

Instrukcja

Sherlock AX

Zestaw do izolacji genomowego DNA z materiałów o jego śladowej zawartości (plamy krwi, nasienia i śliny, włosy i sierść, tkanki zakonserwowane w parafinie i formalinie, tkanki świeże, krew świeża i mrożona).

Procedura z precypitacją DNA.

numer katalogowy	wielkość
095-25	25 izolacji
095-100	100 izolacji

Produkt przeznaczony wyłącznie do badań naukowych.

Gwarancja

Firma A&A Biotechnology udziela gwarancji na niniejszy produkt.

Firma nie gwarantuje poprawnego działania produktu w przypadku:

- odstępstwa od dostarczonego wraz z produktem protokołu
- braku zalecanego w niniejszym protokole wyposażenia i materiałów
- użycia innych odczynników niż zalecane lub które nie wchodzą w skład produktu
- użycia przeterminowanych odczynników oraz elementów produktu

Skład

składnik	25 izolacji	100 izolacji	przechowywanie
Kolumny Spin 10AX	25 szt.	100 szt.	2–8 °C
Kolumny filtracyjne Filtr 1	25 szt.	100 szt.	15–25 °C
Probówki 2 ml	50 szt.	200 szt.	15–25 °C
L1.4 roztwór lizujący	9 ml	36 ml	15–25 °C
K2 roztwór płuczący	40 ml	160 ml	15–25 °C
K3 roztwór elucyjny	23 ml	92 ml	15–25 °C
Wzmacniacz precypitacji	300 µl	1,2 ml	15–25 °C
TE bufor	1,5 ml	5 ml	15–25 °C
Izopropanol	20 ml	80 ml	15–25 °C
Proteinaza K	600 µl	2 x 1,1 ml	4–8 °C

Pojemność minikolumny do oczyszczania DNA wynosi 10 µg.

Dodatkowy sprzęt i odczynniki

Niezbędne

- Jałowe probówki o pojemności 1,5 ml typu Eppendorf
- Woda jałowa (wolna od nukleaz) (nr kat. 003-075, 003-25)
- DTT (nr kat. 2010-5, 2010-25, 2010-10P)
- 70% etanol
- Heksan / ksylen / 96% etanol (do izolacji z tkanek w parafinie)
- Wortex
- Mikrowirówka
- Inkubator lub termoblok 50 °C (zalecamy Thermomixer firmy Eppendorf)

Opcjonalne

- Bufor Tris (10 mM, pH 8,0)

Przygotowanie materiału

Plamy krwi, nasienia, próbki śliny

1. Przenieść **plamę** lub **próbkę wraz z podłożem** do probówki 1,5 ml typu Eppendorf (nie ma w zestawie).
2. Dodać kolejno po:
300 µl wody jałowej (nie ma w zestawie),
300 µl roztworu lizującego L1.4,
20 µl proteinazy K.
 W przypadku plam z nasienia dodać po **20 µl 1M DTT** (nie ma w zestawie).
3. Worteksować przez **20 s**.
4. Inkubować przez **60 min** w temp. **50 °C**. Podczas inkubacji próbkę należy od czasu do czasu worteksować.
5. Prześć do punktu 1. protokołu izolacji.

Krew świeża lub mrożona

1. Przenieść **300 µl krwi** do probówki 1,5 ml typu Eppendorf (nie ma w zestawie).
Uwaga: W przypadku mniejszej ilości krwi niż 300 µl należy dodać jałowej wody do całkowitej objętości 300 µl.
2. Dodać kolejno po:
300 µl roztworu lizującego L1.4,
20 µl proteinazy K.
3. Worteksować przez **20 s**.
4. Inkubować przez **10 min** w temp. **50 °C**. Podczas inkubacji próbkę należy od czasu do czasu worteksować.
5. Prześć do punktu 1. protokołu izolacji.

Tkanki świeże

1. **10-20 mg** rozdrobnionej **tkanki** (pociętej na fragmenty lub roztartej w ciekłym azocie) umieścić w probówce 1,5 ml typu Eppendorf (nie ma w zestawie).
2. Dodać kolejno po:
300 µl wody jałowej (nie ma w zestawie),
300 µl roztworu lizującego L1.4,
20 µl proteinazy K.
3. Worteksować przez **20 s**.
4. Inkubować przez **1-2 godz.** w temp. **50 °C** (do całkowitego strawienia tkanki). Podczas inkubacji próbkę należy od czasu do czasu worteksować.
5. Prześć do punktu 1. protokołu izolacji.

