ELISABETH PHARMACON, spol. s r.o.
Rokycanova 4437/5
615 00 Brno-Židenice, Česká republika
IČ: 26258412, DIČ: CZ26258412
Tel.: +420 542 213 851
E-mail: info@elisabeth.cz
www.elisabeth.cz

EliGene® FFPE Tissue DNA Isolation Kit
Návod k použití

Balení:

Kat. č.	Velikost balení
415050	50 Izolací

Skladování:

Všechny reagencie a komponenty kitu musejí být přepravovány při pokojové teplotě (15 - 30 °C). Proteináza K musí být po přepravě skladována při 2 - 8 °C. Při dodržení těchto skladovacích podmínek si kit plně udrží svou aktivitu, dokud neuběhne expirační doba uvedená na kitu.

Obsah

Úvod 2
Požadavky na vybavení 2
Obsah kitu 2
Preventivní opatření 3
Podrobný izolační protokol 3
Stručný izolační protokol 6
Řešení problémů 7

ELISABETH PHARMACON, spol. s r.o.
Rokycanova 4437/5
615 00 Brno-Židenice, Česká republika
IČ: 26258412, DIČ: CZ26258412
Tel.: +420 542 213 851
E-mail: info@elisabeth.cz
www.elisabeth.cz

Úvod

EliGene® FFPE Tissue DNA Isolation Kit je určen pro izolaci genomové DNA z parafinových a formalínem fixovaných tkání. Tkáň se uvolní úplným rozpuštěním vosku pufrem. V přítomnosti chaotropního činidla je DNA navázána na spin filtr, promývána a eluována v Tris-HCl pufru bez EDTA. DNA je připravena k použití v PCR, qPCR a sekvenování. Pro odstranění vosku není třeba používat xylen nebo další etanol. Všechny potřebné roztoky jsou obsaženy v kitu.

Inkubace při 90 °C částečně odstraňuje formaldehyd z uvolněné DNA, což zlepšuje výtěžky a amplifikaci DNA. Kvalita a výtěžek izolované DNA závisí na kvalitě FFPE tkáně, zdroji tkáně, stáří vzorku, tloušťce řezu a množství vosku v každém řezu. Měření koncentrace DNA závisí na zvoleném způsobu, např. spektrofotometrie měří jak dvojvláknovou, tak jednovláknovou DNA, zatímco fluorimetrie pomocí PicoGreen® (Molecular Probes, Inc.) měří pouze dvojvláknovou DNA. DNA izolovaná z FFPE tkáně je fragmentována více než z čerstvé nebo zmražené tkáně. To vede k nižší molekulové hmotnosti a rozmazaným bendům na gelu. Starší vzorky a vzorky nižší kvality vedou rovněž k většímu rozmazání bendů na gelu. Proto doporučujeme pomocí PCR amplifikovat kratší oblasti DNA.

Požadavky na vybavení

Mikrocentrifuga (12 000 x g)
Vortex
Termostat/Termoshaker s možností inkubace při 90 °C
Pipety: 50 – 750 µl

Obsah kitu

Komponenty	Množství (50 izolací)
Lysis Buffer FT1	11 ml
Binding Buffer FT2	12 ml
Binding Buffer FT3	12 ml
Wash Buffer FT4	27 ml
Wash Buffer FT5	27 ml
Elution Buffer FT6	6 ml
Proteinase K (20 mg/ml)	1 ml
1,5 ml Tubes	100 ks
Spin Filters (Units in 2 ml Collection Tubes)	50 ks
2 ml Collection Tubes	50 ks

Preventivní opatření

Při používání produktu prosím používejte ochranné rukavice a vyhněte se kontaktu reagencií s kůží. V případě kontaktu reagencií s kůží omyjte zasažené místo proudem tekoucí vody. Zabraňte požití. V případě kontaktu nebo náhodného požití nahlédněte do MSDS listů.
Reagencie označené jako hořlavé uchovávejte v bezpečné vzdálenosti od otevřeného ohně a jisker.

