

RevoDx Набір для виділення ДНК із дріжджів на спін-колонках (пластик входить в набір)

RevoDx Genomic DNA Purification Kit from Yeast

Інструкція з використання

Для виділення ДНК із дріжджів на рідких або твердих середовищах
Для дослідницьких цілей
Тільки для професійного використання

Каталожні номери:
IP201916-50 – 50 тестів
IP201916-100 – 100 тестів



Склад набору

	Компонент	50 тестів	100 тестів
1	Буфер для лізису дріжджів (Yeast Lysis Buffer)	11 мл	22 мл
2	Буфер для лізису (Lysis Buffer)	14 мл	28 мл
3	Буфер для промивання 1 (Wash Buffer 1)	19 мл	38 мл
4	Буфер для промивання 2 (Wash Buffer 2)	28,5 мл	57 мл
5	Буфер для елюції (Elution Buffer)	15 мл	30 мл
6	Протеїназа К (Proteinase K)	1 пробірка	2 пробірки
7	Спин-колонки з пробірками для збору	50 штук	100 штук
8	Пробірки для збору, 2 мл	150 штук	300 штук
9	Пробірки для елюції, 1,5	50 штук	100 штук
10	Інструкція з використання	1 шт	1 шт

Транспортування, зберігання та стабільність

Набори можна транспортувати за температури навколишнього середовища. Після отримання пробірки з протеїназою зберігайте при температурі від +2°C до +8°C. Інші компоненти набору слід зберігати щільно закритими при кімнатній температурі (від 15°C до 25°C). За умов належного зберігання всі компоненти набору залишаються стабільними до закінчення терміну придатності, який зазначений на етикетці продукту.

Передбачене використання

RevoDx Genomic DNA Purification Kit from Yeast призначений для швидкого очищення геномної ДНК із дріжджів на рідких та твердих середовищах. Очищена ДНК/РНК придатна для подальших застосувань, таких як ПЛР, РЧ-ПЛР, клонування, RFLP аналіз та секвенування. Будь-які діагностичні результати, отримані у зв'язку з будь-яким подальшим діагностичним аналізом з використанням цього набору, слід інтерпретувати згідно з усіма відповідними клінічними та лабораторними даними.

Загальний опис

Екстракція нуклеїнових кислот відіграє важливу роль в молекулярній діагностиці як первинний етап для багатьох подальших досліджень. Очікується, що високоякісний екстракт нуклеїнової кислоти не містить інгібіторів ампліфікації та інших речовин, які можуть впливати на роботу ферментів.

Набір RevoDx Genomic DNA Purification Kit from Yeast передбачає використання спеціальних буферів для лізису в поєднанні з спин-колонками на основі діоксиду-кремнію для ефективного очищення ДНК з біологічних зразків. Зразки дріжджів лізують в оптимізованих буферах, що містять хаотропні солі. Буфер для зв'язування забезпечує селективне зв'язування ДНК з кремнієвою матрицею. Домішки, такі як білки, солі та залишки клітин, видаляються під час наступних етапів промивання та центрифугування. Нарешті, високоочищені нуклеїнові кислоти вивільняються у розчин за допомогою буфера з низькою іонною силою. Очищену ДНК можна використовувати безпосередньо в подальших застосуваннях для діагностичних аналізів *in vitro*. Тривалість процедури виділення складає 90 хв.

Обмеження щодо використання продукту

- RevoDx Genomic DNA Purification Kit from Yeast можна використовувати для дослідницьких цілей.
- Будь-які діагностичні результати, отримані у зв'язку з будь-яким подальшим діагностичним аналізом з використанням цього набору, слід інтерпретувати згідно з усіма відповідними клінічними та лабораторними даними.
- Цей набір валідований для використання із зразками дріжджів у рідких та твердих середовищах. Тестування з іншими типами зразків може призвести до хибних результатів.
- Надійні результати залежать від правильного збору, транспортування, зберігання та методів обробки зразків.
- Набір повинен використовуватися тільки професійним персоналом, який пройшов підготовку з молекулярно-біологічних методів.
- Дотримуйтесь вказівок, наведених в інструкції до набору, для отримання оптимальних результатів виділення.
- Для діагностики та моніторингу пацієнта слід використовувати один тип наборів для виділення. Якщо RevoDx Genomic DNA Purification Kit from Yeast замінює інший набір, обидва тести слід використовувати паралельно принаймні протягом двох наступних циклів.
- Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності. Компоненти набору з різних партій не можна змішувати.