Tkanki utrwalone w parafinie

1. Przenieść **tkankę w bloczku parafinowym** do probówki 1,5 ml typu Eppendorf (nie ma w zestawie).
2. Dodać taką objętość **ksylenu** lub **heksanu** (nie ma w zestawie), aby tkanka była całkowicie w nim zanurzona.
3. Wymieszać przez odwracanie probówki i poczekać do momentu rozpuszczenia parafiny.
Wirować przez **20 s** przy **10 000 RPM**, usunąć supernatant. Proces kilkakrotnie powtórzyć.
4. Usunąć resztki ksylenu/heksanu przez dwukrotne przepłukanie **96% etanolem** (nie ma w zestawie).
Usunąć resztki etanolu przez pozostawienie próbki na **2-5 min w temp. pokojowej**.
5. Przejsz do punktu 2. protokołu przygotowania materiału - tkanki świeże.

Dla tkanek utrwalonych zalecamy używanie zestawu Xpure FFPE micro (nr kat. 091-50) - zestaw do izolacji genomowego DNA z tkanek utrwalonych w parafinie. Szybka deparafinizacja bez ksylenu i heksanu.

Tkanki zanurzone w formalinie

1. Przenieść **tkankę** do probówki 1,5 ml typu Eppendorf (nie ma w zestawie).
2. Dodać taką objętość **wody jałowej** (nie ma w zestawie), aby tkanka była całkowicie w niej zanurzona.
3. Wymieszać przez odwracanie probówki, zwirować, usunąć supernatant. Proces kilkakrotnie powtórzyć.
4. Przejsz do punktu 2. protokołu przygotowania materiału - tkanki świeże.

Włosy, sierść

1. Pociąć **włosy, sierść** na ok. **0,5 cm fragmenty** i umieścić w probówce 1,5 ml typu Eppendorf (nie ma w zestawie).
2. Dodać kolejno po:
300 µl wody jałowej (nie ma w zestawie),
300 µl roztworu lizującego L1.4,
20 µl proteinazy K,
20 µl 1M DTT (nie ma w zestawie).
3. Wortexować przez **20 s**.
4. Inkubować w temp. **50 °C** (do całkowitego strawienia tkanki). Podczas inkubacji próbkę należy od czasu do czasu wortexować.
5. Przejsz do punktu 1. protokołu izolacji.

Protokół

1. Próbkę nanieść na kolumnę filtracyjną Filtr 1.

Kolumna z żółtym kółkiem służy do usuwania większych zanieczyszczeń pochodzących z podłoża lub niezliźwianych fragmentów tkanek.
2. Wirować przez 1 min przy 10 000 RPM (9000 x g).
3. Usunąć kolumnę filtracyjną Filtr 1.
Przesącz, w którym znajduje się DNA, nanieść na kolumnę oczyszczającą Spin 10AX.

Kolumna z niebieskim kółkiem jest właściwą kolumną oczyszczającą.
4. Wirować przez 1 min przy 8000 RPM (6000 x g).
5. Wylać przesącz i umieścić kolumnę Spin 10AX w **nowej** probówce 2 ml (w zestawie).
6. Nanieść na kolumnę Spin 10AX po 600 µl roztworu płuczącego K2.
7. Wirować przez 1 min przy 8000 RPM (6000 x g).
8. Wylać przesącz i ponownie umieścić kolumnę Spin 10AX w tej samej probówce.
9. Nanieść na kolumnę Spin 10AX po 600 µl roztworu płuczącego K2.
10. Wirować przez 1 min przy 8000 RPM (6000 x g).
11. Wylać przesącz i umieścić kolumnę Spin 10AX w **nowej** probówce 2 ml (w zestawie).
12. Nanieść na kolumnę Spin 10AX po 350 µl roztworu elucyjnego K3.
13. Pozostawić na 2 min w temp. pokojowej.
14. Wirować przez 1 min przy 8000 RPM (6000 x g).
15. Nanieść na kolumnę Spin 10AX po 350 µl roztworu elucyjnego K3.
16. Pozostawić na 1 min w temp. pokojowej.