UPOZORNĚNÍ: Binding Buffer FT3, Wash Buffer FT4 a Wash Buffer FT5 jsou hořlavé.

Podrobný izolační protokol

Důrazně doporučujeme prostudovat si následující informace před prvním použitím EliGene® FFPE Tissue DNA Isolation Kitu.

Důležitá upozornění před použitím

- **Prosím noste rukavice po celý čas práce s kitem.**
- **Pokud je v Lysis Buffer FT1 a/nebo v Binding Buffer FT2 precipitát, zahřejte lahvičku s pufrem na 60 °C a rozpusťte ho.**
- **Pro efektivní eluci DNA ze spin filtru do Elution Buffer FT6 je klíčové odstranění zbytkového etanolu ze spin filtru.**
- **! Před zahájením izolace DNA si přečtěte kroky 3 a 4 (nejdříve zahřejte termotřepačku na 56 °C pro 1 hodinovou inkubaci, poté ho zahřejte na 90 ° C pro další inkubaci trvající 1 hodinu)!**

1. Přidejte 1 nebo více FFPE tkáňových řezů do 1,5 ml zkumavky (nepoužívejte více než 20 mg). Pokud byla plocha vzorku vystavena vzduchu, vyhoďte první 2 řezy pro lepší kvalitu izolované DNA.
2. Přidejte 210 µl Lysis Buffer FT1 a 20 µl roztoku proteinázy K. Promíchejte vzorek vortexováním.
   Poznámka: Proteináza K rozkládá buněčnou stěnu a umožňuje lýzu buňky. Inkubace není potřebná.
3. Vzorek přemístěte do termostatu a inkubujte při teplotě 56 ° C po dobu 1 hodiny.
4. Inkubujte při teplotě 90 ° C po dobu 1 hodiny.
   Poznámka: Pokud používáte pouze jeden termostat, ponechte vzorek při pokojové teplotě po 56 °C inkubaci a počkejte, až blok dosáhne 90 °C.

5. Centrifugujte vzorek 1 minutu při 12 000 x g. Přemístěte 200 µl lyzátu do nové 1,5 ml zkumavky.

   Poznámka: Chlazení vytváří tuhou vrstvu vosku na povrchu lyzátu. Opatrně odstraňte lyzát bez přenesení vosku.

6. Přidejte 220 µl Binding Buffer FT2 a zvortexujte, poté krátce stočte.

   Poznámka: Binding Buffer FT2 obsahuje chaotropní soli, které poskytují optimální podmínky pro vazbu DNA na spin filter, avšak ne pro organické non-DNA a anorganické složky.

7. Přidejte 220 µl Binding Buffer FT3 a zvortexujte, poté krátce stočte.

   Poznámka: Binding Buffer FT3 obsahuje chaotropní soli, které poskytují optimální podmínky pro vazbu DNA na spin filter, avšak ne pro organické non-DNA a anorganické složky.

8. Přemístěte lyzát do spin filtru a centrifugujte 1 minutu při 8 000 x g při pokojové teplotě.

   Poznámka: DNA se váže na membránu kolonky v spin filtru díky přítomnosti chaotropných solí. Kapalina ve zkumavce obsahuje nenavázaný buněčný materiál.

9. Vyjměte spin filtr a odstraňte roztok. Poté umístěte spin filtr zpět do stejné 2 ml Collection Tube.

10. Přidejte 500 µl Wash Buffer FT4 do spin filtru. Centrifugujte 1 minutu při 8 000 x g.

    Poznámka: Wash Buffer FT4 je promývací roztok na bázi etanolu, který pročistí DNA navázanou na spin filtru od zbylých nečistot.

