

IndiMag® Pathogen Cartridge

Instrukcja obsługi

Produkt do zautomatyzowanego
oczyszczania wirusowego RNA i DNA oraz
bakteryjnego DNA z próbek zwierzęcych
przy użyciu systemów wykorzystujących
technologie cząstek magnetycznych



2 bloki 24-próbkowe (nr kat. SP947654P224) do użycia ze
stacją roboczą IndiMag 48/s



6 bloków 8-próbkowych (nr kat. SP947654P608) do użycia ze
stacją roboczą IndiMag 48/s



1 blok 96-próbkowy (nr kat. SP947855P196) do użycia ze
stacjami roboczymi KingFisher™ Flex i BioSprint® 96 lub
równoważną stacją roboczą



INDICAL BIOSCIENCE GmbH, Deutscher Platz 5b,
04103 Leipzig, Niemcy

Spis treści

Zawartość zestawu	4
Odpowiednie stacje robocze i protokoły	5
Stacje robocze	5
Protokoły	5
Przechowywanie	7
Przeznaczenie	7
Symbole	8
Informacje dotyczące bezpieczeństwa	8
Kontrola jakości	9
Wstęp	10
Zasada działania i procedura	11
Protokół oczyszczania kwasu nukleinowego	13
Obróbka wstępna	14
Sprzęt i odczynniki zapewniane przez użytkownika	17
Ważne informacje	18
Materiał wyjściowy	18
Uzysk kwasów nukleinowych	21
Używanie nośnika Carrier RNA i kontroli wewnętrznych	22
Przechowywanie kwasów nukleinowych	23
Postępowanie z RNA	23
Protokół: Oczyszczanie kwasów nukleinowych patogenów z próbek płynnych	24
Ważne informacje przed rozpoczęciem	24
Czynności do wykonania przed rozpoczęciem	24
Procedura dla stacji roboczej IndiMag 48 lub IndiMag 48s	26
Procedura dla stacji roboczej KingFisher Flex (lub podobnej)	27

Rozwiązywanie problemów	29
Informacje dotyczące zamawiania.....	31
Indeks zmian.....	32

Zawartość zestawu

IndiMag Pathogen Cartridge			
Nr kat.	SP947654P224	SP947654P608	SP947855P196
Liczba przygotowań	48	48	96
Cartridge (Kaseta) ¹	2 x 24	6 x 8	5 x 96 ³
Lysis Buffer (Bufor do lizy) ²	1 x 24 ml	1 x 24 ml	1 x 48 ml
Rod Cover (Osłona pręta)	6 pasków	6 pasków	1 płytka
Quick-Start Protocol (Protokół szybkiego uruchamiania) (PCard)	1	1	1

1 OSTRZEŻENIE: Zawiera sól chaotropową, etanol i azydek sodu. Należy podjąć odpowiednie środki ostrożności w laboratorium i nosić rękawiczki podczas pracy. Produkt nie jest zgodny ze środkami dezynfekującymi zawierającymi wybielacz. Informacje dotyczące bezpieczeństwa znajdują się na stronie 8.

2 OSTRZEŻENIE: Zawiera sól chaotropową i izopropanol. Należy podjąć odpowiednie środki ostrożności w laboratorium i nosić rękawiczki podczas pracy. Produkt nie jest zgodny ze środkami dezynfekującymi zawierającymi wybielacz. Informacje dotyczące bezpieczeństwa znajdują się na stronie 8.

3 po 1 płytce: Lysate, Wash Buffer 1, Wash Buffer 2, Wash Buffer 3, Elution

Odpowiednie stacje robocze i protokoły

Stacje robocze

Do stosowania z kasetą IndiMag Pathogen Cartridge nadają się następujące stacje robocze:

Do stosowania z kasetą IndiMag Pathogen IM48 Cartridge

- IndiMag 48
- IndiMag 48s

Do stosowania z kasetą IndiMag Pathogen KF96 Cartridge

- KingFisher Flex
- KingFisher 96
- BioSprint 96

Protokoły

Należy pamiętać, że stacje robocze IndiMag 48 i IndiMag 48s są dostarczane z fabrycznie zainstalowanym protokołem „Pathogen”.

