



EliGene® Viral RNA/DNA FAST Isolation Kit

Návod k použití

BALENÍ:

Kat. č.	Balení:
409100	100 izolací

Skladování a doba použitelnosti:

Všechny reagensy a komponenty kitu musejí být skladovány při pokojové teplotě (15 - 30 °C).

Při dodržení těchto skladovacích podmínek si kit plně udrží svou aktivitu, dokud neuběhne expirační doba uvedená na obalu.

Účel použití

EliGene® Viral RNA/DNA FAST Isolation Kit je určen pro rychlou (15min) izolaci virové RNA a DNA (nukleových kyselin – NK) ze sčěrů z nosohltanu, bukalních sčěrů, sputa a slin pomocí speciálně vyvinuté technologie pro odstranění inhibitorů. Izolace je speciálně navržena pro použití na vzorky s nízkým obsahem nukleových kyselin. Izolovaná NK vykazuje vysokou čistotu a je tudíž vhodná pro amplifikační techniky jako RT-PCR virových NK v klinických vzorcích.

Princip metody

Princip izolace spočívá v lýze virových partikulí za pomoci detergentů. Za přítomnosti chaotropního činidla je nukleová kyselina navázána na spin kolonku (filtr), promyta a vypláchnuta (eluce) TRIS-HCl puforem bez EDTA.

Izolovaná NK je připravena pro přímé použití do RT-PCR, RT-qPCR i jiných aplikací.

Obecný úvod

Diagnostika virových onemocnění dýchacích cest se zaměřuje na detekci virových nukleových kyselin pomocí DNA detekčních metod. Tyto metody většinou vyžadují virové nukleové kyseliny izolované z klinického materiálu a prosté inhibitorů reverzní transkriptázy a DNA polymerázy. Existuje více postupů izolace nukleových kyselin z klinického materiálu, které mohou být založeny na principu paramagnetických částic, silica kolonek, filtrace atd. Technologie silica kolonek umožňuje rychlé odstranění PCR inhibitorů snadným promytím nukleových kyselin vázaných k filtru za dodržení vysoké citlivosti zachytit i malé koncentrace nukleových kyselin.



Požadovaný materiál, který není součástí balení:

100 x 1.5 ml zkumavky s víčky pro lýzu a zpracování vzorků.
100 x mikrozukumavky s víčky používané laboratoří pro skladování izolované NK
13 ml 96% etanolu pro molekulární biologii

Požadované vybavení:

Mikrocentrifuga (12,000 x g)
Vortex
Stojánek na mikrozukumavky
Sada pipet: 50 – 1000 µl

Obsah soupravy:

Komponenty	Množství (100 izolací)
Lysis Buffer Stock Solution (zásobní roztok)	22 ml + přidat Solution M
Wash Buffer 1 (promývací pufr 1)	53 ml
Wash Buffer 2 (promývací pufr 2)	40 ml + přidat 13 ml 96% etanolu*
Elution Buffer (eluční pufr)	6 ml
Solution M (roztok M)	110 µl
Spin Filters (kolonky ve 2 ml zkumavkách)	100 ks
2 ml Collection Tubes (zkumavky bez víčka)	200 ks

*13 ml 96% etanolu není součástí balení

UPOZORNĚNÍ:

Předpříprava roztoků, před použitím.

Na každý den si připravte čerstvý pracovní roztok Lyzačního roztoku smícháním 5 µl Solution M + 1 ml Lysis Buffer zásobního roztoku. Přidání Solution M do Lyzačního pufru provádějte v digestoři! V případě, že v jeden den plánujete spotřebovat celou soupravu na 100 izolací, smíchejte celý objem Solution M se zásobním Lysis Buffer Stock Solution.

Udržujte připravený Lyzační roztok celou dobu při pokojové teplotě!

Připravený Lyzační roztok je stabilní při pokojové teplotě po dobu 24 hodin.

Přidejte 13ml 96% etanolu do Wash Buffer 2 před prvním použitím! Používejte pouze etanol určený pro molekulární biologii, eventuálně v čistotě p.a.



Bezpečnostní opatření:

Při práci se soupravou používejte rukavice. Doporučuje se pracovat v BIO-hazard boxu. Vyhněte se jakémukoliv kontaktu kůže s reagensy. V případě kontaktu kůže s reagensy zasažené místo důkladně opláchněte vodou.

