

Návod k použití

Univerzální sada InviSorb® Spin

INVITEK
diagnostics



InviSorb®

Jazyk: CZ



REF 1050100200
1050100300

Σ 50 izolací
250 izolací



Invitek Molecular GmbH
Robert-Rössle-Straße 10
13125
Berlín
Německo

Důležité poznámky

Děkujeme Vám, že jste si zakoupili **univerzální sadu InviSorb® Spin** od společnosti Invitek Diagnostics.

Produkt slouží k manuální izolaci nukleových kyselin (genomové DNA, bakteriální DNA, virové DNA/RNA) z různých klinických vzorků pomocí technologie Spin Column.

POZOR! Nesprávná manipulace a použití k jinému než zamýšlenému účelu může způsobit nebezpečí a poškození. Proto vás žádáme, abyste si přečetli tento návod k použití a pečlivě jej dodržovali. Mějte jej vždy po ruce. Abyste předešli zranění osob, dodržujte také bezpečnostní pokyny.

Všechny verze návodů k použití naleznete ke stažení na našich webových stránkách nebo si je můžete vyžádat u nás: www.invitek.com.

Kontakt:

Technická podpora:

techsupport@invitek.com

NĚMECKO

Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlín, Německo

+ 49 30 9489 2908

PORTUGALSKO

Zona Industrial de Tondela, ZIM II, Lote 6, 3460-070 Tondela, Portugalsko

+351 232 817 817

© 2024 Invitek Molecular, všechna práva vyhrazena.

Souprava je v souladu s NAŘÍZENÍM (EU) 2017/746 o diagnostických zdravotnických prostředcích *in vitro*. Není však určena pro diagnostiku *in vitro* v zemích, kde NAŘÍZENÍ (EU) 2017/746 o diagnostických zdravotnických prostředcích *in vitro* není uznáváno.

Ochranné známky: InviSorb®, PSP®, InviMag®, Eppendorf®. Registrované značky, ochranné známky atd. použité v tomto dokumentu, i když nejsou výslovně takto označeny, nelze považovat za nechráněné zákonem.

InviGenius®, InviMag®, InviSorb®, Invitek®, InviTrap®, MSB®, PSP®, RTP® jsou registrované ochranné známky společnosti Invitek Molecular GmbH.

Obsah

1.	Bezpečnostní pokyny	3
2.	Informace o výrobku	5
2.1	Obsah sady	5
2.2	Reagencie a vybavení k zajištění uživatelem	6
2.3	Skladování, vzhled a trvanlivost	6
2.4	Zamýšlené použití	7
2.5	Informace o výrobku a specifikace	7
2.6	Princip a postup	8
3.	Extrakce nukleových kyselin pomocí univerzální sady InviSorb® Spin	9
3.1	Před zahájením protokolu	9
3.2	Odběr vzorků a skladování výchozího materiálu	10
3.3	Příprava výchozích materiálů	11
3.3.1	Sérum, plazma, jiné tělní tekutiny bez buněk	11
3.3.2	Krev	12
3.3.3	Stěry	12
3.3.4	Vzorky stolice (supernatant)	12
3.3.5	Kultivované bakterie	12
3.3.6	Moč	12
3.3.7	Tracheální sekret, BAL, sputum	13
3.3.8	Biopsie tkáně	13
3.3.9	Supernatanty buněčných kultur	13
3.4	Krátký protokol InviSorb® Spin Universal Kit	14
3.5	Protokol: Současná izolace nukleových kyselin (DNA a RNA) z kapalných vzorků ...	15
4.	Příloha	17
4.1	Řešení problémů	17
4.2	Záruka	18
4.3	Symboly používané na výrobku a označení	18
4.4	Další dokumenty a doplňující informace	19
4.5	Informace pro objednání	19

1. Bezpečnostní pokyny

Ujistěte se, že každý uživatel výrobku obdržel pokyny týkající se obecných bezpečnostních postupů pro laboratoře a bezpečnostní informace uvedené v tomto dokumentu.

- Při práci s chemikáliemi vždy používejte ochranný oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle.
- Mezi jednotlivými přenosy kapalin vždy vyměňte pipetovací špičky. Aby se zabránilo křížové kontaminaci, doporučujeme používat pipetovací špičky s aerosolovou bariérou.
- Spotřební materiál nepoužívejte opakovaně.
- Pokud dojde ke kontaminaci rukavic, zlikvidujte je.
- Nekombinujte součásti různých sad, pokud nejsou čísla šarží shodná.
- Zabraňte mikrobiální kontaminaci reagensů soupravy.
- Aby se minimalizovalo riziko infekce potenciálně infekčním materiálem, doporučujeme pracovat v laminárním proudění vzduchu až do chvíle dokud nejsou vzorky lyzovány.

Před manipulací s chemickými látkami si přečtěte všechny příslušné bezpečnostní listy (MSDS) a porozumějte jim. Ty jsou k dispozici online na [adrese](http://www.invitek.com) www.invitek.com.

Zbytky soupravy a odpadní kapaliny zlikvidujte v souladu s předpisy vaší země, opět viz bezpečnostní list. Společnost Invitek Molecular netestovala kapalným odpadem vzniklým použitím soupravy na přítomnost zbytků infekčních materiálů. Kontaminace tekutého odpadu zbytkovými infekčními materiály je velmi nepravděpodobná, ale nelze ji zcela vyloučit. Proto je třeba kapalným odpadem považovat za infekční a je třeba s ním nakládat a likvidovat jej v souladu s místními bezpečnostními předpisy.

Rizikové a bezpečnostní věty Evropského společenství pro součásti **sady InviSorb® Spin Universal Mini Kit**, na které se vztahují, jsou uvedeny níže:

Proteináza K



Nebezpečí

Standardní věty o nebezpečnosti (H-věty)

H315 - Způsobuje podráždění kůže.

H319 - Způsobuje vážné podráždění očí.

H334 - Při vdechování může vyvolat příznaky alergie nebo astmatu nebo dýchací potíže.

