

Instrukcja

ExToPCR™ Kit

Zestaw do szybkiej ekstrakcji DNA z różnych materiałów. Zawiera mieszaninę do Hot Start PCR.

numer katalogowy	wielkość
1032K-100	100 reakcji

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

Spis treści

Zalety	3
Specyfikacja	3
Opis	3
Skład	3
Dodatkowy sprzęt i odczynniki	4
Niezbędne	4
Opcjonalne	4
Przygotowanie materiału	4
Protokół ekstrakcji	5
Protokół reakcji PCR	6
Analiza produktu PCR	6
Rozwiązywanie problemów	7
Gęsty ekstrakt DNA	7
Inhibicja reakcji PCR	7
Informacje bezpieczeństwa	7

Zalety

- Szybka, 15-minutowa procedura.
- Ekstrakcja DNA jest przeprowadzana w jednej probówce, bez potrzeby wielokrotnych etapów płukania lub wirowania.

Specyfikacja

format	enzymatyczna ekstrakcja DNA
materiał	• krew • tkanki FFPE • wymazy • cebulki włosów • tkanki zwierzęce • owady • pióra

Opis

ExToPCR™ Kit składa się z odczynników do przygotowania ekstraktu zawierającego DNA oraz mieszaniny do Hot Start PCR.

Szybka, 15-minutowa procedura pozwala uzyskać DNA w ilości wystarczającej do przeprowadzenia reakcji PCR. Termostabilny enzym lityczny (**Enzym XTP**) umożliwia wydajną ekstrakcję DNA, oraz rozkłada nukleazy komórkowe. Ponadto bufor ekstrakcyjny (**Bufor XTP**) nie zawiera drażniących i szkodliwych substancji.

Dostarczony w zestawie dwukrotnie stężony **XTP HS-PCR Mix** zawiera zablokowaną przeciwciałem monoklonalnym termostabilną polimerazę DNA. Jest ona aktywowana w czasie wstępnej denaturacji DNA, co znacznie poprawia specyficzność reakcji. Mieszanina **XTP HS-PCR Mix** zawiera ponadto komponenty zapobiegające inhibicji reakcji PCR, barwniki oraz bufor obciążający, co pozwala na nanoszenie próbek bezpośrednio na żel agarozowy.

Skład

składnik	ilość	przechowywanie
Bufor XTP	10 ml	-20 °C
Enzym XTP	500 µl	-20 °C
XTP HS-PCR Mix	1,25 ml	-20 °C
woda ultraczysta	1,5 ml	temp. pokojowa

Dodatkowy sprzęt i odczynniki

Niezbędne

- Probówki PCR 0,2 ml
- Termoblok lub łaźnia wodna
- Termocykler

Opcjonalne

- Bufor TE lub Tris-HCl pH 8,0
- Probówki Eppendorf 1,5 ml

Przygotowanie materiału

materiał	przygotowanie
Krew	1. Do probówki 0,2 ml dodać: ○ 5-10 µl krwi świeżej lub pobranej na EDTA ○ 85 µl buforu XTP ○ 5 µl enzymu XTP
	1. Przejść do <u>protokołu ekstrakcji</u>.
Tkanki FFPE	1. Usunąć nadmiar wosku. 2. Do probówki 0,2 ml dodać: ○ 1 mm² tkanki lub fragment 1-2 mm² z wycinka o grubości 10 µm ○ 85 µl buforu XTP ○ 5 µl enzymu XTP
	3. Przejść do <u>protokołu ekstrakcji</u>.
Wymazówki	1. Obciąć końcówkę wymazówki i umieścić ją w probówce 1,5 ml i dodać: ○ 300 µl (dwukrotnie rozcieńczonego z wodą) buforu XTP ○ 5 µl enzymu XTP
	2. Przejść do <u>protokołu ekstrakcji</u>.