W stacji roboczej KingFisher Flex lub alternatywnym urządzeniu wykorzystywane są odpowiednie skrypty wymienione w Tabeli 1 na stronie 6.

Tabela 1: Nazwy skryptów w zależności od używanego urządzenia i oprogramowania

Urządzenie	Oprogramowanie	Nazwa skryptu
KingFisher Flex	BindIt	IndiMag_C_Pathogen_KF_Flex.bdz
KingFisher 96	BindIt	IndiMag_C_Pathogen_KF96.bdz
KingFisher 96	KingFisher	IndiMag_C_Pathogen_KF96.kf2
BioSprint 96	BioSprint	IndiMag_C_Pathogen_BS96.kf2

W celu uzyskania dalszych informacji lub w przypadku pytań dotyczących kwestii technicznych należy skontaktować się z działem pomocy firmy INDICAL za pośrednictwem adresu e-mail **support@indical.com**.

Przechowywanie

Wszystkie bufor i odczynniki przechowywane w temperaturze pokojowej (15–25°C) zachowują stabilność do daty ważności podanej na opakowaniu zestawu. Przechowywanie w takich warunkach nie ma negatywnego wpływu na ich skuteczność.

Przeznaczenie

Kaseta IndiMag Pathogen Cartridge jest przeznaczona do zautomatyzowanej izolacji kwasów nukleinowych patogenów (wirusowego RNA i DNA oraz bakteryjnego DNA) z pobranych od zwierząt próbek krwi pełnej, surowicy, osocza, innych płynów ustrojowych, wymazów, popłuczyn i homogenatów tkankowych przy użyciu systemów wykorzystujących technologię cząstek magnetycznych, takich jak np. IndiMag 48/s i KingFisher Flex lub równoważne stacje robocze.

Do zastosowań z zakresu biologii molekularnej.

Symbole



Oficjalny producent



Nr serii



Termin ważności



Zakres dopuszczalnych temperatur przechowywania



Instrukcja obsługi



Numer katalogowy



Numer materiału

Informacje dotyczące bezpieczeństwa

Podczas pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze używać odpowiedniego fartucha laboratoryjnego, rękawiczek jednorazowych i okularów ochronnych. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z odpowiednimi kartami charakterystyki (Safety Data Sheet, SDS). Można je uzyskać od lokalnego przedstawiciela handlowego lub wysyłając zapytanie na adres e-mail **compliance@indical.com**.



OSTRZEŻENIE: NIE dolewać wybielacza ani roztworów kwasowych bezpośrednio do odpadów powstałych po przygotowaniu próbek.

Kaseta IndiMag Pathogen Cartridge i bufor Lysis Buffer zawierają chlorowoderek guanidyny i tiocyjanian guanidyny, które w połączeniu z wybielaczem mogą tworzyć wysoce reaktywne związki.

W przypadku rozlania płynu zawierającego te bufor należy usunąć go za pomocą odpowiedniego detergentu laboratoryjnego i wody. Jeśli rozlany płyn zawiera czynniki potencjalnie zakaźne, należy wyczyścić zalany obszar najpierw detergentem laboratoryjnym i wodą, a następnie 1-procentowym (stężenie objętościowe) podchlorynem sodu.

Kontrola jakości

Zgodnie z poświadczonym certyfikatem ISO systemem zarządzania jakością firmy INDICAL każda seria kaset IndiMag Pathogen Cartridge jest testowana pod kątem wstępnie ustalonych specyfikacji w celu zapewnienia spójnej jakości produktu.

