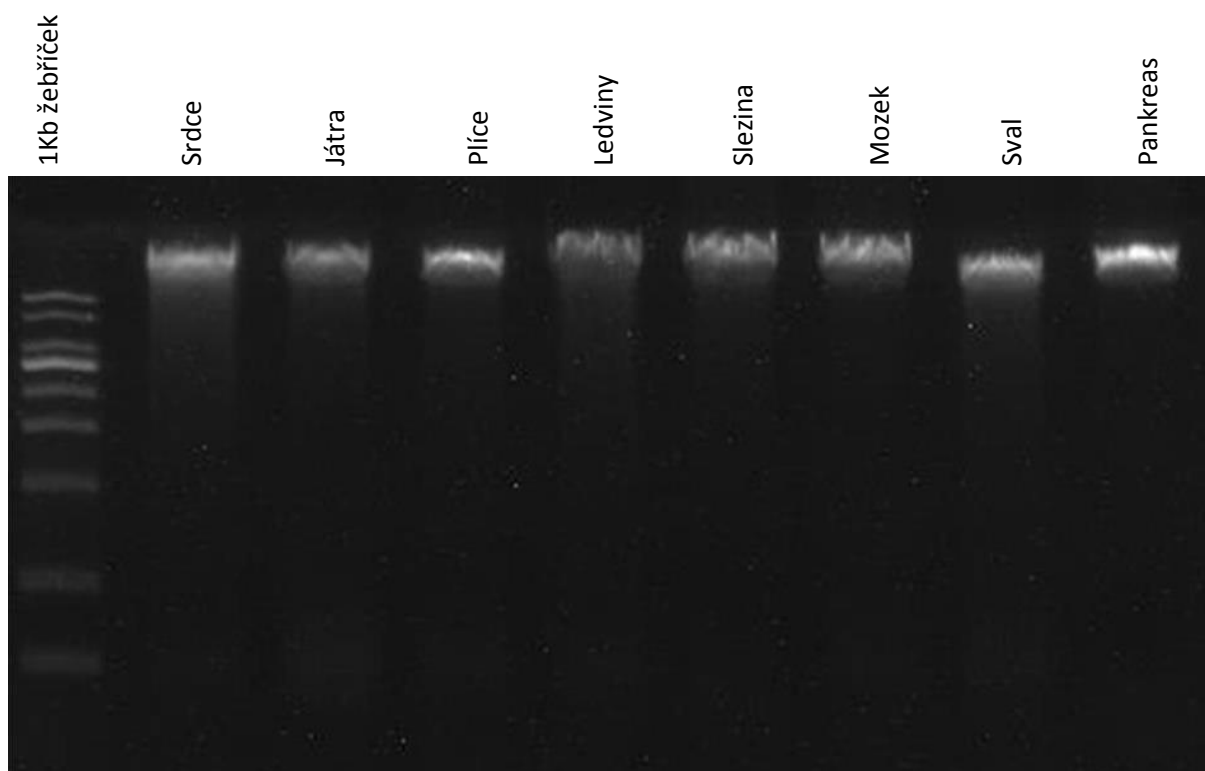
1. Sběr	Naneste 70µl vzorku krve na kroužek označený na filtračním papíru. Nechte krev vyschnout. Poznámka Je možné použít buď neošetřenou krev nebo krev obsahující antikoagulant (např. EDTA, ACD nebo heparin).
2. Odstřížení	Pro každý vzorek zaschlé krve, manuálně vystříhnete, nebo vyražte čtyři kotoučky o průměru cca 3mm
3. Přidat BL2 Pufř	Přeneste vždy čtyři kotoučky do 1,0ml centrifugační zkumavky. Přidejte 220-440 µl dodaného BL2 pufřu.
4. Přidat Protenázu K	Přidejte 20 µl Protenázy K a směs jemně promíchejte
5. Inkubace	Inkubujte při teplotě 55 ° C v protřepávané vodní lázni nebo termomixeru (1000r.p.m.), po dobu 15 minut.
6. Centrifugace	Krátce odstředte, abyste stáhli kapky z víčka zkumavky
7. Přenos	Přeneste 200-400µl supernatantu do reakční zkumavky a pokračujte izolací DNA.