Nepolykejte reagensy. V případě náhodného užití nebo kontaktu s reagensy pročtěte MSDS protokol, který je k dispozici na vyžádání na telefonu 542 213 851 nebo na webových stránkách www.elisabeth.cz.

Reagensy označené jako hořlavé by měly být drženy od otevřeného plamene a ohně.

Nemíchejte komponenty z rozdílných sad souprav.

Lyzační roztok a Wash Buffer 2 nejsou připraveny ihned k použití a je nutná jejich předpříprava - viz UPOZORNĚNÍ výše.

Odběr vzorku, zpracování a uchovávání

Stěry z nosohltanu a bukalní sliznice:

Uvedené vzorky odebírejte dle standardního protokolu do odběrových zkumavek.

Doporučené odběrové tampony:

FLOQSwabs (Copan) – tampony ponořit do UTM – (Universal Transport Medium, Copan)

Darcon swap – tampony ponořit do transportního média pro viry MicroTest™ M4RT nebo MicroTest™ M6 (Termo Scientific)

Jiné odběrové sady na bázi polymerových materiálů s transportním médiem pro viry.

Nepoužívejte bavlněné tampony z důvodu možné inhibice PCR reakce. Transportní médium viry naředí a u nízkých koncentrací virů může toto naředění způsobit falešně negativní výsledky.

Jako alternativu k transportnímu médiu pro viry lze použít lyzační pufr, kdy odběrové tampony jsou zalamovány přímo do lyzačního pufru ředěného 1:1 vodou pro molekulární biologii bez přidaného roztoku M (Solution M). Solution M přidejte až těsně před izolací dle postupu uvedeného níže.

Vzorky by měly být přepravovány do laboratoře při 4 °C (modrý led). Jsou stabilní minimálně 72 hodin od odběru vzorků při 4 °C. V případě, že nemáte možnost transportovat výtěry do laboratoře při 4 °C, je možné přepravovat vzorky při pokojové teplotě do šesti hodin.

Pro delší skladování vzorků než 72 hodin zmrazte vzorek na -20 °C.

Sputum a sliny:

Uvedené vzorky odebírejte dle standardního protokolu do odběrových zkumavek.



V laboratoři naředte sputum nebo sliny s PBS pufrem nebo fyziologickým roztokem v poměru 1:1. V případě vysoké hustoty můžete přidat ještě jeden díl PBS nebo fyziologického roztoku. Vzorek poté řádně zvortexujte a centrifugujte při 12,000 x *g* po dobu 2 minut. Poté odeberte z vrchní části 200 mikrolitrů supernatantu, které použijte pro další izolaci.

Vzorky sputa a slin by měly být přepravovány do laboratoře při 4 °C (modrý led). Pro delší skladování vzorků než 48 hodin zmrazte vzorek na -20 °C.

Izolační protokol postup

Důrazně doporučujeme přečíst si tento návod před prvním použitím **EliGene® Viral RNA/DNA FAST Isolation Kit**

Používejte rukavice po celou dobu práce s kitem.

Důkladně odstraňte zbytkový etanol ze spin kolonky před elucí, je to kritické pro úspěšnost výsledků.

1. Napipetujte 200 µl vzorku (**transportní médium nebo ředěné sputum nebo sliny**) do 1.5 ml zkumavek (nejsou v balení).
2. **Ujistěte se, že máte připravený čerstvý Lyzační roztok smícháním dle postupu uvedeném v „UPOZORNĚNÍ“**

Přidejte 200 µl **lyzačního roztoku** do 1,5 ml zkumavky se vzorkem (200 µl) z kroku 1., zavřete víčkem a vortexujte 10 sekund. V tomto kroku můžete před vortexováním přidat vnitřní kontrolu dle návodu u použitého detekčního kitu.

V případě, že jste odběrový tampon vložili přímo do ředěného lyzačního pufru, použijte veškerý objem pufru po vytažení tamponu a přidejte do něj 1 µl roztoku M (Solution M), zavřete víčkem a vortexujte 10 sekund. V tomto kroku můžete před vortexováním přidat vnitřní kontrolu dle návodu u použitého detekčního kitu.

Poznámka: Lyzační roztok slouží ke kompletní lýze virů i buněk a obsahuje detergenty a jiné speciální reagenty usnadňující lýzu a navázání NK na silika membránu kolonky.

3. Krátce stočte pro odstranění tekutiny z víčka a přepipetujte obsah do kolonky ve sběrné zkumavce a vložte do centrifugy.