17. Wirować przez **1 min** przy **8000 RPM (6000 x g)**.
18. Usunąć kolumnę Spin 10AX.
Przesączyć, w którym znajduje się DNA (~ **700 µl**), przenieść pipetą do **nowej** probówki 1,5 ml (nie ma w zestawie).
19. Dodać po **5 µl wzmacniacza precypitacji** oraz **600 µl izopropanolu**.
20. Wymieszać i wirować przez **10 min** przy **10 000 RPM (9000 x g)**.
21. Usunąć supernatant, uważając aby nie usunąć niebieskich osadów DNA.
22. Dodać po **500 µl 70% etanolu**.
23. Wymieszać i wirować przez **5 min** przy **10 000 RPM (9000 x g)**.
24. Usunąć supernatant. Osady DNA suszyć przez odwrócenie probówki przez **10 min** w **temp. pokojowej**.
Jeżeli na ściankach probówki znajdują się resztki alkoholu, należy je osuszyć kawałkiem jałowej waty (doskonale nadają się do tego patyczki higieniczne oraz pałeczki do pobierania wymazów).
25. Osady zawiesić w buforze TE (w zestawie), wodzie jałowej (nie ma w zestawie) lub buforze Tris 10 mM, pH 8,0 (nie ma w zestawie).

Niebieska barwa osadu umożliwia śledzenie procesu rozpuszczania DNA.
26. Oczyszczone DNA przechowywać w temp. 4 °C do czasu dalszych analiz.

Informacje bezpieczeństwa



NIEBEZPIECZEŃSTWO

Proteinaza K

H315 Działa drażniąco na skórę.
 H319 Działa drażniąco na oczy.
 H334 Może powodować objawy alergii lub astmy lub trudności w oddychaniu w następstwie wdychania.
 H335 Może powodować podrażnienie dróg oddechowych.
 P261 Unikać wdychania pyłu.
 P305+P351+P338 W przypadku dostania się do oczu: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.
 P342+P311 W przypadku wystąpienia objawów ze strony układu oddechowego skontaktować się z Ośrodkiem Zatruc lub lekarzem.



UWAGA

L1.4 roztwór lizujący

H302 Działa szkodliwie po połknięciu.
 H315 Działa drażniąco na skórę.
 H319 Działa drażniąco na oczy.
 P305+P351+P338 W przypadku dostania się do oczu: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.



NIEBEZPIECZEŃSTWO

K2 roztwór płuczący

H225 Wysoce łatwopalna ciecz i pary.
 H319 Działa drażniąco na oczy.
 H336 Może wywoływać uczucie senności lub zawroty głowy.
 P210 Przechowywać z dala od źródeł ciepła, gorących powierzchni, iskrzenia, otwartego ognia i innych źródeł zapłonu. Palenia wzbronione.
 P261 Unikać wdychania par.
 P305+P351+P338 W przypadku dostania się do oczu: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.



NIEBEZPIECZEŃSTWO

K3 roztwór elucyjny

H225 Wysoce łatwopalna ciecz i pary.
 H319 Działa drażniąco na oczy.
 H336 Może wywoływać uczucie senności lub zawroty głowy.
 P210 Przechowywać z dala od źródeł ciepła, gorących powierzchni, iskrzenia, otwartego ognia i innych źródeł zapłonu. Palenia wzbronione.
 P261 Unikać wdychania par.
 P305+P351+P338 W przypadku dostania się do oczu: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.



NIEBEZPIECZEŃSTWO

Izopropanol

H225 Wysoce łatwopalna ciecz i pary.
 H319 Działa drażniąco na oczy.
 H336 Może wywoływać uczucie senności lub zawroty głowy.
 P210 Przechowywać z dala od źródeł ciepła, gorących powierzchni, iskrzenia, otwartego ognia i innych źródeł zapłonu. Palenia wzbronione.
 P261 Unikać wdychania par.
 P305+P351+P338 W przypadku dostania się do oczu: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.



A&A BIOTECHNOLOGY
innovating life science

A&A Biotechnology, ul. Strzelca 40, 80-299 Gdańsk
tel. 883 323 761, 600 776 268
info@aabiotech.com, www.aabiotech.com