Інформація щодо безпеки

- Клінічні зразки слід розглядати як потенційно інфекційні; з ними слід працювати в зоні біобезпеки 1-го або 2-го рівня, залежно від збудника інфекції.
- Усі отримані відходи слід вважати потенційно інфекційними. З ними слід поводитись та утилізувати відповідно до місцевих регламентів безпеки.
- Необхідно уникати будь-якого контакту шкіри з реагентами набору. У випадку контакту ретельно промити водою.
- Необхідно уникати розбризкування та утворення аерозолів.
- Після роботи із клінічними зразками та реагентами необхідно мити руки.
- Інформацію стосовно хімічного складу та безпечності реагентів (MSDS information) можна отримати від виробника чи його представника за запитом.
- При роботі в лабораторії необхідно використовувати засоби індивідуального захисту.
- На початку та в кінці роботи необхідно дезінфікувати усі робочі поверхні незаражувальними розчинами.
- Переконайтесь, що всі розхідні матеріали мають маркування DNase/RNase-free.
- Поводьтесь з усіма матеріалами відповідно до правил роботи в лабораторіях, що проводять дослідження молекулярно-генетичними методами, щоб запобігти перехресній контамінації.
- Використовуйте тільки повірені/калібровані дозатори та наконечники з аерозольним фільтром.
- Одразу після використання слід щільно закривати кришки флаконів для перешкоджання протікання і зміні концентрації реагентів.
- Зберігайте набір подалі від джерел забруднення нуклеїновими кислотами, особливо продуктами ампліфікації.
- Усі маніпуляції варто проводити в окремих зонах (екстракція ДНК/РНК, приготування реакційних сумішей, ампліфікація).
- Усе обладнання та витратні матеріали для конкретної операції повинні знаходитися в зоні, де виконується ця операція, і не повинні переміщатися між різними зонами. Рукавички слід змінювати при переході у кожну зону. Лабораторні халати повинні бути окремими для кожної зони і їх не можна носити за межами цієї зони.
- Роботи повинні виконуватись в одному напрямку, починаючи із зони екстракції ДНК/РНК і закінчуючи відповідними зонами використання.

Додаткове обладнання та матеріали

- Етанол 96-100% (для молекулярно-біологічних досліджень),
- Рібонуклеаза А (за бажанням),
- Ферментна суміш для лізису (Lyticase, Zymolyase),
- Буфер на основі сорбітолу,
- 1М DTT,
- Термошейкер або твердотільний термостат (56°C - 95°C),
- Вихровий змішувач (вортекс),
- Настільна мікроцентрифуга для пробірок 2,0 мл (≥ 16 000 x g),
- Відповідні засоби індивідуального захисту (захисний халат, одноразові рукавички, захисні окуляри)
- Мікропіпетки (дозатори) (0,5 мкл – 1000 мкл),
- Наконечники для дозаторів з аерозольним фільтром, вільні від ДНКаз та РНКаз,
- Мікропробірки 1,5/2 мл, вільні від ДНКаз/РНКаз.

Поводження зі зразками

Цей набір валідований для виділення ДНК із зразків дріжджів у рідких та твердих середовищах. З клінічними зразками слід поводитися як з потенційно інфекційними; під час відбору та обробки зразків рекомендується дотримуватися запобіжних заходів безпеки. Клініцисти (в тому числі фельдшери, медсестри, лікарі та фахівці, пов'язані з медициною) несуть відповідальність за дотримання правильної процедури під час відбору та безпечного транспортування зразків до лабораторії. Достовірність результатів тестування значною мірою залежить від належної практики на преаналітичному етапі, що також передбачає точне і повне документування.Транспортування біологічних зразків повинно відповідати національним або місцевим правилам.