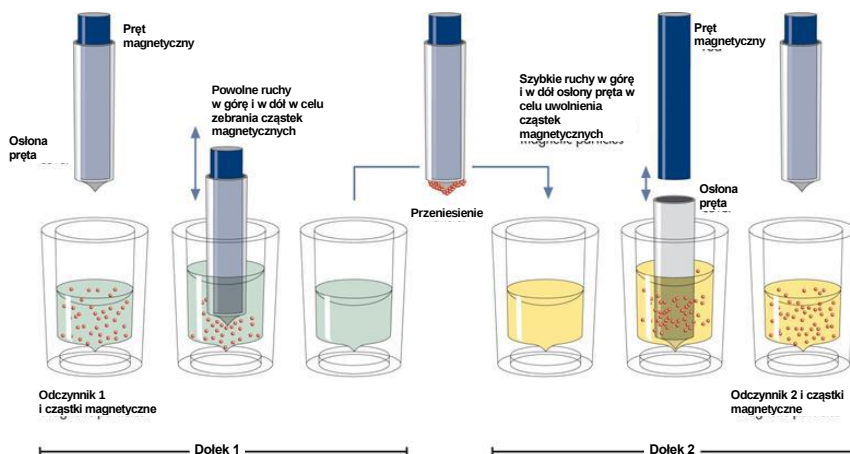
Wstęp

Technologia kulek magnetycznych umożliwia otrzymanie oczyszczonych kwasów nukleinowych o wysokiej jakości, wolnych od białek, nukleaz i innych zanieczyszczeń. Oczyszczone kwasy nukleinowe są gotowe do użycia w dalszych procedurach analitycznych, takich jak reakcje amplifikacji lub inne reakcje enzymatyczne.

Kaseta IndiMag Pathogen Cartridge umożliwia szybkie oczyszczenie wirusowego RNA i DNA, jak również bakteryjnego DNA, z szerokiej gamy próbek zwierzęcych (patrz Tabela 2 na stronie 14) przy użyciu systemów wykorzystujących technologię cząstek magnetycznych, takich jak IndiMag 48/s i KingFisher Flex lub równoważne stacje robocze (patrz część „Materiał wyjściowy” na stronie 18). Użytkownik powinien jednak zwalidować konkretne kombinacje typów próbek i badanych patogenów.

Zasada działania i procedura

W kasie IndiMag Pathogen Cartridge do oczyszczania kwasów nukleinowych wykorzystywana jest technologia cząstek magnetycznych MagAttract®. Technologia ta łączy szybkość i skuteczność oczyszczania kwasów nukleinowych opartego na złożu krzemionkowym z wygodną manipulacją cząstkami magnetycznymi (Ryc. 1 na stronie 11).

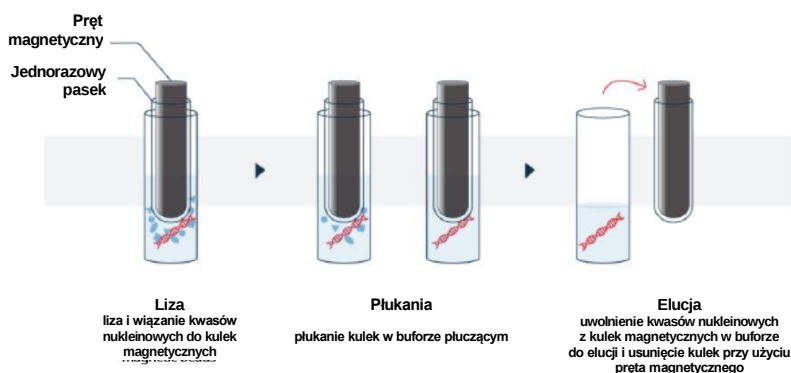


Ryc. 1. Schemat oczyszczania przy użyciu kulek magnetycznych. Stacja robocza przetwarza próbkę zawierającą cząstki magnetyczne w następujący sposób: Etap 1) Pręt magnetyczny zabezpieczony osłoną pręta jest wprowadzany do dołka (patrz dołek 1 na rycinie) z próbką i przyciąga cząstki magnetyczne. Etap 2) Osłona pręta magnetycznego jest umieszczana nad kolejnym dołkiem (patrz dołek 2 na rycinie), a cząstki magnetyczne są uwalniane. Podczas przetwarzania próbki etapy 1 i 2 są powtarzane kilka razy.