H335 - Může způsobit podráždění dýchacích cest.

Preventivní prohlášení

P261 - Nevdechujte prach/dým/plyn/hmlu/výpary/aerosol.

P284 - Používejte ochranu dýchacích cest.

P302+P352 - PŘI STYKU S KŮŽÍ: Omyjte velkým množstvím vody.

P304+P340 - PŘI VDECHNUTÍ: V případě vdechnutí: odveďte osobu na čerstvý vzduch a zajistěte pohodlí pro dýchání.

P305+P351+P338 - PŘI VSTRÍKNUTÍ DO OČÍ: Opatrně několik minut vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li přítomny a lze-li to snadno provést. Pokračujte ve vyplachování.

P501 - Odstraňte obsah/kontejner do sběrného místa nebezpečného nebo zvláštního odpadu v souladu s místními, regionálními, národními a/nebo mezinárodními předpisy.

Lyzační pufr HLT



Varování

Obsahuje guanidiniumchlorid

Standardní věty o nebezpečnosti (H-věty)

H302 - Zdraví škodlivý při požití.

H315 - Způsobuje podráždění kůže.

H319 - Způsobuje vážné podráždění očí.

Preventivní prohlášení

P301+P312 - PŘI POŽITÍ: Pokud se necítíte dobře, zavolejte TOXIKOLOGICKÉ STŘEDISKO nebo lékaře.

P302+P352 - PŘI KONTAKTU S KŮŽÍ: Omyjte velkým množstvím vody.

P305+P351+P338 - PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Opatrně několik minut vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li přítomny a lze-li to snadno provést. Pokračujte ve vyplachování.

P362+P364 - Kontaminovaný oděv před dalším použitím svlékněte a vyperte.

P501 - Odstraňte obsah/kontejner do sběrného místa nebezpečného nebo zvláštního odpadu v souladu s místními, regionálními, národními a/nebo mezinárodními předpisy.

**Tísňové lékařské informace lze získat 24 hodin denně na stránkách infotrac,
www.infotrac.net:**

mimo USA: 1 - 352 - 323 - 3500

v USA: 1 - 800 - 535 - 5053

2. Informace o výrobku

2.1 Obsah sady

	50 izolací	250 izolací
Katalogové číslo	1050100200	1050100300
Lyzační pufr HLT	15 ml / lahvička	60 ml / lahvička
Proteináza K	1 lahvička pro 1,1 ml pracovního roztoku	3 lahvičky pro 3 x 2 ml pracovního roztoku
Nosná RNA	1 lahvička pro 1,2 ml pracovního roztoku	3 lahvičky pro 3 x 2 ml pracovního roztoku
Voda bez RNázy	2 x 2 ml / lahvička	15 ml / lahvička
Roztok pro zajištění vazby NK na membránu (naplňte 99,7% izopropanolem)	prázdná láhev (konečný objem 15 ml)	prázdná láhev (konečný objem 80 ml)
Promývací pufr HLT	30 ml / lahvička (konečný objem 50 ml)	105 ml / lahvička (konečný objem 175 ml)
Promývací pufr	2 x 18 ml / lahvička (konečný objem 2 x 60 ml)	2 x 60 ml / lahvička (konečný objem 2 x 200 ml)
Eluční pufr M	30 ml / lahvička	120 ml / lahvička
Sada filtrů RTA Spin	50 kusů	5 x 50 kusů
Eluční zkumavka RTA	2 x 50 kusů	10 x 50 kusů
1,5 ml přijímací zkumavky	50 kusů	5 x 50 kusů
Zkumavky Safe-Lock o objemu 2,0 ml	50 kusů	5 x 50 kusů
Krátký protokol	1 leták	1 leták

2.2 Reagencie a vybavení k zajištění uživatelem

Laboratorní vybavení:

- Mikrocentrifuga (*všechny protokoly byly ověřeny na centrifuze 5415 D Eppendorf*).
- Volitelně: centrifuga na 15 nebo 50 ml
- Termo třepačka (37 °C - 95 °C)
- Odměrný válec (250 ml)
- Jednorázové rukavice
- Pipeta a pipetovací špičky
- Vortex mixér
- Reakční zkumavky (1,5 ml, 2,0 ml)

Kapaliny a rozpouštědla:

- Voda bez DNázy/RNázy nebo 1 x PBS pro úpravu objemu vzorku
- 96 - 100 % ethanol (nedenaturovaný)
- Isopropanol*
- Volitelně (pro respirační vzorky s vysokou viskozitou): nasycený roztok acetylcysteinu (ACC) (200 mg/ml).
- Volitelně: Lysozym (10 mg/ml)

*Sada je validována s 2-propanolem; Rotipuran® >99,7 %, p.a., ACS, ISO (obj. č. 6752) od firmy Carl Roth.

***Možní dodavatelé isopropanolu:**

Carl Roth
2-propanol
Rotipuran® >99,7 %, p.a., ACS,
ISO Obj. č. 6752

Applichem
2-Propanol für die Molekularbiologie
Obj. č. A3928

Sigma
2-propanol
Obj. č. 59304-1L-F

2.3 Skladování, vzhled a trvanlivost

Doba použitelnosti: Všechny pufrы a součásti soupravy by měly být skladovány při pokojové teplotě a jejich doba použitelnosti je uvedena na vnějším štítku soupravy.

Po otevření mají jednotlivé složky soupravy, stejně jako složky připravené před prvním použitím, dobu použitelnosti 3 měsíce.

Před každým použitím se ujistěte, že všechny součásti mají pokojovou teplotu. Vyskytují-li se v roztocích sraženiny související s teplotou, rozpusťte je opatrným zahřátím (až na 30 °C).

Pokožová teplota (RT) je definována jako rozmezí 15-30 °C.

Promývací pufr: po přidání ethanolu by měl být pevně uzavřen a skladován při pokojové teplotě.

Promývací pufr HLT a roztok pro zajištění vazby NK na membránu: po přidání isopropanolu by měly být pevně uzavřeny a skladovány při pokojové teplotě.

