



EliGene[®] Urine Isolation Kit

REF 90051-50 (pro 50 vzorků)

Složení soupravy:

Roztok Proteinázy K	1 ml
Roztok MI3	12 ml
Roztok MI4	12 ml
Roztok MI5	27 ml
Roztok MI6	27 ml
Roztok MI7	12 ml
Kolonky	50 ks
2,0 ml zkumavky	100 ks
1,5 ml zkumavky	50 ks
Návod k použití	

Skladování a doba použitelnosti:

Všechny reagenty 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 obalu.

Účel použití

EliGene[®] Urine Isolation Kit je určen pro izolaci genomické a mitochondriální DNA z plné krve (čerstvé, zamražené nebo skladované při 4 °C), stěrů, spermatu, kultivovaných buněk a moče. Tento kit je optimalizován pro použití s EliGene[®] RealTime PCR kity.

Obecný úvod

Při izolaci DNA z klinických vzorků se můžeme setkat s celou řadou problémů zahrnující například inhibice nebo nízkou citlivost. EliGene[®] Urine Isolation Kit je navržen tak, aby předešel problémům spojených s inhibicí a nízkým výtěžkem izolace DNA. Celkový čas izolace zahrnující inkubace je přibližně 1–2 hodiny. Kit obsahuje všechny komponenty nezbytné pro izolaci DNA včetně mikrozkuvek. Není třeba přidávat etanol ani jiné chemikálie.

Vzorek

Klinický materiál: Plná krev (čerstvá, zamražená nebo skladovaná při 4 °C), stěry, sperma, kultivované buňky a moč.

Nezbytné vybavení pro laboratoř

- Automatické pipety a sterilní špičky s filtrem bez DNA, RNA a bez DNáz a RNáz (doporučujeme použít plast s CE certifikací pro diagnostické účely), vortex.
- Sterilní stojánek bez DNA, RNA a bez DNáz a RNáz.
- Vodní lázeň nebo suchý blok na 65 °C.
- Mikrocentrifuga (13 000 x g).
- BIOhazard box.
- Laboratorní bezpečnostní rukavice.



Upozornění

Při používání kitů používejte rukavice. Doporučuje se pracovat v BIOhazard 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. Vyhněte se kontaktu reagensů s bělidly nebo dalšími oxidačními činidly. Tento kit je určen pro diagnostické použití.

V případě, že použijete Proteinázu K, která není součástí tohoto kitu, přidávejte 20 µl Proteinázy K v rámci protokolu.

Protokol

1. a) **Moč:** Vortexujte celý objem moče 15 sekund. Přeneste 10 ml zvortexovaného vzorku moče do 15 ml zkumavky. Centrifugujte moč při 6000 x g po dobu 20 minut, odstraňte supernatant a pelet resuspendujte v 200 µl vody pro molekulární biologii. Poté přidejte **200 µl roztoku MI3**, **20 µl Proteinázy K** a interní kontrolu ze soupravy pro detekci patogenu. Vortexujte 15 sekund.

Inkubujte 15 minut při 65 °C.

Centrifugujte lyzát 5 minut při 6000 x g. Přeneste supernatant do nové mikrozukavky a pelet vyhoďte.

Přidejte k supernatantu **210 µl roztoku MI4**. Vortexujte 15 sekund. Krátce stočte, abyste odstranili kapky z víčka mikrozukavky a přeneste lyzát na centrifugační kolonku. Centrifugujte 1 minutu při 13 000 x g.

- b) **Krev:** Přidejte **20 µl Proteinázy K do 200 µl krve** nebo jiné tělní tekutiny v 1,5 ml zkumavce (příložená).

Přidejte **200 µl roztoku MI3**, interní kontrolu ze soupravy pro detekci patogenu a vortexujte 15 sekund.

Inkubujte 15 min při 65 °C. Krátce stočte, abyste odstranili kapky z víčka mikrozukavky.

Přidejte **210 µl roztoku MI4** a vortexujte 15 sekund. Krátce centrifugujte, abyste odstranili kapky z víčka mikrozukavky a přeneste veškerý obsah mikrozukavky do kolonky.

Centrifugujte 1 minutu při 13 000 x g.

- c) **Stěry: Cervikální stěry, uretrální stěry, stěry ze spojivky, stěry z konečníku**

Všechny tyto vzorky musejí být odebrány před nasazením antibiotik v souladu se standardním postupem do odběrových zkumavek s transportním médiem pro uchovávání chlamydií (kit byl validován pro transportní média MicroTest M4RT Transport a remel MicroTest M4 Transport). Vzorky v těchto transportních médiích by měly být převáženy do laboratoře při 4 °C. Vzorky mohou být poté skladovány až sedm dní při 4 °C.