Procedura oczyszczania została zaprojektowana w taki sposób, aby zagwarantować wygodę i odtwarzalność podczas postępowania z potencjalnie zakaźnymi próbkami (Ryc. 2 na stronie 12).

W zależności od materiału wyjściowego próbki można zastosować etap lizy w obecności soli chaotropowych i proteiny K, który prowadzi do

uwolnienia kwasów nukleinowych, a następnie ich przyłączenia do krzemionkowej powierzchni cząstek magnetycznych MagAttract. DNA i RNA związane z cząstkami magnetycznymi są następnie skutecznie wypłukiwane oraz suszone na powietrzu. Wysokiej jakości kwasy nukleinowe są następnie eluowane przy użyciu odczynnika Buffer AVE. Uzysk kwasów nukleinowych jest zależny od typu i sposobu przechowywania próbki.



Ryc. 2. Schematyczny opis kroków protokołu

Protokół oczyszczania kwasu nukleinowego

Protokół „Oczyszczanie kwasów nukleinowych patogenów z próbek płynnych” (strona 24) został zoptymalizowany do oczyszczania wirusowego RNA i DNA oraz DNA łatwo ulegających lizie bakterii z materiału płynnego o objętości do 200 µl. Odpowiedni materiał wyjściowy do **przetwarzania bezpośredniego** przy użyciu tej metody to:

- krew pełna
- surowica
- osocze
- wydzielina z jamy ustnej
- płyny z jam ciała (np. otrzewnowy, stawowy, mózgowo-rdzeniowy)
- płyn wyekstrahowany z wymazówek (np. z wymazów z nosa, gardła i kloaki*)
- popłuczyny (np. z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego)
- inne płyny, takie jak mocz lub zawiesiny kału*

Tabela 2 na stronie 14 zawiera spis protokołów obróbki wstępnej odpowiadających różnym kombinacjom materiałów wyjściowych i patogenów. Protokoły te są przeznaczone do stosowania w przypadku próbek, dla których przed oczyszczeniem kwasów nukleinowych wymagane jest przeprowadzenie obróbki wstępnej.

Czas oczyszczania próbki wynosi około 34 minuty, nie uwzględniając czynności wstępnych, takich jak odwirowanie i pipetowanie próbek oraz buforu Lysis Buffer.

* Podczas przetwarzania próbek z dużą zawartością inhibitorów, takich jak próbki moczu lub kału, może być konieczne zastosowanie mniejszej wejściowej objętości próbki lub wykonanie dalszych pomiarów. W celu uzyskania dalszych zaleceń dotyczących obróbki wstępnej należy skontaktować się z działem pomocy firmy INDICAL (support@indical.com).

Obróbka wstępna

Sposoby obróbki wstępnej podane w niniejszym podręczniku zostały zoptymalizowane względem konkretnych kombinacji materiałów wyjściowych i patogenów docelowych.

Wybór sposobu obróbki wstępnej jest uzależniony od przeznaczenia procedury. Po obróbce wykonywane jest oczyszczanie kwasu nukleinowego.

Tabela 2 na stronie 14 zawiera podsumowanie sposobów obróbki wstępnej oraz ich zastosowań.

W przypadku niektórych sposobów obróbki wstępnej może być wymagane zastosowanie dodatkowych elementów, wskazanych w poszczególnych protokołach obróbki wstępnej.

Tabela 2: Protokoły obróbki wstępnej dla próbek płynnych i próbek tkanek

Próbka	Materiał docelowy	Obróbka wstępna	Instrukcja obsługi
Płyny (np. krew pełna, surowica, osocze, płyn z wymazu lub płukania, tkanka po obróbce wstępnej)	Wirusowy RNA i DNA, DNA bakterii łatwo ulegających lizie ¹	-	-
Krew pełna lub tkanka po obróbce wstępnej	DNA bakterii trudno ulegających lizie ¹	Pretreatment B1 do bakterii trudno ulegających lizie w próbkach krwi pełnej i tkanek po obróbce wstępnej	HB-2533
Surowica, osocze, wymazy, popłuczyny, płyny z jam ciała, moc	DNA bakterii trudno ulegających lizie ¹	Pretreatment B2 do bakterii trudno ulegających lizie w próbkach płynów ustrojowych ²	HB-2534