Nosná RNA: po rozpuštění ve vodě bez DNázy/RNázy musí být nosná RNA skladována při teplotě - 20 °C.

Proteináza K: po rozpuštění ve vodě bez DNázy/RNázy lze Proteinázu K skladovat při teplotě 2 - 8 °C po dobu až dvou měsíců. Pro delší skladování uchovávejte při -20 °C, zmrazte a rozmrazte pouze jednou.

2.4 Zamýšlené použití

InviSorb® Spin Universal Kit je souprava pro extrakci nukleových kyselin založená na technologii Spin Column a určená pro současnou izolaci a purifikaci genomové DNA, bakteriální DNA a virové DNA/RNA.

Soupravu lze použít pro různé typy lidských vzorků, jako je čerstvá nebo zmrazená žilní plná krev antikoagulovaná EDTA nebo citrátem nebo příslušné plazmatické přípravky, sérum, opláchnutá tekutina z výtěrů, předem ošetřené sputum, BAL, tracheální sekret, kultivované bakterie, supernatant ze suspenze stolice, mozkomíšní mok, supernatanty buněčných kultur, biotický materiál/tkáň, moč a další bezbuněčné tělní tekutiny.

Přípravek není určen k použití s heparinizovanými vzorky krve. Výrobek je určen pouze pro profesionály, jako jsou laboratorní technici, lékaři a biologové vyškolení v molekulárně biologických technikách a diagnostických postupech *in vitro*.

2.5 Informace o výrobku a specifikace

Výchozí materiál	Výnos	Kvalita	Čas
Až 200 µl • Sérum, plazma, jiné bezbuněčné tělní tekutiny, moč • stěry (suché, stabilizované) • supernatant ze suspenzí stolice • kultivované bakterie • tracheální sekret, BAL, sputum • supernatant buněčné kultury Až 100 µl: • čerstvá nebo zmrazená krev (stabilizovaná EDTA/citrátem, ale ne heparinem). Až 10 mg vzorku tkáně	V závislosti na vzorku (skladování a zdroj) Plná krev: v průměru 1 µg DNA	genomová DNA z krve: $A_{260} : A_{280}$ 1.8 - 2.1 Jiné typy vzorků: v závislosti na typu vzorku, cílových nukleových kyselinách.	cca 30 minut pro 12 vzorků (bez lýzy)

Výtěžnost a kvalita purifikovaných nukleových kyselin závisí na typu vzorku, zdroji vzorku, přepravě, skladování, stáří, titru viru a u krevních vzorků také na počtu leukocytů.

Pro stanovení výtěžnosti je nutno zohlednit, že nukleové kyseliny purifikované touto soupravou obsahují nosnou RNA (5 µg na 200 µl vzorku), která tvoří většinu nukleových kyselin přítomných v eluátu. Zejména virové nukleové kyseliny z biologického vzorku jsou obvykle velmi málo koncentrované, a proto je téměř nemožné je kvantifikovat fotometricky. Pro stanovení výtěžnosti se doporučuje kvantitativní RT-PCR.

Univerzální sada InviSorb® Spin poskytuje účinný postup izolace vysoce kvalitních nukleových kyselin. Souprava je určena pro současnou izolaci virové DNA/RNA, bakteriální DNA a genomové DNA pomocí protokolu lyse-bind-wash-elute Spin Column.

Souprava je validována pro počty leukocytů 3×10^6 - 1×10^7 buněk/ml. Příliš vysoké počty buněk mohou vést k ucpání spinového filtru RTA a tím k nežádoucím účinkům na purifikační proces. Doporučujeme proto zvážit vstupní objem vzorku jako parametr při realizaci vašeho diagnostického protokolu *in vitro*. V případě potřeby lze vzorky před izolací a purifikací předem naředit PBS nebo vodou bez DNázy/RNázy.

Následné aplikace:

Výtěžnost a kvalita izolovaných nukleových kyselin jsou obecně vhodné pro řadu molekulárně diagnostických aplikací, jako jsou techniky PCR, NGS, hybridizační metody a HLA typizace. Následné aplikace by měly být prováděny podle specifikací příslušných výrobců.

2.6 Princip a postup

1. Lyze vzorků

Vzorky se lyzují při zvýšené teplotě. Lyza se provádí v přítomnosti lyzačního pufru HLT, proteinázy K a volitelně lysozymu k rozbití buněčných stěn bakterií a k rozkladu proteinů.

Přídavek nosné RNA je nutný pro zvýšení a stabilizaci obnovy virové DNA/RNA a pro purifikaci velmi malých množství virových nukleových kyselin.

2. Nsvázání nukleových kyselin

Přidáním vazebného roztoku k lyzátu se upraví optimální vazebné podmínky. Každý lyzát se poté nanese na spinový filtr RTA a nukleové kyseliny se adsorbují na membránu.

3. Promývání pro odstranění zbytkových nečistot

Kontaminanty jsou účinně odplaveny pomocí promývacího pufru HLT a promývacího pufru, zatímco nukleové kyseliny zůstávají vázány na membráně.

4. Eluce nukleových kyselin

Nukleové kyseliny se eluují ze spinového filtru RTA pomocí 100-200 µl elučního pufru M.