11. Vyjměte spin filtr a odstraňte roztok. Poté umístěte spin filtr zpět do stejné 2 ml Collection Tube.

12. Přidejte 500 µl Wash Buffer FT5 do spin filtru. Centrifugujte 1 minutu při 8 000 x g.

    Poznámka: Wash Buffer FT4 je promývací roztok na bázi etanolu, který pročistí DNA navázanou na spin filtru od zbylých nečistot.

13. Vyjměte spin filtr a odstraňte proteklý roztok. Poté umístěte spin filtr zpět do stejné 2 ml Collection Tube.

14. Centrifugujte 2 minuty při 12 000 x g pro úplné vyschnutí membrány spin filtru.

Poznámka: Membrána spin filtru je zcela vysušena od etanolových zbytků pro zvýšení výtěžnosti DNA v elučním kroku.

15. Opatrně vyjměte spin filtr a přemístěte ho do nové 2 ml Collection Tube (součástí balení).
16. Přidejte 50 - 100 µl Elution Buffer FT6.
17. Inkubujte 1 minutu při pokojové teplotě. Centrifugujte 1 minutu při 10 000 x g.

    Poznámka: Pro zvýšení výtěžnosti inkubujte 5 minut při 65 °C.
18. Vyjměte spin filtr. Izolovaná DNA ve zkumavce je nyní připravena k použití pro další aplikace.

ELISABETH PHARMACON, spol. s r.o.
Rokycanova 4437/5
615 00 Brno-Židenice, Česká republika
IČ: 26258412, DIČ: CZ26258412
Tel.: +420 542 213 851
E-mail: info@elisabeth.cz
www.elisabeth.cz

Stručný izolační protokol



1. Přidejte 1 nebo více FFPE tkáňových řezů do 1,5 ml zkumavky (nepoužívejte více než 20 mg).
2. Přidejte 210 µl Lysis Buffer FT1 a 20 µl proteinázy K. Vzorek promíchejte vortexováním.
3. Vzorek přemístěte do termostatu a inkubujte 1 hodinu při 56 ° C.
4. Inkubujte 1 hodinu při 90 ° C.
5. Centrifugujte vzorek 1 minutu při 12 000 x g. Přemístěte 200 µl lyzátu do nové 1,5 ml zkumavky.
6. Přidejte 220 µl Binding Buffer FT2 a zvortexujte, poté krátce stočte.
7. Přidejte 220 µl Binding Buffer FT3 a zvortexujte, poté krátce stočte.
8. Přemístěte lyzát do spin filtru a centrifugujte 1 minutu při 8 000 x g při pokojové teplotě.
9. Vyjměte spin filtr a odstraňte roztok. Poté umístěte spin filtr zpět do stejné 2 ml Collection Tube.
10. Přidejte 500 µl Wash Buffer FT4 do spin filtru. Centrifugujte 1 minutu při 8 000 x g.
11. Vyjměte spin filtr a odstraňte roztok. Poté umístěte spin filtr zpět do stejné 2 ml Collection Tube.
12. Přidejte 500 µl Wash Buffer FT5 do spin filtru. Centrifugujte 1 minutu při 8 000 x g.
13. Vyjměte spin filtr a odstraňte roztok. Poté umístěte spin filtr zpět do stejné 2 ml Collection Tube.
14. Centrifugujte 2 minuty při 12 000 x g pro úplné vyschnutí membrány spin filtru.
15. Opatrně vyjměte spin filtr a přemístěte ho do nové 2 ml Collection Tube (součástí balení).
16. Přidejte 50 - 100 µl Elution Buffer FT6.
17. Inkubujte 1 minutu při pokojové teplotě. Centrifugujte 1 minutu při 10 000 x g.
18. Vyjměte spin filtr. Izolovaná DNA ve zkumavce je nyní připravena k použití pro další aplikace.

