

Srpen 2015

List protokolu QIA Symphony[®] SP

Tissue_LC_200_V7_DSP a
Tissue_HC_200_V7_DSP (uživatelem validovaný
pro použití s minisadou QIA Symphony DSP DNA)

Tento dokument Tissue_LC_200_V7_DSP a Tissue_HC_200_V7_DSP (uživatelem validovaný pro použití s minisadou QIA Symphony DSP DNA) je listem protokolu přístroje QIA Symphony SP, R1 pro sadu verze 1.

Všeobecné informace

Tyto protokoly jsou určeny k purifikaci celkové DNA z kultivovaných buněk a bakteriálních kultur pomocí přístroje QIASymphony SP a minisady QIASymphony DSP DNA.

V závislosti na typu vzorku doporučujeme používat buď protokol pro nízký obsah (LC), nebo vysoký obsah (HC). Kultivované buňky a bakteriální kultury budou dávat zvýšené výtěžky DNA, pokud budou zpracovávány protokolem pro vysoký obsah. Protokol pro nízký obsah v kombinaci s malým elučním objemem (50 µl) lze použít, pokud se vyžaduje vysoká koncentrace DNA.

Minisada QIASymphony DSP DNA v kombinaci s protokolem Tissue_LC_200_V7_DSP a Tissue_HC_200_V7_DSP (uživatелеm validovaný pro použití s minisadou QIASymphony DSP DNA) pro purifikaci celkové DNA z kultivovaných buněk a bakteriálních kultur, je určena pro aplikace v molekulární biologii. Produkt není určen k diagnóze, prevenci ani léčbě nemocí.

Poznámka: Uživatel odpovídá za validaci účinnosti této kombinace, ať ji použije ve své laboratoři pro jakýkoli postup.

Protokol pro nízký obsah

Sada	Minisada QIASymphony DSP DNA (katalogové číslo 937236)
Materiál vzorku	Kultivované buňky a bakteriální kultury Doporučené maximální objemy vzorků: Buněčná kultura: 5×10^6 buněk Bakterie: 1×10^9 buněk
Název protokolu	Tissue_LC_200_V7_DSP
Výchozí kontrolní sada testu	ACS_Tissue_LC_200_V7_DSP
Eluční objem	50 µl, 100 µl, 200 µl nebo 400 µl
Vyžadovaná verze softwaru	Verze 4.0

Protokol pro vysoký obsah

Sada	Minisada QIASymphony DSP DNA (katalogové číslo 937236)
Materiál vzorku	Kultivované buňky a bakteriální kultury Doporučené maximální objemy vzorků: Buněčná kultura: 1×10^7 buněk Bakterie: 4×10^9 buněk
Název protokolu	Tissue_HC_200_V7_DSP
Výchozí kontrolní sada testu	ACS_Tissue_HC_200_V7_DSP
Eluční objem	100 μ l, 200 μ l nebo 400 μ l
Vyžadovaná verze softwaru	Verze 4.0

Požadované materiály, které nejsou součástí dodávky

Pro všechny typy vzorků

- pro minimalizaci obsahu RNA: RNáza A (zásobní roztok 100 mg/ml) (kat. čís. 19101)

Pro gramnegativní bakterie

- pufr ATL (kat. čís. 19076)

Pro grampozitivní bakterie

- pufr P1 (kat. čís. 19051)
- lysozym (zásobní roztok 100 mg/ml)

Pro kultivované buňky

- pufr P1 (kat. čís. 19051)

Zásuvka „Sample“ (Vzorek)

Typ vzorku	Kultivované buňky a bakteriální kultury
Vstupní objem vzorku	220 µl (vyžaduje se na vzorek, na protokol)*
Objem zpracovaného vzorku	200 µl
Zkumavky primárního vzorku	n/a
Zkumavky sekundárního vzorku	Další informace viz www.qiagen.com/goto/dsphandbooks .
Vložky	Závisí na typu použitých zkumavek; další informace získáte na www.qiagen.com/goto/dsphandbooks .

* Jak u protokolu pro nízký, tak pro vysoký obsah platí, že systém nerozpozná, zda je objem vzorku menší než 220 µl, protože přenos vzorků se provádí bez detekce hladiny kapaliny. Proto musíte zajistit, že vstupní objem vzorku je 220 µl.

n/a = neuvedeno.