3. Extrakce nukleových kyselin pomocí univerzální sady InviSorb® Spin

3.1 Před zahájením protokolu

Při prvním použití soupravy je nezbytné ověřit, že jsou všechny pufrы a činidla připraveny podle pokynů:

Příprava pufru před prvním použitím: 50 reakcí
Nosná RNA: Lyofilizovanou nosnou RNA v lahvičce resuspendujte přidáním 1,2 ml vody bez DNázy/RNázy a důkladně promíchejte, dokud se zcela nerozpustí (nejméně 1 minutu).
Proteináza K: Resuspendujte lyofilizovanou Proteinázu K přidáním 1,1 ml vody bez DNázy/RNázy do lahvičky, důkladně promíchejte do úplného rozpuštění.
Roztok pro zajištění vazby NK na membránu (prázdná lahvička): Lahvičku naplňte 15 ml 99,7% isopropanolu (v kvalitě pro molekulární biologii) a vždy ji pevně uzavřete.
Promývací pufr HLT: Do lahvičky přidejte 20 ml 99,7% isopropanolu . Důkladně promíchejte, lahvičku vždy pevně uzavřete.
Promývací pufr: Do lahvičky přidejte 42 ml 96-100% etanolu . Důkladně promíchejte, lahvičku vždy pevně uzavřete.
Příprava pufru před prvním použitím: 250 reakcí
Nosná RNA: Přidáním 1 ml vody bez DNázy/RNázy do lahvičky resuspendujte lyofilizovanou nosnou RNA a důkladně promíchejte, dokud se zcela nerozpustí (nejméně 1 minutu), poté přidejte další 1 ml vody bez DNázy/RNázy .
Proteináza K: Resuspendujte lyofilizovanou Proteinázu K přidáním 2 ml vody bez DNázy/RNázy do lahvičky, důkladně promíchejte do úplného rozpuštění.
Roztok pro zajištění vazby NK na membránu (prázdná lahvička): Do lahvičky naplňte 80 ml 99,7% isopropanolu (v kvalitě pro molekulární biologii).
Promývací pufr HLT: Do lahvičky přidejte 70 ml 99,7% isopropanolu . Důkladně promíchejte, lahvičku vždy pevně uzavřete.
Promývací pufr: Do lahvičky přidejte 140 ml 96-100% etanolu . Důkladně promíchejte, lahvičku vždy pevně uzavřete.

- Termo třepačku nastavte na 65 °C.
- Zahřejte potřebné množství **Elution Buffer M** na teplotu 65 °C (na jeden vzorek je potřeba 50 - 200 µl **Elution Buffer M**).
- Určete počet požadovaných reakcí včetně kontrol a označte potřebné množství RTA Spin Filtrů (víčko) a potřebné množství 1,5 ml přijímacích zkumavek (na vzorek: je potřeba 1 přijímací zkumavka).

Master mix

Pro snadnější manipulaci doporučujeme připravit master mix sestávající z lyzačního pufru HLT, proteinázy K a případně nosné RNA. Při přípravě master mixu se doporučuje připravit objem, který převyšuje celkový počet reakcí o 5 %.

Master mix připravujte vždy čerstvý a krátce před použitím.

Izolace genomové DNA, bakteriální DNA a virové DNA/RNA:

Na jeden vzorek je třeba 200 µl lyzačního pufru HLT, 20 µl proteinázy K a 20 µl nosné RNA.

Izolace genomové DNA:

Na jeden vzorek je zapotřebí 220 µl lyzačního pufru HLT a 20 µl proteinázy K. Použití nosné RNA není nutné.

Kontrola extrakce

Optimální množství kontroly extrakce pro konkrétní navazující aplikace určíte podle pokynů výrobce.

Nízké objemy kontrolní extrakce (DNA nebo RNA) musí být kombinovány s dodanou nosnou RNA v jedné směsi. Injekční lahvičky s nosnou RNA obsahují 1,2 ml nebo 2,0 ml zásobního roztoku v závislosti na velikosti balení. Přidejte příslušné množství kontrolní nukleové kyseliny pro extrakci k Nosné RNA, pokud je nutný velký objem (> 25 % celkového objemu Nosné RNA), nahradte při ředění Nosné RNA příslušným množstvím vody bez DNázy/RNázy.

3.2 Odběr vzorků a skladování výchozího materiálu

Pro dosažení reprodukovatelných a vysokých výtěžků je zásadní správné skladování vzorků. Výtěžnost se může lišit v závislosti na faktorech, jako je zdravotní stav dárce, stáří vzorku, typ vzorku, transport a skladování.

Je třeba se vyhnout opakovaným cyklům zmrazování a rozmrazování vzorků, aby se zabránilo degradaci nukleových kyselin. Obecně platí, že nejlepších výsledků se dosahuje při použití čerstvých vzorků. Doporučuje se vzít v úvahu technické pokyny, jako jsou např. normy CEN/TS a ISO, týkající se procesu předběžného vyšetření pro molekulární diagnostiku v rámci IVDR, jak je zdůrazněno v G. Dagher, *et al.* (<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.05.002>).

Sérum, plazma, jiné tělní tekutiny bez buněk: K extrakci lze použít sérum nebo plazmu z venózní plné krve (ošetřené antikoagulanty, jako je EDTA nebo citrát, ale ne heparinem), vzorky synoviální tekutiny nebo jiné bezbuněčné tělní tekutiny. Plná krev by se neměla vortexovat, aby se zabránilo hemolýze. Před centrifugací nechte zkumavky se sérem alespoň 30 minut odstát. Při přípravě séra nebo plazmy postupujte podle pokynů systému pro odběr krve. Doporučuje se oddělit plazmu/sérum centrifugací do 12 h. Supernatanty získané pomocí systémů bez gelového separátoru by měly být převedeny do čerstvých zkumavek. Pro krátkodobé skladování lze vzorky uchovávat 1-2 hodiny na ledu. Po dobu až 24 h lze vzorky uchovávat při -20 °C. Pro dlouhodobé skladování se doporučuje zmrazení vzorků v alikvotech při -80 °C. Opakované cykly zmrazování a rozmrazování mohou negativně ovlivnit integritu vzorku a způsobit např. denaturaci/precipitaci proteinů, což může mít za následek snížení výtěžnosti, kvality nebo přítomnost virových titrů. Kromě toho mohou problémy způsobit kryoprecipitáty, které se tvoří během cyklů rozmrazování a zmrazování. Pokud se objeví kryoprecipitát, odstředěte jej při 6 800 x g po dobu 3 min. Čirý supernatant by měl být okamžitě použit.