Centrifugujte při 12,000 x *g* po dobu 1 minuty.

Filtrát vylejte, sběrnou zkumavku nevyhazujte a použijte ji znovu.

Poznámka: NK se naváže na silika membránu na spin kolonce za pomoci chaotropního činidla.

Filtrát obsahuje nenávané zbytky buněčných struktur např. denaturované proteiny.



4. Přidejte 500 µl **Wash Buffer 1** do kolonky a centrifugujte při 12,000 x g po 1 minutu. Filtrát vylejte a sběrnou zkumavku nevyhazujte a použijte ji znovu.

Poznámka: Wash Buffer 1 je promývací roztok sloužící k odstranění zbytkových nečistot z NK navázaných na kolonce.

5. Přidejte 500 µl **Wash Buffer 2** do kolonky. **Ujistěte se, že jste si při prvním použití přidali do Wash pufru 2 předepsané množství etanolu.**

Centrifugujte při 12,000 x g po 1 minutu.

Filtrát vylejte a sběrnou zkumavku vyhodte také.

Poznámka: Wash Buffer 2 je promývací roztok na bázi etanolu k odstranění zbytkových nečistot z NK navázaných na kolonce.

6. Vložte kolonku do nové sběrné zkumavky (součást balení) a centrifugujte opět při 12,000 x g po 1 minutu pro úplné vysušení membrány od etanolu.

Poznámka: Pouze kompletně vysušená kolonka od zbytků etanolu umožní maximální uvolnění NK z membrány v posledním kroku.

7. Opatrně vložte kolonku do nové sběrné zkumavky (součást balení)

8. Přidejte 50 µl **Elučního pufru (Elution Buffer)**. Nechte stát 1 minutu při pokojové teplotě.

9. Centrifugujte při 12,000 x g po 1 minutu.

10. Odstraňte kolonku.

NK ve sběrné zkumavce je nyní připravena pro použití v dalších aplikacích.

Přepipetujte roztok nukleových kyselin do zkumavky s víčkem (není v balení), kterou standardně používáte pro skladování NK ve vaší laboratoři.

Poznámka: Eluční pufr uvolní NK z kolonky, a ta se vypláchne do sběrné zkumavky. Nukleové kyseliny jsou uvolněny z membrány a neobsahují soli ani etanol.

Funkční charakteristiky

Souprava byla testována pro izolaci virových nukleových kyselin, původce nemoci chřipky, virové hepatitidy B, virové hepatitidy C, koronaviru SARS-CoV-2 z klinických vzorků jako buňkové stěry, stěry z nosohltanu, sliny a sputum. Následné testování pomocí Real-Time PCR analýz a srovnání s jinými komerčními metodami, ověřilo vysoký výtěžek virové NK ze vzorku.

Souprava EliGene® Viral RNA/DNA FAST Isolation Kit určená pro izolaci virových nukleových kyselin ze vzorků stěrů z nosohltanu, sliznice ústní, slin a sputa vykázala na 15 klinických vzorcích 100% shodu v



detekci RNA viru SARS-CoV-2 a chřipkových virů ve srovnání s konkurenčním izolačním postupem. Dále byla prokázána 100% reprodukovatelnost výsledků. Na 2000 klinických vzorcích stěrů z nosohltanu byla inhibice následné PCR reakce pozorována pouze u 0,2% izolací.

Obecná varování a bezpečnostní opatření

Tato souprava je určena pouze pro in vitro použití.