Зауваження перед використанням

Перед кожним використанням перевіряйте всі розчини з набору на наявність осаду. При виявленні осаду розчиніть його, нагріваючи розчин до 37°C, а потім дайте охолонути до кімнатної температури. Заморожені зразки прогрійте при 37°C, та дайте охолонути до кімнатної температури. Уникайте багаторазових циклів заморожування/розморожування зразків. Всі етапи центрифугування слід виконувати при кімнатній температурі. Якщо розчин не пройшов повністю через колонку, то слід відцентрифугувати ще протягом додаткових 1-2 хв поки весь розчин не пройде крізь колонку. Перед першим використанням додайте вказаний об'єм етанолу (96-100%, для молекулярної біології) до концентрованого буфера для промивання 1 і концентрованого буфера для промивання 2, як зазначено в таблиці нижче. Пляшки з розчином слід щільно закривати між використанням, щоб запобігти випаровуванню. На етикетці пляшок слід зазначити, що в них додано етанол.

	50 тестів QP119090905-2	100 тестів QP119090905-3
Буфер для промивання 1	додати 19 мл 96-100% етанолу (Molecular biology grade)	додати 38 мл 96-100% етанолу (Molecular biology grade)
Буфер для промивання 2	додати 9,5 мл 96-100% етанолу (Molecular biology grade)	додати 19 мл 96-100% етанолу (Molecular biology grade)

Приготуйте буфер на основі сорбітолу:

- 0.7М сорбітол
- 0.1 ЕДТА
- 0.1 трис-HCl, pH 8.0

Протокол

- Підготуйте зразки:
 - З рідких середовищ:
 - Осадить клітини (1.0x10⁶-1.0x10⁸ клітин) центрифугуванням: 4.500 g, 10 хв.
 - Додайте 1 мл буфера на основі сорбітолу та перемішайте піпетуванням.
 - З твердих середовищ:
 - Перенесіть 1 колонію дріжджів з пляшки до пробірки на 2 мл, яка містить 1 мл буфера на основі сорбітолу.
 - Перемішайте піпетуванням.
- Осадить клітини центрифугуванням: 12 000 g, 1 хв. Видалить супернатант.
Опціонально: якщо потрібен препарат ДНК без домішок РНК, додайте 10 мкл РНКази А (20 мкг/мл) та перемішайте переривчастим вортексуванням 10 разів, потім коротко відцентрифугуйте для осадження крапель та інкубуйте 3 хв при кімнатній температурі (15-25 °C), після чого можна переходити до кроку 3.
- Додайте 1 мл розчину 1мМ DTT, потім додайте 250 одиниць ферментної суміші для лізису (Lyticase або Zymolyase) в 1 мл буфера на основі сорбітолу.
- Ресуспендуйте клітини вортексуванням. Помістіть пробірки в термошейкер та інкубуйте протягом 30 хв за температури 30 °C. Якщо термошейкер недоступний, то можна інкубувати зразки у твердотільному термостаті протягом 30 хв за температури 30 °C при перемішуванні кожні 5 хв.
- Осадить сферопласти центрифугуванням: 4 500 g, 5 хв. Видалить супернатант.
- Додайте 200 мкл буфера для лізису дріжджів та 20 мкл Протеїнази К.
- Перемішайте вортексуванням та інкубуйте протягом 1 години за температури 56°C.
Зразки необхідно перемішувати під час інкубування кожні 10 хв. Можна використовувати термошейкер, вортекс або струшування водяної бані.
- Додайте 200 мкл буфера для лізису в пробірки.
- Перемішайте кожну пробірку переривчастим вортексуванням 20 разів. Перенесіть пробірки в термошейкер та інкубуйте протягом 15 хв за температури 65 °C. Якщо термошейкер недоступний, то можна інкубувати зразки у твердотільному термостаті протягом 15 хв за температури 65 °C при перемішуванні кожні 2-3 хв.
- Коротко відцентрифугуйте пробірки та додайте 260 мкл 96-100% етанолу (для молекулярних досліджень), перемішайте кожну пробірку переривчастим вортексуванням 20 разів та інкубуйте за кімнатної температури протягом 1 хв.
- Коротко відцентрифугуйте пробірки та перенесіть лізат до спін-колонок, які мають бути вставлені у пробірки для збору.
- Центрифугуйте при 6 000 g, 1 хв. Перенести спін-колони в нові пробірки для збору, попередні викинути.
- Додайте 700 мкл буфера для промивання 1 в спін-колони. Центрифугуйте при 6 000 g, 1 хв. Перенести спін-колони в нові пробірки для збору, попередні викинути.
- Додайте 700 мкл буфера для промивання 2 в спін-колони. Центрифугуйте при 16 000 g, 1 хв. Перенести спін-колони в нові пробірки для збору, попередні викинути.
- Центрифугуйте при 16 000 g, 3 хв. Перенести спін-колони в пробірки для збору елюату, попередні викинути.
- Додайте 200 мкл буфера для елюції, попередньо прогрітого до 70 °C, в центр колонки. Закрийте кришку та інкубуйте за кімнатної температури протягом 3 хв.
- Центрифугуйте при 6 000 g, 1 хв, потім додатково при 16 000 g, 30 сек.
- Вийняти спін-колони з пробірок та викинути колонки. Пробірки містять елюат з очищеною ДНК. Очищену ДНК слід використовувати одразу або зберігати за температури -20°C.