Krev: Krevní vzorky (stabilizované EDTA nebo citrátem, ale ne heparinizované) lze skladovat při pokojové teplotě po dobu 2-3 hodin. Pro krátkodobé skladování (do 24 hodin) by vzorky měly být skladovány při teplotě 2-8 °C. Pro dlouhodobé skladování se doporučuje vzorky zmrazit při -20 °C nebo -80 °C.

Stěry:

Suché stěry: připravte vzorky podle popisu v příslušné metodě přípravy vzorků. Skladujte v suchu při teplotě 4-8 °C.

Stěry ve stabilizačním médiu: se stabilizační tekutinou lze zacházet jako s bezbuněčnou tělní tekutinou. Upozorňujeme, že některá stabilizační činidla mohou způsobit snížení výtěžnosti z důvodu nekompatibility s chemickými látkami použitými v soupravě. Skladujte podle požadavků výrobce.

Vzorky stolice: Vzorky obsahují DNázy a RNázy, které mohou rychle způsobit degradaci DNA a RNA. Proto by vzorky měly být uchovávány zmrazené při teplotě -80 °C.

Kultivované bakterie: Po kultivaci musí být bakterie peletovány a zmrazeny při -20 °C nebo -80 °C pro dlouhodobé skladování. Resuspenze je popsána v příslušné metodě přípravy vzorku.

Moč: V závislosti na titru bakterií a aplikaci se doporučuje počáteční objem 15-50 ml moči. Vzorek odstředte, aby se bakterie peletovaly, a supernatant zcela odstraňte (kontaminace močovinou může inhibovat reakce PCR). Pro některé aplikace lze použít přímo čerstvou moč. Pro dlouhodobé skladování se doporučuje vzorky zmrazit při -20 °C nebo -80 °C.

Tracheální sekret, BAL, sputum: Vzorky obsahují DNázy a RNázy, které mohou rychle způsobit degradaci DNA a RNA. Proto by vzorky měly být uchovávány zmrazené při teplotě -80 °C.

Biopsie tkáně: Vzorky musí být okamžitě zmrazeny a uloženy při -20 °C nebo -80 °C. Je třeba se vyhnout opakovanému zmrazování a rozmrazování. Množství přečištěné DNA závisí na typu výchozího materiálu. Vzorek rozmrazte v lyzační směsi.

Supernatanty buněčných kultur: Připravte vzorky supernatantů stejně jako ostatní vzorky bezbuněčných tělních tekutin popsané v příslušné metodě přípravy vzorků. Pro dlouhodobé skladování se doporučuje vzorky zmrazit při -20 °C nebo -80 °C.

3.3 Příprava výchozích materiálů

Dále je popsána příprava lýzy vzorků pro různé výchozí materiály. Pro přípravu vzorků použijte 2 ml zkumavky Safe-Lock, protože jsou potřebné i v následném kroku lýzy. Po přípravě výchozích materiálů viz kapitola 3.5 "Protokol: Současná izolace nukleových kyselin (DNA a RNA) z kapalných vzorků" a postupujte podle kroku 1a) - d) protokolu, pokud není uvedeno jinak.

3.3.1 Sérum, plazma, jiné tělní tekutiny bez buněk

Před extrakcí vzorek vždy dobře promíchejte.

Pro extrakci použijte 200 µl vzorku. Pokud je objem vzorku nižší než 200 µl, upravte jej pomocí PBS pufru nebo vody bez DNázy/RNázy na konečný objem 200 µl.

3.3.2 Krev

Před extrakcí vzorek vždy dobře promíchejte.

Zřeďte 100 µl čerstvé nebo rozmražené krve 100 µl vody bez DNázy/RNázy.

3.3.3 Stěry

a) Suché stěry

Propláchněte tampony ve vhodné lahvičce v co nejmenším objemu PBS nebo vody bez DNázy/RNázy (pro nasofaryngeální stěry asi 400 µl, pro orální asi 600 µl). Přitiskněte tampon k vnitřní stěně lahvičky, abyste získali co nejvíce vzorku.

K extrakci použijte 200 µl propláchnutého roztoku.

Alternativně lze tampony přímo opláchnout ve směsi 200 µl lyzačního pufru HLT, 20 µl proteinázy K, 20 µl nosné RNA (volitelně pro přípravu genomové DNA) a 200 µl vody bez DNázy/RNázy. Inkubujte tampony 5-10 min při pokojové teplotě, občas promíchejte. Dbejte na to, aby nedošlo ke křížové kontaminaci.

b) Stěry ve stabilizačním médiu

K extrakci použijte 200 µl stabilizačního roztoku.

Některá stabilizační média mohou narušovat lyzační reakci (pokud máte dotazy, podívejte se do často kladených otázek nebo kontaktujte podporu).

3.3.4 Vzorky stolice (supernatant)

a) Extrakce nukleových kyselin z virů

Pro přípravu supernatantu přeneste 100 µl / 100 mg vzorku stolice do 2 ml lahvičky a přidejte 900 µl vody bez DNázy/RNázy. Vortexujte po dobu 30 s a následně proveďte 1 minutovou centrifugaci při 12 000 x g. Přeneste 200 µl supernatantu do čerstvé lahvičky pro extrakci vzorku. Vyhněte se přítomnosti pevných částic ve vzorku.

b) Extrakce bakteriální DNA

Pro přípravu supernatantu přeneste 100 µl / 100 mg vzorku stolice do 2 ml lahvičky a přidejte 300 µl vody bez DNázy/RNázy. Vortexujte po dobu 30 s a poté proveďte 30 s centrifugaci při 1 000 x g.

Přeneste 200 µl supernatantu do čerstvé lahvičky pro extrakci vzorku. Vyhněte se přítomnosti pevných částic ve vzorku.

3.3.5 Kultivované bakterie

Přeneste 1 ml bakteriální jednodenní kultury do 2,0 ml zkumavky Safe-Lock. Odstřed'ujte 2 minuty při 10 000 x g a zcela odstraňte supernatant. Resuspendujte pelet v 200 µl PBS pufru a začněte extrakci vzorku.