Zásuvka „Reagents and Consumables“ (Reagencie a spotřební díly)

Poloha A1 a/nebo A2	Zásobník s reagensy
Poloha B1	n/a
Držák se stojánkem pro špičky 1–17	Filtrační špičky k jednorázovému použití 200 µl nebo 1500 µl
Držák na jednotkové krabice 1–4	Jednotkové krabice obsahující zásobníky pro přípravu vzorků nebo 8tyčové kryty

n/a = neuvedeno.

Zásuvka „Waste“ (Odpad)

Držák na jednotkové krabice 1–4	Prázdné jednotkové krabice
Držák odpadních sáčků	Odpadní sáček
Držák lahve na kapalný odpad	Prázdňá lahev na kapalný odpad

Zásuvka „Eluate“ (Eluát)

Eluční stojánek (doporučujeme použít chladicí pozici, drážka 1)	Další informace viz www.qiagen.com/goto/dsphandbooks .
---	--

Požadované plastové vybavení

Plastové vybavení	Jedna šarže, 24 vzorků*	Dvě šarže, 48 vzorků*	Tři šarže, 72 vzorků*	Čtyři šarže, 96 vzorků*
Jednorázové špičky s filtrem, 200 µl ^{†‡}	26	50	74	98
Jednorázové špičky s filtrem, 1500 µl ^{†‡}	72	136	200	264
Zásobníky pro přípravu vzorků [§]	21	42	63	84
8tyčové kryty [¶]	3	6	9	12

* Použití méně než 24 vzorků na šarži snižuje počet filtračních špiček k jednorázovému použití požadovaných na jeden běh.

† Stojánek na filtrační špičky pojme 32 filtračních špiček.

‡ Počet požadovaných filtračních špiček zahrnuje filtrační špičky pro 1 snímek inventáře na zásobník s reagenциemi.

§ Jednotková krabice pojme 28 zásobníků pro přípravu vzorku.

¶ Jednotková krabice pojme dvanáct 8tyčových krytů.

Poznámka: Udávaný počet filtračních špiček se liší od počtu zobrazeného na dotykové obrazovce v závislosti na nastavení. Doporučujeme načíst maximální možný počet špiček.

Eluční objem

Eluční objem se vybírá na dotykové obrazovce. V závislosti na typu vzorku a obsahu DNA se může konečný eluční objem snížit až o 15 µl vůči zvolenému objemu. Díky tomu, že se eluční objem může měnit, doporučujeme zkontrolovat aktuální objem eluátu při používání systému automatického nastavení kvantitativní analýzy, který před přenosem neověřuje eluční objem. Eluce při nižších objemech zvyšuje konečnou koncentraci DNA, ale mírně snižuje výtěžek. Doporučujeme používat eluční objem vhodný pro zamýšlenou aplikaci v dalších krocích.

Příprava materiálu vzorků

Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní plášť, rukavice na jedno použití a ochranné brýle. Další informace jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech (BL), které lze získat od dodavatele produktu.

Důležitý bod před zahájením

- Magnetické částice QIASymphony společně purifikují RNA a DNA, pokud jsou ve vzorku přítomny obě kyseliny. Chcete-li minimalizovat ve vzorku obsah RNA, přidejte RNázu A do vzorku v kroku uvedeném v příslušném protokolu předběžné úpravy.

Co je třeba udělat, než začnete

- Pokud používáte pufr ATL, zkontrolujte, zda neobsahuje precipitát. Bude-li to nezbytné, inkubujte 30 minut při 37 °C za občasného protřepávání, aby se precipitát rozpustil.
- Nastavte termomixer (ThermoMixer®) nebo třepačku-inkubátor na teplotu vyžadovanou pro příslušnou předběžnou úpravu.*

Kultivované buňky

Lze použít čerstvé i zmražené kultivované buňky. Doporučujeme použít protokol pro vysoký obsah až 1×10^7 buněk. Protokol pro nízký obsah povede k nižším výtěžkům DNA a doporučuje se používat pouze v kombinaci s malým elučním objemem (50 μ l), pokud se vyžaduje vysoká koncentrace DNA. Zmražené buněčné pelety je nutné resuspendovat v pufru P1, jak stanovuje protokol předběžné úpravy.

