

Instrukcja

Cell-free AX DNA Mini

Zestaw do izolacji wolnokrążącego DNA (cell-free DNA/circulating free DNA) z osocza. Procedura z precipitacją DNA.
Wielkość próbki: 100-500 µl osocza.

numer katalogowy	wielkość
063-25	25 izolacji
063-100	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

Spis treści

Zalety	3
Specyfikacja	3
Opis	3
Skład	3
Dodatkowy sprzęt i odczynniki	4
Niezbędne	4
Opcjonalne	4
Referencje	4
Przygotowanie materiału (osocze świeże lub mrożone)	4
Protokół izolacji	5
Informacje bezpieczeństwa	7

Zalety

- Otrzymanie DNA wysokiej czystości, wyeliminowanie zanieczyszczeń DNA komórkowym.
- Szybka i prosta procedura izolacji.
- Możliwość zawieszenia wyizolowanego DNA w dowolnej objętości wody jałowej lub buforu.

Specyfikacja

format	minikolumna
pojemność złoza	10 µg DNA
wielkość próbki	100 - 500 µl osocza świeżego, mrożonego
objętość elucji	precypitacja
zastosowanie wyizolowanego materiału	qPCR, sekwencjonowanie

Opis

Cell-free AX DNA Mini jest zestawem przeznaczonym do izolacji pozakomórkowego DNA z osocza krwi (cfDNA), w tym również wolnego płodowego DNA z osocza ciężarnej (cffDNA) oraz pozakomórkowego DNA nowotworowego (ctDNA). Wysoka jakość wyizolowanego DNA pozwala na szerokie zastosowanie w metodach m.in. PCR, real-time PCR, next-generation sequencing. Analiza wybranych sekwencji cfDNA pozwala na nieinwazyjne testy prenatalne, wykrywanie oraz monitorowanie nowotworów i chorób autoimmunologicznych.

Skład

składnik	25 izolacji		100 izolacji		przechowywanie
	ilość	nr kat.	ilość	nr kat.	
kolumny Spin 10AX	25 szt.	K-0006-25	100 szt.	K-0006-100	2-8 °C
Probówki 2 ml	25 szt.	K-PGR-25	100 szt.	K-PGR-100	15-25 °C
Probówki precypitacyjne 2 ml	25 szt.	K-PRP-25	100 szt.	K-PRP-100	15-25 °C
L1.4 roztwór lizujący	15 ml	K-L14-15	55 ml	K-L14-55	15-25 °C
K2CF roztwór płuczący	35 ml	K-K2CF-35	135 ml	K-K2CF-135	15-25 °C
K3 roztwór elucyjny	12 ml	K-K3-12	45 ml	K-K3-45	15-25 °C
PM mieszanina precypitacyjna	10 ml	K-PM-10	40 ml	K-PM-40	15-25 °C
Bufor Tris (10 mM Tris-HCl, pH 8,5)	2 ml	K-TRIS-2	6 ml	K-TRIS-6	15-25 °C
Proteinaza K	600 µl	K-PRK-600B	2 x 1,1 ml	K-PRK-11A	2-8 °C

Dodatkowy sprzęt i odczynniki

Niezbędne

- jałowe probówki o pojemności 1,5 ml typu Eppendorf
- 70% etanol
- inkubator lub termoblok 50 °C
- wortex
- mikrowirówka

Opcjonalne

- Bufor TE (nr kat. 297-100)
- Woda jałowa ([nr kat. 003-075.003-25](#))

Referencje

1. Orzińska A., Purchla-Szepiła S., Krzemińska M., Stefanska-Kazmierczak A., Dąbrowski S., Dębska M., Kopeć I., Uhrynowska M., Guz K. *Comparison of non-invasive prenatal testing of a fetal antigen genotype using different isolation methods*, Vox Sanguinis International Journal of Blood Transfusion Medicine, 2020; 115:s.295.
2. Jarmuzek P, Wawrzyniak-Gramacka E, Morawin B, Tylutka A, Zembron-Lacny A. *Diagnostic and Prognostic Value of Circulating DNA Fragments in Glioblastoma Multiforme Patients*. Int J Mol Sci. 2024 Apr 11;25(8):4221. doi: 10.3390/ijms25084221