3.3.6 Moč

V závislosti na titru bakterií a aplikaci se doporučuje počáteční objem 15-50 ml moči. Vzorek odstřed'ete, aby se bakterie peletovaly, a supernatant zcela odstraňte (kontaminace močovinou může inhibovat reakce PCR). Pelet bakterií znovu rozpust'ete ve 200 µl pufru PBS. Pro některé aplikace lze použít přímo 200 µl čerstvé moči.

3.3.7 Tracheální sekret, BAL, sputum

a) Neviskózní nebo nízkoviskózní vzorky

Před extrakcí vzorek vždy dobře promíchejte.

Pro extrakci použijte 200 µl vzorku. Pokud je objem vzorku nižší než 200 µl, upravte jej pomocí PBS pufru nebo vody bez DNázy/RNázy na konečný objem 200 µl.

b) Izolace bakteriální DNA z viskózních vzorků

Přeneste 150 µl vzorku sputa nebo 1 ml tracheálního sekretu nebo BAL do zkumavky Safe-Lock a přidejte 150 µl nebo 1 ml nasyceného roztoku acetylcysteinu (ACC) (poměr vzorku a pufru musí být 1:1).

Inkubujte 10 minut při 95 °C za stálého protřepávání.

Odstředějte při 10 000 x g po dobu 5 min. Supernatant zlikvidujte.

Resuspendujte bakteriální pelety v 200 µl PBS nebo vody bez DNázy/RNázy a pokračujte v extrakci vzorku.

c) Izolace virové DNA/RNA z viskózních vzorků

Přeneste 150 µl vzorku do zkumavky Safe Lock a přidejte k němu 150 µl nasyceného roztoku acetylcysteinu (ACC) (poměr vzorku a pufru musí být 1:1).

Inkubujte 10 minut při 95 °C za stálého protřepávání.

Nechte vzorek vychladnout.

Pro extrakci použijte 200 µl vzorku.

3.3.8 Biopsie tkáně

Přeneste 1 - 10 mg vzorku tkáňové biopsie do 2,0 ml zkumavky Safe-Lock a přidejte 200 µl vody bez DNázy/RNázy nebo PBS, 200 µl lyzačního pufru HLT, 20 µl nosné RNA (volitelné, pro vzorky s nízkým obsahem DNA/RNA) a 20 µl Proteinázy K ke každému vzorku.

Pro rozrušení obtížně lyzovatelných tkání, jako jsou chrupavky, ledviny a srdeční sval, se doporučuje použít zirkonové kuličky (k dispozici samostatně).

Po mechanickém ošetření inkubujte 10 minut při 65 °C za stálého protřepávání.

Inkubujte 10 min při 95 °C za stálého třepání.

Odstředějte 1 minutu při 10 000 x g a přeneste supernatant do nové zkumavky.

Pokračujte v extrakčním protokolu v kroku 2 a přidejte vazební roztok.

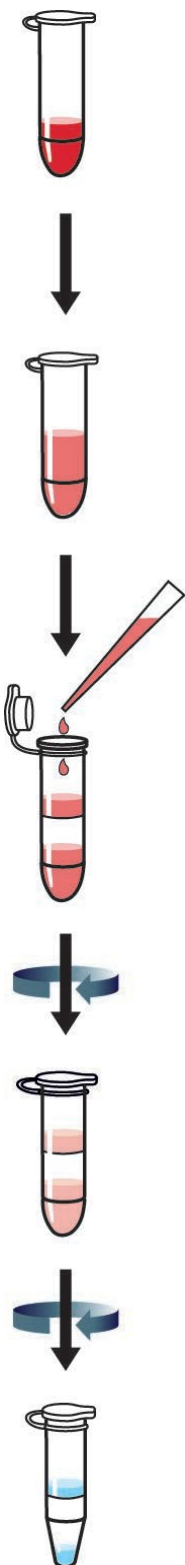
3.3.9 Supernatanty buněčných kultur

Pro extrakci použijte 200 µl vzorku.

3.4 Krátký protokol InviSorb® Spin Universal Kit

Vzorky Lyse

Informace o předúpravě konkrétního vzorku viz kapitola 3.3 "Příprava výchozího materiálu".



1.a) Purifikace bakteriálních nukleových kyselin

Smíchejte 200 μ l vzorku* s 20 μ l lysozymu v 2,0 ml zkumavce Safe-Lock
Inkubujte 10 min při 37 °C.

Přidejte 20 μ l **nosné RNA**, 200 μ l **lyzačního pufu HLT** a 20 μ l **proteinázy K**
Inkubujte 15 minut při teplotě 65 °C a třepejte.

1.b) Současná purifikace bakteriálních a virových nukleových kyselin

Smíchejte 200 μ l vzorku* s 20 μ l lysozymu v 2,0 ml zkumavce Safe-Lock
Inkubujte 10 min při pokojové teplotě.

Přidejte 20 μ l **nosné RNA**, 200 μ l **lyzačního pufu HLT** a 20 μ l **proteinázy K**
Inkubujte 10 minut při 65 °C a třepejte
Inkubujte 10 minut při 95 °C a třepejte.

1.c) Purifikace virových nukleových kyselin

Smíchejte 200 μ l vzorku* s 200 μ l **lyzačního pufu HLT**, 20 μ l **nosné RNA** a
20 μ l **proteinázy K** v 2,0 ml zkumavce Safe-Lock

Inkubujte 10 minut při 65 °C a třepejte.

Inkubujte 10 minut při 95 °C a třepejte.

1.d) Purifikace genomové DNA

Smíchejte 200 μ l vzorku* s 220 μ l **lyzačního pufu HLT** a 20 μ l **proteinázy K**
v 2,0 ml zkumavce Safe-Lock

Inkubujte 10 min při 65 °C a třepejte.

Inkubujte 10 minut při 95 °C a třepejte (u krevních vzorků vynechte).

*Pokud je objem vzorku menší než 200 μ l, upravte jej pomocí PBS nebo vody bez DNázy/RNázy.