Doporučený postup pro izolaci vzorků ze stěrů:

Před izolací DNA pořádně vortexujte odběrovou zkumavku po dobu 10 sekund. Otevřete zkumavku a o stěny zkumavky vymačkejte roztok z odběrového tampónu. Poté tampón vyhoďte.

Odběrovou zkumavku centrifugujte 15 minut při 6000 x g. Pokud nemáte centrifugu na odběrové zkumavky, rozdělte médium do dvou 1,5 ml mikrozukavek a centrifugujte. (Mikrozukavky mohou být alternativně centrifugovány 10 minut při 10 000 x g).

Odsajte supernatant. Z EliGene[®] Urine Isolation Kitu přidejte k peletu **200 µl roztoku MI3** a 200 µl vody pro molekulární biologii a pelet pomocí pipety resuspendujte (pokud používáte pro centrifugaci mikrozukavky, nejprve resuspendujte pelet v jedné zkumavce s danými objemy roztoků a poté resuspendujte pelet ve druhé mikrozukavce v roztoku z první mikrozukavky). Následně ke vzorku přidejte **20 µl Proteinázy K** a interní kontrolu ze soupravy pro detekci patogenu.

Vortexujte 15 sekund.



Inkubujte 15 minut při 65 °C.

Krátce stočte a přidejte k lyzátu **210 µl roztoku MI4**.

Vortexujte 15 sekund. Krátce stočte, abyste odstranili kapky z víčka mikrozkuhavky a přeneste lyzát na centrifugační kolonku.

Centrifugujte 1 minutu při 13 000 x g.

d) *Sperma*: Pro DNA izolaci ze spermatu použijte EliGene® Sperm Isolation Supplement (Cat. No. 90051-50-SPE) nabízený společností ELISABETH PHARMACON a následujte instrukce dodávané s kitem. EliGene® Sperm Isolation Supplement obsahuje speciální pufr optimalizované pro izolaci DNA ze spermatu.

Další kroky izolace společné pro všechny typy vzorků:

2. Přeneste kolonku do nové 2,0 mikrozkuhavky.
3. Do kolonky **přidejte 500 µl roztoku MI5**. Centrifugujte 30 sekund při 13 000 x g.
4. Vyjměte kolonku z mikrozkuhavky, obsah mikrozkuhavky vylijte do odpadu a vraťte do ní kolonku.
5. Do kolonky **přidejte 500 µl roztoku MI6**. Centrifugujte 30 sekund při 13 000 x g.
6. Vyjměte kolonku z mikrozkuhavky, obsah mikrozkuhavky vylijte do odpadu a vraťte do ní kolonku.
7. Centrifugujte opět 30 sekund při 13 000 x g, aby došlo k vysušení membrány.
8. **Opatrně vyjměte kolonku** a přeneste ji do nové 2,0 mikrozkuhavky aniž byste se dotkli roztoku MI6 na dně původní mikrozkuhavky.
9. **Přidejte 100 µl roztoku MI7**. Pro zvýšení výtěžku DNA inkubujte 5 minut při 65 °C.
10. Centrifugujte 1 minutu při 13 000 x g.
11. Odstraňte kolonku. Genomická DNA je nyní připravena pro různé aplikace.

Interpretace výsledků

Celý proces izolace DNA musí být kontrolován pomocí vnitřní kontroly. Vnitřní kontrola poskytne informaci o účinnosti DNA izolace a o přítomnosti případných inhibitorů. V případě inhibovaných vzorků je nejlepší provést novou izolaci DNA.

Upozornění

Kontaminace laboratorního prostoru je také možná. Používejte proto zvlášť pipety pro MasterMixy, pipety pro pozitivní kontroly a samostatné pipety na DNA vzorky. Dodržujte všechna doporučení pro laboratoře DNA analýz.

Omezení metody

Výsledky získané pomocí tohoto produktu jsou závislé na správném odběru, transportu, uchování a zpracování vzorků. K zamezení chybných výsledků je nutné dodržovat pokyny uvedené v tomto návodu.

K zamezení chybných výsledků musí být tento produkt používán osobou zkušenou v provádění molekulárně-biologických metod, jako jsou izolace, amplifikace a detekce nukleových kyselin.

K zamezení falešně pozitivních výsledků je nutné oddělit místa pro izolaci/přípravu amplifikační reakce a pro amplifikaci/detekci produktů amplifikace.

Získané výsledky musejí být interpretovány s ohledem na výsledky dalších laboratorních testů (kultivace, mikroskopie, atd.) a s ohledem na klinický stav pacienta.



Varování a bezpečnostní opatření

Tato souprava je určena výhradně k použití *in vitro*.