Výsledky

(1) Účinnost

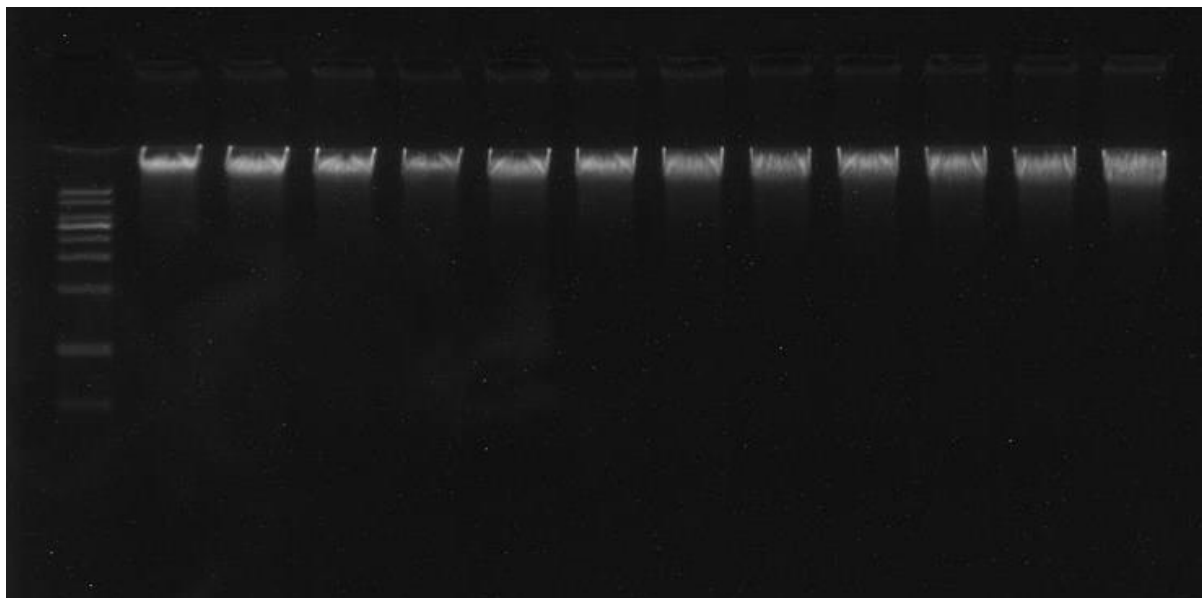
Pro extrakci myších tkání byla použita extrakční souprava MagPurix Tissue DNA Extraction, výsledky byly získány spektrofotometrem Nanodrop 2000 a TAE agarózovým gelem.

Typ tkáně	Celkový výtěžek nukleových kyselin (μg)	Výtěžek DNA (μg) (po ošetření RNázou)
Srdce - 10mg	12-20	6-13
Játra - 10mg	25-40	10-20
Plíce - 10mg	7-15	9-14
Ledviny - 10mg	30-40	20-30
Slezina - 10mg	20-40	15-30
Mozek - 10mg	15-20	12-15
Sval - 10mg	4-8	3-5
Pankreas - 10mg	3-5	3-5
Ocásek - 10mg	7-12	5-10
Ucho - 10mg	15-12	14-20