Vazba nukleových kyselin

2. Přidejte 260 μ l **roztoku pro navázání NK na membránu**, promíchejte pipetováním nahoru a dolů nebo vortexováním.

Inkubujte 5 minut při pokojové teplotě.

Přeneste vzorek do filtrační sady RTA Spin Filter Set.

Odstředějte 1 minutu při 11 000 x g.

Vyhoďte přijímací zkumavku RTA s filtrátem a vložte filtr RTA Spin do nové eluční zkumavky RTA.

Promývání pro odstranění zbytkových nečistot

3. Přidejte 600 μ l **promývacího pufu HLT**, odstředěte 1 minutu při 11 000 x g
Vyhoďte zkumavku s filtrátem a vložte filtr RTA Spin do nové eluční zkumavky RTA.

4. Přidejte 700 μ l **promývacího pufu**, odstředěte 1 minutu při 11 000 x g.
Zlikvidujte filtrát a vložte filtr RTA Spin zpět do eluční zkumavky RTA.

5. Zopakujte promývací krok.

6. Odstředěte 5 minut při maximálních otáčkách, abyste odstranili zbytkový etanol.

Eluční zkumavku RTA vyhoďte.

Eluce nukleových kyselin

7. Umístěte spinový filtr do 1,5 ml eluční zkumavky. Přidejte 50-200 μ l **elučního pufu M** (předehřátého na 65 °C) přímo na spinový filtr RTA. Inkubujte 1 minutu při pokojové teplotě a odstředěte 1 minutu při 11 000 x g. Vyhoďte spinový filtr RTA a uložte eluované nukleové kyseliny na led.

3.5 Protokol: Současná izolace nukleových kyselin (DNA a RNA) z kapalných vzorků

Informace o předúpravě konkrétního vzorku naleznete v kapitole 3.3 "Příprava výchozího materiálu".

1.a) Lýza vzorku pro purifikaci bakteriálních nukleových kyselin

Smíchejte 200 µl vzorku nebo resuspendované bakteriální pelety s 20 µl lysozymu ve 2 ml zkumavce Safe- Lock.

Inkubujte 10 minut při 37 °C

Přidejte 20 µl **nosné RNA**. Promíchejte vortexováním.

Přidejte 200 µl **lyzačního pufu HLT** a 20 µl **proteinázy K**

Případně přidejte 240 µl Master Mixu ke každému vzorku.

Důkladně promíchejte 10 sekund vířením a inkubujte za stálého protřepávání 10-15 minut při 65 °C.

Volitelně, pro obtížně lyzovatelné bakterie, jako jsou mykobakterie: inkubujte 10 minut při 95 °C.

1.b) Lýza vzorku pro současnou purifikaci bakteriálních a virových nukleových kyselin

Smíchejte 200 µl vzorku s 20 µl lysozymu ve 2 ml zkumavce Safe-Lock. Inkubujte 10 minut při pokojové teplotě.

Přidejte 20 µl **nosné RNA**. Promíchejte vířením.

Přidejte 200 µl **lyzačního pufu HLT** a 20 µl **proteinázy K**

Případně přidejte µl Master Mixu ke každému vzorku.

Důkladně promíchejte 10 sekund vířením a inkubujte za stálého protřepávání 10 minut při 65 °C.

Inkubujte 10 minut při 95 °C za stálého protřepávání.

1.c) Lýza vzorku pro purifikaci virových nukleových kyselin

Smíchejte 200 µl vzorku s 200 µl **lyzačního pufu HLT**, 20 µl **nosičové RNA** a 20 µl **Proteinázy K** ve 2 ml zkumavce Safe Lock.

Případně přidejte ke každému vzorku 240 µl Master Mixu.

Důkladně promíchejte 10 sekund vířením a inkubujte za stálého protřepávání 10-15 minut při 65 °C.

Inkubujte 10 minut při 95 °C

1.d) Lýza vzorku pro purifikaci genomové DNA

Smíchejte 200 µl vzorku s 220 µl **lyzačního pufu HLT** a 20 µl **proteinázy K** ve 2 ml zkumavce Safe Lock.

Případně přidejte ke každému vzorku 240 µl Master Mixu.

Důkladně promíchejte 10 sekund vířením a inkubujte za stálého protřepávání 10-15 minut při 65 °C.

Inkubujte 10 minut při 95 °C (vynechat pro izolaci genomové DNA ze zředěných vzorků krve).

Poznámka: Pokud chcete přidat nukleové kyseliny pro kontrolu extrakce, přidejte je nyní, před vazebným krokem.

2. Přidejte 260 µl **roztoku pro zajištění vazby NK na membránu** a pipetováním nahoru a dolů nebo vířením zcela promíchejte. Vzorek inkubujte při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Vezměte si sadu RTA Spin filtrů. Přeneste směs do RTA Spin filtru. Odstředějte 1 minutu při 11 000 x g. Vyhodte eluční zkumavku RTA s filtrátem a vložte RTA Spin filtr do nové eluční zkumavky RTA.
3. Přidejte 600 µl **promývacího pufru HLT** do RTA Spin filtru a odstředějte 1 minutu při otáčkách 11 000 x g. Eluční zkumavku RTA s filtrátem vyhodte a nový RTA Spin filtr vložte do nové eluční zkumavky RTA.
4. Přidejte 700 µl **promývacího pufru** do RTA Spin filtru a odstředějte 1 minutu při 11 000 x g. Filtrát vyhodte a RTA Spin filtr vložte zpět do použité RTA přijímací zkumavky.
5. Přidejte 700 µl **promývacího pufru** do RTA Spin filtru a odstředějte 1 minutu při 11 000 x g. Filtrát vyhodte a RTA Spin filtr vložte zpět do použité RTA přijímací zkumavky.
6. Odstředějte 5 minut při 11 000 x g, aby se etanol zcela odstranil. Eluční zkumavku RTA s filtrátem zlikvidujte, RTA Spin filtr zachovejte, nese Vaši NK.
7. Umístěte RTA Spin filtr do 1,5 ml eluční zkumavky. Přidejte 50-200 µl předehřátého (65 °C) **elučního pufru M** přímo na povrch RTA Spin filtru. Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 1 minuty. Odstředějte při 11 000 x g po dobu 1 minuty. Zlikvidujte RTA Spin filtr. Uzavřete 1,5 ml přijímací zkumavku a uchovávejte vzorek při -20 °C až -80 °C.