- Pracujte se všemi biologickými vzorky jako s potenciálně infekčním materiálem. Vyhněte se přímému kontaktu s biologickými vzorky. Vyhněte se rozlití vzorků a tvorbě aerosolů. Jakýkoliv materiál, který přišel do styku s biologickými vzorky, musí být před umístěním do odpadu autoklávován při 121 °C nejméně 60 minut.
- Pracujte se všemi reagensii a používaným materiálem s vědomím, že mohou přenášet infekční agens. Vyhněte se přímému kontaktu s reagensii. 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 reagensii.
- Likvidujte zbylé reagensie a odpad v souladu s adekvátními bezpečnostními předpisy.
- Před započatím práce si řádně přečtěte veškeré instrukce uvedené v tomto návodu.
- Při práci postupujte přesně podle návodu k použití.
- Soupravu nepoužívejte po době expirace, která je uvedena na obalu.
- Používejte pouze reagensii poskytované v rámci soupravy a reagensie doporučené výrobcem.
- Nemíchejte reagensie z různých šarží!
- Nepoužívejte reagensie ze souprav jiných výrobců!

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.
- Vzorek, ze kterého se analýza provádí, musí být hned od počátku pro DNA analýzu určen a musí s ním být podle toho nakládáno, např. vzhledem k možné kontaminaci, degradaci nukleových kyselin atd. Vzorek musí být zpracováván v laminárním boxu. Různé vzorky nesmějí být otevřeny ve stejnou dobu. Automatické pipety užívané pro práci s biologickými vzorky musejí být používány pouze pro tuto specifickou práci a musejí být používány špičky s filtrem. Používané špičky musejí být sterilní a prosté DNA/RNA a DNáz a RNáz.
- Automatické pipety užívané pro práci se vzorky musejí být používány pouze pro tuto specifickou práci a musejí být používány špičky s filtrem. Používané špičky musejí být sterilní a prosté DNA/RNA a DNáz a RNáz.



- S produkty amplifikace je třeba zacházet velmi opatrně, aby nedošlo k jejich rozptýlení do prostředí laboratoří a k případné kontaminaci nově testovaných vzorků.

Varování a bezpečnostní opatření týkající se složek této soupravy

- Použité roztoky nesou následující bezpečnostní věty (P; H):

Roztok MI3

H302+H332	Zdraví škodlivý při požití nebo při vdechování.
H315	Způsobuje vážné podráždění kůže.
H319	Způsobuje vážné podráždění očí.
P261	Zamezte vdechování prachu/dýmu/plynu/mlhy/par/aerosolů.
P280	Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.
P301+P312+P330	PŘI POŽITÍ: Necítíte-li se dobře, volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO /lékaře. Vypláchněte ústa.
P304+P340+P312	PŘI VDECHNUTÍ: Přeneste osobu na čerstvý vzduch a ponechte ji v poloze usnadňující dýchání. Necítíte-li se dobře, volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO /lékaře. Vypláchněte ústa.
P305+P351+P338	PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny, a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování.
P337+P313	Přetrvává-li podráždění očí: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.

Roztok MI4

H225	Vysoce hořlavá kapalina a páry.
H319	Způsobuje vážné podráždění očí.
H336	Může způsobit ospalost nebo závratě.
P210	Chraňte před teplem, horkými povrchy, jiskrami, otevřeným ohněm a jinými zdroji zapálení. Zákaz kouření.
P233	Uchovávejte obal těsně uzavřený.
P305+P351+P338	PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny, a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování.

Roztok MI5

H225	Vysoce hořlavá kapalina a páry.
H315	Způsobuje vážné podráždění kůže.
H319	Způsobuje vážné podráždění očí.
P210	Chraňte před teplem, horkými povrchy, jiskrami, otevřeným ohněm a jinými zdroji zapálení. Zákaz kouření.
P280	Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.

**Roztok MI6**

- H225 Vysoce hořlavá kapalina a páry.
H315 Způsobuje vážné podráždění kůže.
H319 Způsobuje vážné podráždění očí.
P210 Chraňte před teplem, horkými povrchy, jiskrami, otevřeným ohněm a jinými zdroji zapálení. Zákaz kouření.
P280 Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.

Roztok MI7

- P280 Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.
P281 Používejte požadované osobní ochranné prostředky.

Roztok Proteinázy K

- H334 Při vdechování může vyvolat příznaky alergie nebo astmatu nebo dýchací potíže.
P304+P340 PŘI VDECHNUTÍ: Přeneste osobu na čerstvý vzduch a ponechte ji v poloze usnadňující dýchání.
P261 Zamezte vdechování prachu/dýmu/plynu/mlhy/par/aerosolů.
P342+P311 Při dýchacích potížích: Volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO/lékaře/...
P284 Používejte vybavení pro ochranu dýchacích cest.

Literatura

Barbara A. Bannister, Norman T. Begg and Stephen H. Gillespie: Infectious Disease. Blackwell Science, 2th Ed., 2000



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