Przygotowanie materiału (osocze świeże lub mrożone)

1. Przenieść **100-500 µl osocza** do probówki 1,5 ml typu Eppendorf (nie ma w zestawie).
2. Do każdej próbki dodać roztwór lizujący **L1.4** w objętości równej użytej objętości osocza oraz **20 µl proteiny K**.
3. Wortexować przez **20 s**.
4. Inkubować przez **20 min** w temp. **50 °C**. Podczas inkubacji próbkę należy od czasu do czasu wortexować.
5. Przejsz do punktu 1. [protokołu izolacji](#).

Protokół izolacji

1. **Uwaga.** Maksymalna objętość próbki nakładanej jednorazowo na kolumnę nie może przekraczać **700 µl**.
Próbkę nanieść na kolumnę **Spin 10AX**.
2. Wirować przez **1 min** przy **8000 RPM (6000 x g)**. Wylać przesącz.
3. Jeśli objętość próbki z punktu 1. przekraczała **700 µl**, nanieść resztę próbki na kolumnę i wirować przez **1 min** przy **8000 RPM (6000 x g)**. Wylać przesącz.
4. Umieścić kolumnę Spin 10AX w **nowej probówce 2 ml (K-PGR-25 w zestawie)**.
5. Nanieść na kolumnę Spin 10AX **600 µl** roztworu płuczącego **K2CF**.
6. Wirować przez **1 min** przy **8000 RPM (6000 x g)**.
7. Wylać przesącz i ponownie umieścić kolumnę Spin 10AX w tej samej probówce.
8. Nanieść na kolumnę Spin 10AX **600 µl** roztworu płuczącego **K2CF**.
9. Wirować przez **1 min** przy **8000 RPM (6000 x g)**.
10. Wylać przesącz i umieścić kolumnę Spin 10AX w **probówce precypitacyjnej (K-PRP-25 w zestawie)**.
11. Nanieść na kolumnę Spin 10AX **200 µl** roztworu elucyjnego **K3**.
12. Pozostawić na **2 min** w **temp. pokojowej**.
13. Wirować przez **1 min** przy **8000 RPM (6000 x g)**.
14. Nanieść na kolumnę Spin 10AX **200 µl** roztworu elucyjnego **K3**.
15. Pozostawić na **1 min** w **temp. pokojowej**.
16. Wirować przez **1 min** przy **8000 RPM (6000 x g)**.

17. Usunąć kolumnę **Spin 10AX**.
18. **Uwaga.** Mieszanina precypitacyjna PM zawiera dodatkowo wzmacniacz precypitacji, dlatego przed użyciem należy ją wymieszać poprzez kilkakrotne odwracanie butelki.

Do eluatów dodać po **320 µl** mieszaniny precypitacyjnej **PM**.
19. Wymieszać i wirować przez **10 min** przy **10 000 RPM (9000 x g)**.
20. Ostrożnie zlać supernatant, tak aby nie usunąć niebieskiego osadu DNA.

Uwaga. W trakcie zlewania supernatantu łatwo wylać osad DNA. Dla bezpieczeństwa zaleca się wylewać supernatant do przygotowanej probówki, tak aby można było go odzyskać.
21. Dodać po **500 µl 70% etanolu**.
22. Wymieszać i wirować przez **5 min** przy **10 000 RPM (9000 x g)**.
23. Usunąć supernatant. Osady DNA suszyć przez **10 min** w **temp. pokojowej**.

Uwaga. 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).
24. Zawiesić osad DNA w odpowiedniej ilości buforu **Tris** (w zestawie), buforu **TE** lub **wody jałowej wolnej od nukleaz** (nie ma w zestawie).

Informacja. Niebieska barwa osadu umożliwia śledzenie procesu rozpuszczania DNA.
25. Oczyszczone DNA przechowywać w temp. **4-8 °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

K2CF 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

PM mieszanina precypitacyjna

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

wersja 2025-1

