



EliGene® Viral RNA/DNA FAST 96 Vacuum Isolation Kit

Návod k použití

Balení:

Kat. č.	Balení
409480	480 izolací

Skladování a doba použitelnosti:

Všechny reagenty 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 96 Vacuum Isolation Kit je určen pro rychlou (méně než 40 minut) izolaci virové RNA a DNA (nukleových kyselin – NK) ze stěrů z nosohltanu, bukových stěrů, 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 silika kolonku (filtr), promyta a vypláchnuta (eluce) TRIS-HCl puftrem 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, silika kolonek, filtrace atd. Technologie silika 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

480 × mikrozukumavky s víčky používané laboratoří pro skladování izolované NK

65 ml 96 % etanolu pro molekulární biologii pro doplnění k Wash Buffer

72 ml 96 % etanolu pro molekulární biologii na finální promytí

Požadované vybavení

Mikrocentrifuga (15,000 × g)

Vortex

Stojánek na mikrozukumavky

Sada pipet: 1 – 1000 µl

Zephyrus Vacuum Pump Manifold System ZVPMS-300

Zephyrus Vacuum Pump ZVP-300

Zephyrus Vacuum Manifold UNI ZVM-300

Zephyrus Vacuum Manifold 96 ZVM-96

Obsah soupravy

Komponenty	Množství (480 izolací)
Lysis Buffer Stock Solution (zásobní roztok)	102 ml + přidejte Solution M
Wash Buffer (promývací pufr)	190 ml + přidejte 65 ml 96% ethanolu*
Elution Buffer (eluční pufr)	55 ml
Solution M (roztok M)	510 µl
96 Well Filter Plate (96jamková filtrační destička)	5
96 Deep Well Collection Plate (96jamková sběrná destička)	10
Cover foil on 96 Well Filter Plate (krycí folie na destičku)	5

*65 ml 96 % etanolu není součástí balení



UPOZORNĚNÍ:

Předpříprava roztoků před použitím.

Na každý den si připravte čerstvý pracovní roztok Lyzačního roztoku smícháním 1 µl Solution M s 200 µl Lysis Buffer Stock Solution (zásobního roztoku). Přidání Solution M do Lyzačního pufru provádějte v digestoři! V případě, že v jeden den plánujete spotřebovat celou soupravu na 480 izolací, smíchejte celý objem Solution M se zásobním roztokem 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 65 ml 96 % etanolu k Wash Buffer 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 reagenty. V případě náhodného užití nebo kontaktu s reagensy přečtěte MSDS protokol, který je k dispozici na vyžádání na telefonu 542 213 851 nebo na webových stránkách www.elisabeth.cz. Reagenty označené jako hořlavé by měly být drženy od otevřeného plamene a ohně. Nemíchejte komponenty z rozdílných šarží souprav. Lyzační roztok a Wash Buffer nejsou připraveny ihned k použití a je nutná jejich předpříprava – viz sekce „UPOZORNĚNÍ“ výše.

Odběr vzorku, zpracování a uchování

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 (Thermo 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.

V případě potřeby je možné centrifugovat 500 µl transportního média při 15,000 x g po dobu 5 minut a odebrat 200 µl supernatantu z povrchu pro další analýzu. Tento postup je doporučen v případě ucpání membrány z důvodu přítomnosti slin či sputa ve vzorku.

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 15,000 x g po dobu 5 minut. Poté odeberte z vrchní části 200 µl 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 96 Vacuum Isolation Kit** Používejte rukavice po celou dobu práce s kitem. Důkladně odstraňte zbytkový etanol ze spin kolonky před elucí, což je kritickým krokem pro úspěšnost izolace.

Sestavte vakuový manifold dle instrukcí výrobce. Odpadový zásobník musí být umístěn uvnitř báze manifoldu. 96jamková filtrační destička musí přilehnout přesně na vrchní část manifoldu. Pro umožnění eluce izolované NK je nutné umístit 96jamkovou sběrnou destičku do báze manifoldu.

V případě, že je izolováno méně než 96 vzorků najednou, je nutné prázdná místa zapečetit folií (dodávaná s kitem) pro zajištění optimálního vakua. Prázdná místa mohou být využita v dalším izolačním běhu. Prázdná místa (v předchozím běhu využitá) musí být zapečetěny folií. Doporučujeme využít zbylá místa do jednoho měsíce od prvního použití.