- SARS-CoV-2 je velmi nebezpečný patogen, dodržujte aktuální nařízení a doporučení WHO pro laboratoře BSL2+ nebo BSL3
- Laboratorní ochranné rukavice a respirátory FFP3 jsou nezbytné pro práci s koronaviry. Pracujte prosím v příslušných Biohazard boxech. Také odstředování vzorků musí být prováděno v Biohazard boxech. Mějte na paměti, že i RNA některých virů může způsobit infekci.
- Pracujte se všemi biologickými vzorky jako s potenciálně infekčním materiálem. Vyhněte se přímému kontaktu s biologickými vzorky. Vyhněte se rozlití vzorků a tvorbě aerosolů.
- Všechny **centrifugy**, mini centrifugy a vortexy **používejte pouze v Biohazard boxu**, abyste zabránili kontaminaci aerosolem.
- Jakýkoliv materiál, který přišel do styku s biologickými vzorky, musí být dekontaminován 3% chlornanem sodným po dobu nejméně 30 minut anebo autoklávován při 121 °C nejméně 60 minut před umístěním do odpadu.
- Všechny použité pomůcky, špičky a pracovní materiály a oděvy považujte za **potencionálně infekční a zlikvidujte podle platných předpisů** a doporučení pro manipulaci s vysoce infekčním odpadem.
- Pracujte se všemi reagensy a používaným materiálem s vědomím, že mohou přenášet infekční agens. Vyhněte se přímému kontaktu s reagensy. Odpad musí být likvidován v souladu s adekvátními bezpečnostními předpisy. Spotřební materiál musí být spálen. Tekuté odpady obsahující kyseliny nebo zásady musejí být před likvidací zneutralizovány.
- Používejte vhodné ochranné oblečení, rukavice a ochranu očí a obličeje.
- Nikdy nepipetujte roztoky ústy.
- Nejezte, nepijte. Nekuřte a neaplikujte kosmetiku v laboratorních prostorách.
- Řádně si umyjte ruce po práci se vzorky a reagensy.
- Pracujte ve standardním režimu oddělených místností: izolace, PCR set up, amplifikace, detekce
- Likvidujte zbylé reagensy a odpad v souladu s adekvátními bezpečnostními předpisy.



- Před započítím práce si řádně přečtěte veškeré instrukce uvedené v tomto návodu.
- Při práci postupujte přesně podle návodu k použití.
- Kit nepoužívejte po době expirace, která je uvedena na obalu.
- Používejte pouze reagenty poskytované v rámci kitu a reagenty doporučené výrobcem.
- Nemíchejte reagenty z různých šarží!
- Nepoužívejte reagenty ze souprav jiných výrobců!
- Neměňte doporučené protokoly analýzy!

Varování a bezpečnostní opatření pro molekulární biologii

- Molekulárně-biologické postupy jako jsou izolace nukleové kyseliny, reverzní transkripce, amplifikace a detekce vyžadují kvalifikovaný personál z důvodu zamezení chybných výsledků, speciálně vzhledem k degradaci nukleových kyselin obsažených ve vzorcích a k možné kontaminaci.
- Je nezbytné mít k dispozici samostatnou místnost pro extrakci nukleových kyselin, pro přípravu amplifikačních směsí a pro detekci. Zabezpečte, aby se produkt amplifikace nikdy nedostal do místnosti pro extrakci nukleových kyselin nebo do místnosti pro přípravu amplifikačních směsí.
- Je nezbytné používat vhodné laboratorní pláště, rukavice a pomůcky určené pro izolaci nukleových kyselin nebo pro přípravu amplifikačních směsí nebo pro detekci. Nikdy nepřenášejte laboratorní pláště, rukavice a pomůcky mezi místnostmi pro extrakci nukleových kyselin, pro přípravu amplifikačních směsí a pro detekci.
- S produkty po amplifikaci je třeba zacházet maximálně opatrně, aby nedošlo k jejich rozptýlení do prostředí laboratoří a k případné kontaminaci nově testovaných vzorků. Automatické pipety užívané pro práci s PCR produkty musejí být používány pouze pro tuto specifickou práci a musejí být používány špičky s filtrem.

P280 Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranné brýle / obličejový štít.

P281 Podle potřeby používejte osobní ochranné prostředky.

Literatura

Tansuphasiri U, Boonrat P, Rienthong S. Direct identification of Mycobacterium tuberculosis from sputum on Ziehl-Neelsen acid fast stained slides by use of silica-based filter combined with polymerase chain reaction assay. J Med Assoc Thai. 2004 Feb;87(2):180-9.

Liu X, Harada S. DNA isolation from mammalian samples. Curr Protoc Mol Biol. 2013 Apr;Chapter 2:Unit2.14. doi: 10.1002/0471142727.mb0214s102.



Vysvětlivky



Katalogové číslo



Horní teplotní hranice



Číslo šarže



Spotřebujte do (poslední den v měsíci).



Diagnostický zdravotnický prostředek *in vitro*



V souladu s požadavky Evropské Direktivy 98\79\EEC pro diagnostické zdravotnické prostředky *in vitro*.



Obsah dostatečný pro "N" testů



Prosím, řiďte se instrukcemi pro použití.



Výrobce

Výrobce

ELISABETH PHARMACON, spol. s r.o.

Rokycanova 4437/5, 615 00 Brno, Česká republika Tel.: +420 542 213 851, +420 542 213 827

E-mail: info@elisabeth.cz