Protokol předběžné úpravy pro kultivované buňky

1. Odstřed'ujte maximálně 1×10^7 buněk při 300 x g po dobu 5 minut při pokojové teplotě (15–25 °C). Odeberte a zlikvidujte supernatant, přičemž dbejte, abyste nerozvířili buněčný pelet.
Poznámka: Buněčný pelet je možné skladovat při teplotě –20 až –70 °C pro další použití nebo jej lze použít okamžitě.
2. Resuspendujte pelet v 220 μ l pufru P1 a přeneste vzorek do 2 ml mikrocentrifugační zkumavky (nedodává se).
3. Přidejte 20 μ l proteinázy K a promíchejte poklepáním na zkumavku.
Poznámka: Použijte proteinázu K ze stojánku na enzymy minisady QIASymphony DSP DNA.
4. Vložte zkumavku do termomixeru nebo inkubátoru–třepačky a inkubujte při 56 °C s protřepáváním při 900 ot/min po dobu 30 minut až 2 hodin.
Poznámka: Doba lýzy závisí na typu a počtu buněk. Pokud nebude lýza dokončena po 2 hodinách, o čemž bude svědčit přítomnost nerozpustného materiálu nebo vysoce viskózních lyzátů, dobu lýzy lze prodloužit, případně nerozpustný materiál odstranit odstředěním, jak to popisuje krok 6. Lýza prováděná přes noc je možná a neovlivňuje nepříznivě přípravu vzorku.
5. Chcete-li minimalizovat ve vzorku obsah RNA, přidejte 4 μ l RNázy A (100 mg/ml) a inkubujte 2 minuty při pokojové teplotě (15–25 °C), než budete pokračovat krokem 6.

* Ujist

ěte se, že jsou přístroje kontrolovány, udržovány a pravidelně kalibrovány.

6. Pečlivě převedte 220 µl lyzátu do zkumavek, které jsou kompatibilní s nosičem vzorku QIASymphony SP.

Poznámka: Pokud lyzát obsahuje nedigerovaný materiál, před přenosem supernatantu do zkumavek jej odstředíte při plné rychlosti 2 minuty při pokojové teplotě. Úplný seznam kompatibilních zkumavek viz www.qiagen.com/goto/dsphandbooks. Doporučujeme používat 2 ml zkumavky (např. Sarstedt[®], katalogové číslo 72.693 nebo 72.608).

Bakterie

Lze použít čerstvé i zmražené bakteriální kultury. Doporučujeme použít protokol pro vysoký obsah až 4×10^9 buněk. Protokol pro nízký obsah povede k nižším výtěžkům DNA a doporučuje se používat pouze v kombinaci s malým elučním objemem (50 µl), pokud se vyžaduje vysoká koncentrace DNA. Bakteriální růst se obvykle měří jako optická hustota (OD) bakteriální kultury pomocí spektrálního fotometru. Naměřené hodnoty OD však výrazně závisí na typu použitého spektrálního fotometru a druhu hodnocených bakterií. Proto doporučujeme provést kalibraci spektrálního fotometru na základě korelace naměřených hodnot CD s počtem bakteriálních buněk. Zmražené pelety je nutné resuspendovat v pufru P1 (grampozitivní bakterie) nebo pufru ATL (gramnegativní bakterie), jak stanovují protokoly předběžné úpravy.

Protokol předběžné úpravy pro gramnegativní bakterie

1. Odstředováním po dobu 10 minut při 5000 x g a pokojové teplotě (15–25 °C) zpracujte maximálně 4×10^9 buněk. Odeberte a zlikvidujte supernatant, přičemž dbejte, abyste nerozvířili bakteriální pelet.

Poznámka: Buněčný pelet je možné skladovat při teplotě –20 až –70 °C pro další použití nebo jej lze použít okamžitě.

2. Resuspendujte bakteriální pelet v 220 µl pufru ATL a přeneste vzorek do 2 ml mikrocentrifugační zkumavky (nedodává se).

3. Přidejte 20 µl proteinázy K a promíchejte poklepáním na zkumavku.

Poznámka: Použijte proteinázu K ze stojánku na enzymy minisady QIASymphony DSP DNA.

