

Instrukcja

Cell-free AX DNA

Zestaw do izolacji wolnokrążącego DNA (cell-free DNA/circulating free DNA) z osocza.
Wielkość próbki: 4 ml osocza.

numer katalogowy	wielkość
054-50	50 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 wchodzi w skład produktu
- użycia przeterminowanych odczynników oraz elementów produktu

Spis treści

Zalety	3
Opis	3
Zastosowanie	3
Skład	3
Dodatkowy sprzęt i odczynniki	4
Niezbędne	4
Opcjonalne	4
Referencje	4
Ważne informacje	5
Protokół	5
Informacje bezpieczeństwa	7

Zalety

- Otrzymanie DNA wysokiej czystości, wyeliminowanie zanieczyszczeń DNA komórkowym.
- Szybka i prosta procedura izolacji.
- Maksymalna objętość próbki do 4 ml.
- Możliwość zawieszenia wyizolowanego DNA w dowolnej objętości wody jałowej lub buforu.

Opis

Cell-free AX DNA 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

50 izolacji

składnik	ilość	nr kat.	przechowywanie
Kolumny Genomic Mini AX	50 szt.	K-AX01-50	4-8 °C
Probówki 2 ml	50 szt.	K-PRP-50	temp. pok.
L1.4 roztwór lizujący	220 ml	K-L14-220	temp. pok.
K1 roztwór równoważący	55 ml	K-K1-55	temp. pok.
K2CF roztwór płuczący	220 ml	K-K2CF-220	temp. pok.
K3 roztwór elucyjny	60 ml	K-K3-60	temp. pok.
PM mieszanina precypitacyjna	45 ml	K-PM-45	temp. pok.
Bufor Tris (10 mM Tris-HCl, pH 8,5)	6 ml	K-TRIS-6	temp. pok.
Proteinaza K	6 ml	K-PRK-6	4-8 °C

Dodatkowy sprzęt i odczynniki

Niezbędne

- Probówki 15 ml typu Falcon
- Probówki 2 ml typu Eppendorf
- 70% etanol
- Inkubator lub termoblok 50 °C
- Worteks
- Mikrowirówka

Opcjonalne

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

Referencje

1. Orzińska A., Purchla-Szepiła S., Krzemienowska 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.

Ważne informacje

Jeżeli na którymś z etapów izolacji dojdzie do zatrzymania przepływu roztworu przez kolumnę, należy wówczas zwirować kolumnę w rotorze uchylnym przez **2 min** przy **2 000 RPM**.

Protokół

1. Przenieść **4 ml** osocza do probówki 15 ml typu Falcon (nie ma w zestawie).
2. Dodać po **4 ml** roztworu lizującego **L1.4** oraz **80 µl** **proteiny** **K**.
3. Próbkę wymieszać przez odwracanie probówki i inkubować przez **20 min** w temp. **50 °C** z funkcją wytrząsania.
Uwaga. W przypadku braku funkcji wytrząsania, próbkę należy kilkakrotnie mieszać przez odwracanie probówki.
4. W trakcie inkubacji przygotować kolumny Genomic Mini AX będące w probówkach 15 ml typu Falcon. Nanieść na kolumnę po **1 ml** roztworu równoważącego **K1**. Poczekać, aż roztwór wypłynie z kolumny.
5. Nanieść **4 ml** próbki na zrównoważoną kolumnę Genomic Mini AX. Poczekać, aż lizat wypłynie z kolumny.
6. Usunąć roztwór z probówki 15 ml typu Falcon i ponownie włożyć do niej kolumnę Genomic Mini AX.
7. Nanieść resztę próbki na kolumnę Genomic Mini AX. Poczekać, aż roztwór wypłynie z kolumny.
8. Usunąć roztwór z probówki 15 ml typu Falcon i ponownie włożyć do niej kolumnę Genomic Mini AX.
9. Nanieść po **4 ml** roztworu płuczającego **K2CF** na kolumnę Genomic Mini AX. Poczekać, aż roztwór wypłynie z kolumny.
10. Nanieść po **100 µl** roztworu elucyjnego **K3** na kolumnę Genomic Mini AX. Poczekać, aż eluat wypłynie z kolumny.
11. Przenieść kolumnę Genomic Mini AX do probówki precypitacyjnej **2 ml** (w zestawie).
Informacja. Kolumna posiada odpowiednie żeberka pozwalające na łatwe umieszczenie jej w probówce.
12. Nanieść po **1 ml** roztworu elucyjnego **K3** na kolumnę Genomic Mini AX. Poczekać, aż eluat wypłynie z kolumny. Usunąć kolumnę Genomic Mini AX.

13. **Uwaga.** Mieszanina precypitacyjna PM zawiera dodatkowo wzmacniacz precypitacji, dlatego przed użyciem należy ją wymieszać poprzez kilkakrotne odwracanie butelki.

Do eluatów dodać po **800 µl** mieszaniny precypitacyjnej **PM**.
14. Wymieszać przez kilkakrotne odwracanie probówki i wirować przez **10 min** przy **10 000 RPM**.

Informacja. Na dnie powinien być widoczny jasnoniebieski osad DNA.
15. 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.
16. Dodać po **500 µl 70% etanolu** (nie ma w zestawie).
Całość wymieszać i wirować przez **3 min** przy **10 000 RPM**.

Informacja. Na dnie powinien być widoczny jasnoniebieski osad DNA.
17. 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.
18. Odwrócić probówkę z osadem DNA i suszyć odwróconą do góry dnem przez **5 min** w **temp. pokojowej**.

Uwaga. Jeżeli na ściankach probówki wciąż znajdują się resztki alkoholu, należy je osuszyć przy pomocy patyczków higienicznych.
19. 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.
20. 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.



UWAGA

K1 roztwór równoważący

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 Wysokie 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 Wysokie 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 Wysokie 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