Cebulki włosów	- Do probówki 0,2 ml dodać: 1-10 cebulek włosa 85 µl buforu XTP 5 µl enzymu XTP - Przejdź do <u>protokołu ekstrakcji</u>.
Tkanki zwierzęce	- Do probówki 0,2 ml dodać: 2 mm³ fragment tkanki 85 µl buforu XTP 5 µl enzymu XTP - Przejdź do <u>protokołu ekstrakcji</u>.
Owady	- Umieścić owada lub jego fragment w probówce 1,5 ml - Dodać buforu XTP aby owad był w nim całkowicie zanurzony - Rozgnieść owada tipsem lub innym jałowym narzędziem - Dodać 5 µl enzymu XTP - Przejdź do <u>protokołu ekstrakcji</u>.
Pióra	- Umieścić 2-5 mm fragment lotki pióra w probówce 0,2 ml i dodać: 100 µl buforu XTP 20 µl enzymu XTP - Przejdź do <u>protokołu ekstrakcji</u>.

Protokół ekstrakcji

- Zamknąć probówkę z próbką.
- Inkubować w łaźni wodnej, termobloku lub termocyklerze przez **10 min** w temp. **50 °C**.
- Inkubować w łaźni wodnej, termobloku lub termocyklerze przez **5 min** w temp. **95 °C**.
- Pozostawić próbkę w temp. pokojowej do czasu ostygnięcia.

Uwaga: Jeżeli próbka materiału nie ulegnie całkowitemu rozpuszczeniu nie musisz usuwać jej z probówki. Pomimo obecności fragmentu próbki, obecne w ekstrakcie DNA jest zabezpieczone.

- Uzyskany ekstrakt DNA może być przechowywany przed przeprowadzeniem reakcji PCR do 1 miesiąca w temp. 4 °C.

Protokół reakcji PCR

1. Rozmrozić **XTP HS-PCR Mix** oraz **wodę ultraczystą** w lodzie. Wymieszać przez odwracanie probówki, krótko zwirować i wstawić ponownie do lodu.

2. Umieścić probówki reakcyjne PCR w lodzie i dodać:

składnik	ilość
XTP HS-PCR Mix	12,5 µl
starter 1 (10 µM)	0,5-1,25 µl
starter 2 (10 µM)	0,5-1,25 µl
ekstrakt DNA	1 µl
woda ultraczysta	uzupełnić do 25 µl

3. Mieszaninę reakcyjną delikatnie wymieszać i zwirować.

4. Probówki umieścić w termocyklerze i nastawić reakcję PCR według poniższego profilu:

etap	temperatura	czas	ilość cykli
wstępna denaturacja	95 °C	5 min	1
denaturacja	95 °C	15 s	35-40
przyłączanie starterów	40-70 °C *	30 s	
wydłużanie starterów	72 °C	30-60 s / 1000 pz.	
wydłużanie końcowe	72 °C	5 min	1

*) Temperatura przyłączania starterów powinna być ustalona na podstawie dostępnych wzorów do obliczania temperatury annealingu (Ta) lub ustalona eksperymentalnie.

Analiza produktu PCR

Mieszanina **XTP HS-PCR Mix** zawiera bufor obciążający oraz dwa barwniki: niebieski i żółty. Dzięki temu produkty PCR mogą być bezpośrednio nanoszone na żel agarozowy. Na 2% żelu agarozowym barwnik niebieski migruje razem z fragmentami DNA o wielkości 1000 pz. Żółty barwnik pozwala na ocenę postępu elektroforezy odwzorowując ruchliwość czoła rozdziatu w żelu.

Rozwiązywanie problemów

Gęsty ekstrakt DNA

Jeśli ekstrakt jest gęsty lub występuje problem z pipetowaniem, należy go krótko odwirować, a do reakcji PCR użyć supernatantu. Alternatywnie można go rozcieńczyć 1:5 – 10 buforem TE lub Tris-HCl pH 8,0.

Inhibicja reakcji PCR

Jeżeli reakcja PCR nie daje produktu lub jest on niespecyficzny, to należy rozcieńczyć ekstrakt DNA 1:5–10 buforem TE lub Tris-HCl pH 8,0.

Informacje bezpieczeństwa



NIEBEZPIECZEŃSTWO

XTP enzyme

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.



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