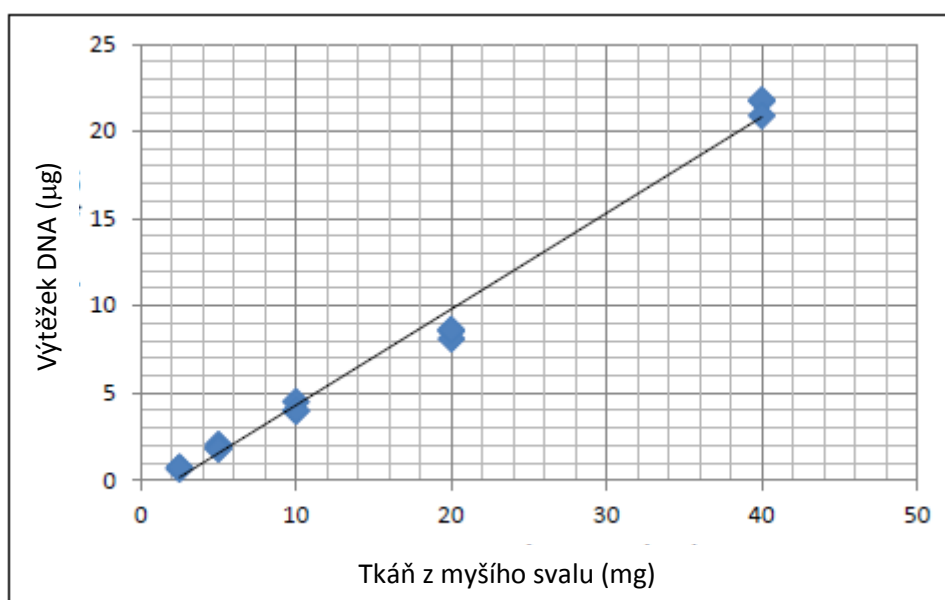
(2) Reprodukovatelnost

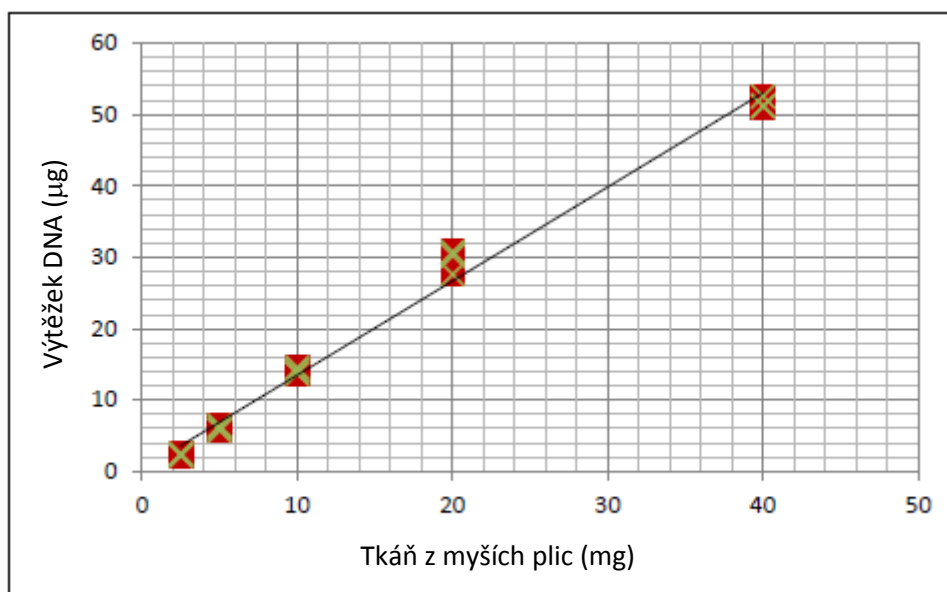
Jako vzorky bylo použito dvanáct 10 mg myší tkáně (plic). Výsledkem analýzy je TAE agarózový gel.



(3) Škálovatelnost

Jako vzorky bylo použito různé množství tkáně myších jater a svalové hmoty. Výsledky analýzy byly hodnoceny spektrofotometrem Nanodrop 2000.





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 Tissue DNA Extraction Kit je testována na základě předem stanovených specifikací pro zajištění konzistentní kvality produktu.