Uspořádání izolace umožňuje využití osmikanálové pipety nebo dávkovače.

1. Napipetujte 200 µl vzorku (**transportní medium nebo ředěné sputum nebo sliny**) do 96 jamkové sběrné destičky (je součástí balení).
2. Ujistěte se, že máte připravený čerstvý Lyzační roztok smícháním dle postupu uvedeném v „UPOZORNĚNÍ“
Přidejte 200 µl **lyzačního roztoku** do každé jamky s 200 µl vzorku z prvního kroku. Interní kontrola dle doporučení používaného detekčního kitu může být přidána v tomto kroku. Dostatečně promíchejte propipetováním nahoru a dolů alespoň pětkrát.



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 desky.

3. Přeneste všechny roztok do 96jamkové filtrační destičky umístěné na horní části manifoldu a aplikujte vakuum, dokud roztok neprojde skrze filtr.

Poznámka: NK se váže na silika membránu v 96jamkové filtrační destičce, protože se nachází v prostředí chaotropní soli. Tekutina prošlá skrze membránu obsahuje nenavázaný buněčný materiál jako například denaturované bílkoviny.

4. Přidejte 500 µl **Wash Buffer** do 96jamkové filtrační destičky. Ujistěte se, že před použitím Wash Buffer jste přidali 65 ml 96 % etanolu do lahvičky s Wash Buffer. Aplikujte vakuum dokud roztok neprojde skrze filtr.

Poznámka: Wash Buffer je promývací roztok založený na etanolu, který je schopen pročistit navázanou NK na 96jamkovou filtrační destičku od zbytkových nečistot.

5. Přidejte 150 µl **96 % etanolu** do 96jamkové filtrační destičky a aplikujte vakuum, dokud roztok neprojde skrze filtr.

6. Vysušte 96jamkovou filtrační destičku po dobu 10 minut při 55 °C.

Poznámka: Po tomto kroku je 96jamková filtrační destička kompletně vysušena od reziduí etanolu pro maximální uvolnění NK ze silika membrány během elučního kroku.

7. Vložte 96jamkovou sběrnou destičku do báze manifoldu a umístěte 96jamkovou filtrační destičku na vrchní část manifoldu. Přidejte 100 µl **Elution Buffer** přímo na filtr a nechte inkubovat po dobu 3 minut při pokojové teplotě. Aplikujte vakuum, dokud roztok neprojde skrze filtr.

8. Vyhodte 96jamkovou filtrační destičku. NK eluovaná v 96jamkové sběrné destičce je nyní připravena pro následné aplikace. Izolovanou NK umístěte do mikrozkušavek s víčky běžně používanými vaší laboratoří pro uchovávání NK.

Poznámka: Elution Buffer uvolňuje NK z filtru do 96jamkové sběrné destičky. NK jsou eluovány z membrány a neobsahují soli ani etanol.



Troubleshooting

Pokud roztok zůstává v jamce i po aplikaci vakua, je filtr pravděpodobně ucpaný. Prodlužte dobu aplikování vakua až na 2 minuty. Pokud ani poté tekutina neprošla skrze filtr, odstraňte tekutinu z filtru a opakujte izolaci NK. Pravděpodobný důvod je přítomnost vysokého obsahu bílkovin a polysacharidů ve vzorku. Při opakování izolačního protokolu zvažte centrifugaci vzorku (Více v sekci „Odběr vzorku, zpracování a uchování“).

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 odštěďování 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 potenciálně infekční a zlikvidujte podle platných předpisů a doporučení pro manipulaci s vysoce infekčním odpadem.
- Pracujete 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 reagenty 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.

Varování a bezpečnostní opatření specifická pro komponenty kitu

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

P281 Podle potřeby používejte osobní ochranné prostředky.

V případě jakýchkoli problémů kontaktujte ELISABETH PHARMACON, Ltd.



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.

Symboly



Katalogové číslo



Číslo šarže



Spotřebujte do (poslední den v měsíci)



Horní teplotní hranice



Výrobce



Obsah dostatečný pro "N" testů

Výrobce

ELISABETH PHARMACON Ltd.

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

E-mail: info@elisabeth.cz