4. Vložte zkumavku do termomixéru nebo inkubátoru–třepačky a inkubujte při 56 °C s protřepáváním při 900 ot/min po dobu 30 minut až 2 hodin.

Poznámka: Doba lýzy závisí na typu a počtu buněk. Pokud nebude lýza dokončena po 2 hodinách, o čemž bude svědčit přítomnost nerozpustného materiálu nebo vysoce viskózních lyzátů, dobu lýzy lze prodloužit, případně nerozpustný materiál odstranit odstředěním, jak to popisuje krok 6.

5. Chcete-li minimalizovat ve vzorku obsah RNA, přidejte 4 µl RNázy A (100 mg/ml) a inkubujte 2 minuty při pokojové teplotě, než budete pokračovat krokem 6.
6. Pečlivě převedte 220 µl lyzátu do zkumavek, které jsou kompatibilní s nosičem vzorku QIASymphony SP.

Poznámka: Pokud lyzát obsahuje nedigerovaný materiál, před přenosem supernatantu do zkumavek jej odstředíte při plné rychlosti 2 minuty při pokojové teplotě. Úplný seznam kompatibilních zkumavek viz www.qiagen.com/goto/dsphandbooks. Doporučujeme používat 2 ml zkumavky (např. Sarstedt, katalogové číslo 72.693 nebo 72.608).

Protokol předběžné úpravy pro grampozitivní bakterie

1. Odstředováním po dobu 10 minut při 5000 x g a pokojové teplotě (15–25 °C) zpracujte maximálně 4×10^9 buněk. Odeberte a zlikvidujte supernatant, přičemž dbejte, abyste nerozvířili bakteriální pelet.
Poznámka: Buněčný pelet je možné skladovat při teplotě –20 až –70 °C pro další použití nebo jej lze použít okamžitě.
2. Resuspendujte bakteriální pelet v 200 µl pufru P1 a přeneste vzorek do 2 ml mikrocentrifugační zkumavky (nedodává se).
3. Přidejte 20 µl lysozymu (100 mg/ml) a promíchejte poklepáním na zkumavku.
4. Vložte zkumavku do termomixéru nebo inkubátoru–třepačky a inkubujte při 37 °C s protřepáváním při 900 ot/min po dobu 30 minut až 2 hodin.
Poznámka: Doba lýzy závisí na typu a počtu buněk.
5. Přidejte 20 µl proteinázy K a promíchejte poklepáním na zkumavku.
Poznámka: Použijte proteinázu K ze stojánku na enzymy minisady QIASymphony DSP DNA.
6. Inkubujte s protřepáváním při 900 ot/min a teplotě 56 °C po dobu 30 minut.
7. Chcete-li minimalizovat ve vzorku obsah RNA, přidejte 4 µl RNázy A (100 mg/ml) a inkubujte 2 minuty při pokojové teplotě, než budete pokračovat krokem 8.
8. Pečlivě převedte 220 µl lyzátu do zkumavek, které jsou kompatibilní s nosičem vzorku QIASymphony SP.
Poznámka: Pokud lyzát obsahuje nedigerovaný materiál, před přenosem supernatantu do zkumavek jej odstředíte při plné rychlosti 2 minuty při pokojové teplotě. Úplný seznam kompatibilních zkumavek viz www.qiagen.com/goto/dsphandbooks. Doporučujeme používat 2 ml zkumavky (např. Sarstedt, katalogové číslo 72.693 nebo 72.608).

Aktuální licenční informace a odmítnutí odpovědnosti specifická pro výrobek jsou uvedeny v příslušné příručce pro sadu QIAGEN nebo příručce uživatele. Příručky pro sady QIAGEN a příručky uživatele jsou dostupné na www.qiagen.com nebo na požádání u technického servisu QIAGEN nebo místního distributora.

Ochranné známky: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony® (QIAGEN Group); Sarstedt® (Sarstedt AG and Co.); ThermoMixer® (Eppendorf AG). Registrované názvy, ochranné známky atd. použité v tomto dokumentu, a to i v případě, že takto nejsou výslovně označeny, nejsou považovány za zákonem nechráněné. 08/2015 HB-0977-S09-001
© 2015 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.