4. Příloha

4.1 Řešení problémů

Problém	Možná příčina	Doporučení
Nízké množství nukleových kyselin	Nedostatečná lýza buněk	Prodloužení doby lýzy pomocí lyzačního pufru HLT . Kontinuální třepání zvyšuje účinnost lýzy. Snížení množství výchozího materiálu, aby nedošlo k přetížení kolony.
	Neúplná eluce	Prodloužení doby inkubace s předehřátým elučním pufrem M na 5-10 minut. Krok eluce opakujte dvakrát, vždy se 100 µl elučního pufru M . Použijte větší objem elučního pufru M .
	Nízká koncentrace nukleových kyselin ve vzorku	Nukleové kyseliny eluujte menším objemem elučního pufru M , nepoužívejte objemy menší než 30 µl.
	Nesprávné skladování výchozího materiálu	Zajistěte vhodné skladování výchozího materiálu. Vyhněte se opakovaným cyklům rozmrazování a zmrazování materiálu vzorku.
	Promývací pufrы byly nesprávně připraveny	Zajistěte, aby bylo do promývacích pufrů přidáno správné množství ethanolu/isopropanolu a aby byly všechny roztoky uloženy pevně uzavřené.
	Příliš nízký objem/koncentrace proteinázy K	Ujistěte se, že lyofilizovaná Proteináza K je před použitím resuspendována s příslušným objemem vody.
Degradované nukleové kyseliny	Nesprávné skladování výchozího materiálu	Zajistěte, aby byl vzorek správně odebrán a uložen, více informací naleznete v sekci FAQ na našich webových stránkách.
	Starý materiál	Zajistěte, aby byl výchozí materiál skladován při vhodných podmínkách (-20 °C/-80 °C).
Nukleové kyseliny nemají dobré výsledky v následných aplikacích (např. PCR v reálném čase nebo NGS).	Přenos ethanolu během eluce	Prodloužení doby sušení pro odstranění ethanolu.
	Přenos soli během eluce	Zkontrolujte, zda se v promývacích pufrech nesráží soli. Pokud jsou viditelné sraženiny, vyřešte je opatrným zahřátím na 30 °C. Před použitím se ujistěte, že promývací pufrы mají pokojovou teplotu.
Barevné zbytky na RTA Spin filtru po promývání	Nedostatečná lýza buněk	Viz výše
	Neúčinné promývání	Opětovné promytí promývacím pufrem
	Promývací pufrы byly nesprávně připraveny	Viz výše

4.2 Záruka

Společnost Invitek Molecular zaručuje správnou funkci soupravy pro aplikace popsané v tomto návodu a v souladu s určeným použitím. V souladu s certifikovaným systémem řízení kvality společnosti Invitek Molecular podle normy EN ISO 13485 byl výkon všech součástí soupravy testován, aby byla zajištěna kvalita výrobku.

Jakékoli problémy, incidenty nebo závady musí být neprodleně po zjištění nahlášeny společnosti Invitek Molecular. Ihned po obdržení zkontrolujte, zda je výrobek kompletní a neporušený. V případě jakýchkoli nesrovnalostí musíte společnost Invitek Molecular neprodleně písemně informovat. Na úpravy soupravy a protokolů a použití, které se odchyľují od zamýšleného účelu, se nevztahuje žádná záruka.

Společnost Invitek Molecular si vyhrazuje právo kdykoli změnit, upravit nebo modifikovat jakýkoli výrobek za účelem zlepšení jeho výkonu a designu.

Společnost Invitek Molecular poskytuje záruku na produkty, jak je uvedeno ve Všeobecných obchodních podmínkách, které jsou k dispozici na [adrese](http://www.invitek.com) www.invitek.com. V případě jakýchkoli dotazů se obraťte na techsupport@invitek.com.

4.3 Symboly používané na výrobku a označení



Výrobce



Číslo šarže



Jedinečný identifikátor zdravotnického prostředku



Katalogové číslo



Datum expirace



Přečtěte si návod k obsluze



Omezení teploty



Nepoužívejte znovu



Množství reakcí v balení



In vitro diagnostický zdravotnický prostředek

4.4 Další dokumenty a doplňující informace

Další informace naleznete [na stránkách](http://www.invitek.com) www.invitek.com:

- Často kladené dotazy (FAQ) a tipy pro řešení potíží
- Příručky v různých jazycích
- Bezpečnostní listy (MSDS)
- Webová podpora
- Produktová videa

Pokud i přes pečlivé prostudování návodu k obsluze a dalších informací potřebujete pomoc, kontaktujte nás na adrese techsupport@invitek.com nebo Vašeho lokálního prodejce.

4.5 Informace pro objednání

Produkt	Velikost balení	Katalogové číslo
Univerzální sada InviSorb® Spin	50 izolací	1050100200
Univerzální sada InviSorb® Spin	250 izolací	1050100300

Historie revizí

Revize	Datum	Popis
EN-v1-2022	2022-05-18	Nový dokument
EN-v2-2023	2023-04-17	Aktualizace kontaktních údajů a firemního designu s ohledem na změnu značky společnosti.
EN-v3-2024	2024-01-24	Aktualizace standardních vět o nebezpečnosti a pokynů pro bezpečné zacházení



INVITEK diagnostics

PORTUGALSKO

Zona Industrial de Tondela, ZIM II, Lote 2 e 6
63460-070 Tondela
Portugalsko

Telefon: +351 232 817 817

NĚMECKO

Robert-Rössle-Str. 10
13125
Berlín
Německo

Telefon: +49 30 9489 2908

info@invitek.com
www.invitek.com