ELISABETH PHARMACON, spol. s r.o.
Rokycanova 4437/5
615 00 Brno-Židenice, Česká republika
IČ: 26258412, DIČ: CZ26258412
Tel.: +420 542 213 851
E-mail: info@elisabeth.cz
www.elisabeth.cz

Řešení problémů

Pokud se DNA neamplifikuje

- Ujistěte se, že jste zkontrolovali výtěžky DNA a čistotu gelovou elektroforézou, UV spektrofotometrem nebo fluorimetrem (pomocí PicoGreen®, Molecular Probes, Inc.). Nadbytečné množství DNA by inhibovalo PCR reakci.
- Ujistěte se, že jste správně promíchali Wash Buffer FT4 a FT5 když se delší dobu nepoužívali. Složky izolačních roztoků se mohly oddělit.
- Zřeďte templátovou DNA.

Eluovaný vzorek DNA je zbarvený nebo ucpává spin filtr

- Pokud dodržujete doporučení v těchto pokynech, nesmí být v izolované DNA pozorováno žádné zbarvení.
- Neizolujte více než 20 mg FFPE tkáně.

Nízká výtěžnost DNA

- Vezměte prosím na vědomí, že výtěžky a kvalita DNA se budou lišit a výtěžek bude nižší ve srovnání s čerstvou nebo zmrazenou tkání. Kvalita a koncentrace izolátu DNA je ovlivněna kvalitou FFPE tkáně, zdrojem tkáně, stářím vzorku, tloušťkou řezu a množstvím vosku v každém řezu.
- Vezměte v úvahu, že různé měřicí metody vedou k různým koncentracím v závislosti na tom, zda se použije UV spektrometrie nebo fluorometrie. Spektrofotometrie měří jak dvouvláknovou, tak jednovláknovou DNA, zatímco fluorometrie pomocí PicoGreen® (Molecular Probes, Inc.) měří pouze dvojvláknovou DNA.
- Dbejte na to, aby byl vzorek dobře promíchán po přidání Lysis Buffer FT1.
- Nastavte správně teplotu pro lýzu.
- Pro zachování integrity DNA zajistěte, aby nedošlo k překročení 90 °C.
- Nepřeskakujte krok odstranění zbytkového etanolu ze spin filtru. Je to klíčový krok pro efektivní eluci DNA ze spin filtru do Elution Buffer FT6.

DNA má nízký poměr A260/280

Poměr A260/280 pro čistou DNA by se měl pohybovat v rozmezí 1,7 – 1,9. Poměr nižší než 1,6 může poukazovat na znečištění DNA proteiny. Máte-li problémy s nízkým poměrem A260/280 zkontrolujte následující:

- Ujistěte se, že jste provedli promývací krok s Wash Buffer FT5 k odstranění proteinů.
- Používáte-li Nanodrop, používejte jako blank Elution Buffer FT6.

DNA vyplavala z jamek při nanášení na gel

- Ve vzorku zůstaly zbytky Wash Buffer FT5. Nepřeskakujte krok odstranění zbytkového etanolu ze spin filtru. Zároveň můžete prodloužit dobu vysoušení centrifugací na 3 minuty.

Koncentrování DNA

Finální množství eluované DNA je 50 - 100 µl. DNA může být koncentrována přidáním 10 µl 3 M acetátu sodného (pH = 5,2) a převracením zkumavky 3 – 5krát k promíchání. Poté přidejte 200 µl studeného 100% etanolu, opět převracením zkumavky 3 – 5krát promíchejte a centrifugujte 15 minut při 12 000 x g a pokojové teplotě. Odstraňte supernatant a promyjte pelet DNA 70% etanolem. Zbylý etanol nechejte odpařit pomocí exsikátoru a resuspendujte DNA na požadovaný objem pomocí PCR vody nebo pufru.

Výrobce:

ELISABETH PHARMACON, spol. s r. o.
Rokycanova 4437/5, Brno-Židenice 615 00
info@elisabeth.cz | www.elisabeth.cz | tel.: +420 542 213 851

REF	Katalogové číslo		Skladovací podmínky (teplotní limity)
LOT	Číslo šarže		Výrobce
	Datum expirace	Σ	Počet reakcí v balení