Можливі проблеми та їх усунення

Проблема	Можливі причини	Рекомендації
Низький вихід нуклеїнових кислот	Випарювання етанолу з буферів для промивання	Флакони з розчинами слід щільно закривати між використаннями, щоб запобігти випаровуванню.
	Неналежне зберігання компонентів набору	Після отримання набору, вийміть пробірки з протеїназою К з упаковки та зберігайте при температурі від +2°C до +8°C. Інші компоненти набору слід зберігати щільно закритими при кімнатній температурі (від 15°C до 25°C).
	Етанол не доданий до промивних буферів	Перед першим використанням додайте вказаний об'єм етанолу (96-100%) до концентрованих буферів для промивання 1 та 2. На етикетці пляшок повинно бути зазначено, що додано етанол.
	Неправильне поводження з вихідним матеріалом	Переконайтеся, що всі розхідні матеріали вільні від ДНКаз та РНКаз (DNase/Rnase-free)
	Неправильне поводження з елюатами	Не піддавайте елюати багаторазовим циклам заморожування-розморожування перед наступними аналізами
	Низька якість вихідного матеріалу	Уникайте багаторазового заморожування/розморожування зразків.
	Неправильні умови елюції	Додайте 50 мкл буфера для елюції, у центр спін-колонки, закрийте кришку колонки та інкубуйте при кімнатній температурі протягом 3 хвилин
	Забита колонка	Ресуспендуйте клітини дріжджів та впевнитись, що не утворюється згустків
	Утворення осаду в розчинах	Перед кожним використанням перевіряйте всі розчини з набору на наявність осаду. Розчиніть будь-який осад, нагріваючи розчин до 37°C, а потім охолодіть до кімнатної температури.
Низькі показники при подальшому діагностичному аналізі	Потраплення етанолу в елюат	Обов'язково видаліть весь залишковий етанол під час останнього етапу промивання, оскільки він заважає подальшим аналізам і є сильним інгібітором ПЛР
	Інгібування ПЛР	Зразки плазми або сироватки крові, обробленої гепарином, можуть призвести до інгібування ПЛР
		Тестування з іншими типами зразків може призвести до інгібування ПЛР
	Слабка ампліфікація внутрішнього контролю	Колонки призначені для очищення нуклеїнових кислот розміром понад 100 п.н. Внутрішні контролю розміром менше ніж 100 п.н. не можуть бути ефективно екстраговані
Перехресна контамінація	Повторне використання наконечників для піпеток	Завжди міняйте наконечники піпеток між перенесеннями рідини (рекомендується використовувати наконечники з аерозольним бар'єром)
	Амплікони	Тримайте набір якомога далі від будь-яких джерел забруднення нуклеїновими кислотами, особливо від ампліфікованих нуклеїнових кислот В ідеалі операції повинні проводитися в трьох окремих зонах (екстракція ДНК, приготування реакційних сумішей, ампліфікація), щоб запобігти контамінації.

Інформація для замовлення

Назва продукту	Фасування	Кат.№.
RevoDx DNA Purification Kit from Yeast	50 тестів	IP201916-50
RevoDx DNA Purification Kit from Yeast	100 тестів	IP201916-100