Duże objętości płynów niezawierających komórek	Bakterie łatwo ulegające lizie	Pretreatment B3 do łatwo ulegających lizie bakterii w dużych objętościach próbek płynów niezawierających komórek	HB-2549
Tkanka (np. wątroby, śledziony, nerki, węzła chłonного)	Kwasy nukleinowe patogenów	Pretreatment T1 Mechaniczne rozerwanie struktur tkanki	HB-2535
	Wirusowy DNA ³ , bakteryjny DNA ⁴	Pretreatment T2 Enzymatyczne trawienie tkanki	HB-2536
Tkanka poddawana szybkiemu niekompletnemu rozerwaniu struktur	Wirusowy RNA i DNA, DNA bakterii łatwo ulegających lizie ¹	Pretreatment T3	HB-2537
Tkanka z dużą zawartością lipidów i/lub nukleaz (np. mózg, trzustka)	Wirusowy RNA i DNA, DNA bakterii łatwo ulegających lizie ¹	Pretreatment T4	HB-2538

Kał	Wirusowy RNA i DNA	Pretreatment F1 Metoda zawieszania bez lizy	HB-2513
	Bakteryjny DNA ¹ i wirusowy DNA	Pretreatment F2 Metoda zawieszania z lizą	HB-2514
	DNA <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> (MAP)	Pretreatment F-MAP	HB-2503
Karty z bibuły filtracyjnej		Pretreatment C1	HB-2520
Wymazy (z tchawicy, z jamy ustno-gardłowej, krwi)		Pretreatment S1	HB-2516

1 Bakterie Gram-dodatnie trudno ulegają lizie ze względu na ich sztywną ścianę komórkową. Wiele bakterii Gram-ujemnych łatwo ulega lizie, ale nie wszystkie. W takich przypadkach zastosowanie protokołu Pretreatment B1 lub Pretreatment B2 może być również korzystne.

2 Nie nadaje się do stosowania z próbkami krwi pełnej.

3 Nie nadaje się do wirusowego RNA, ponieważ warunki, w których przeprowadzana jest liza, nie zapewniają wystarczającej ochrony integralności RNA.

4 W przypadku bakterii trudno ulegających lizie należy zastosować protokół Pretreatment B1.

W celu uzyskania dalszych informacji dotyczących protokołów obróbki wstępnej należy skontaktować się z działem pomocy firmy INDICAL za pośrednictwem adresu e-mail **support@indical.com**.

Sprzęt i odczynniki zapewniane przez użytkownika

Podczas pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze używać odpowiedniego fartucha laboratoryjnego, rękawiczek jednorazowych i okularów ochronnych. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z kartami charakterystyki (Safety Data Sheet, SDS) dostępnymi u dostawcy produktu.

- IndiMag 48/ IndiMag 48s, KingFisher Flex lub równoważna stacja robocza
 - Pipety i jednorazowe końcówki do pipet z barierami aerozolowymi (20–1000 µl)
 - Pipeta wielokanałowa i jednorazowe końcówki do pipet (1000 µl) z barierami aerozolowymi
 - Multidispenser
 - Sól fizjologiczna buforowana fosforanem (Phosphate-Buffered Saline, PBS), może być wymagana do rozcieńczania próbek
 - Wytrząsarka
 - Wirówka do odwirowywania kaset przed użyciem
 - Miękka ściereczka lub chusteczka i 70-procentowy roztwór etanolu lub inny środek dezynfekujący do czyszczenia używanego stołu roboczego
- Uwaga:** Przed wykonaniem czyszczenia lub konserwacji urządzenia do izolacji należy najpierw zapoznać się z odpowiednim podręcznikiem użytkownika

Ważne informacje

Materiał wyjściowy

Protokoły opisane w tej instrukcji obsługi zostały zoptymalizowane pod kątem oczyszczania wirusowych i bakteryjnych kwasów nukleinowych z próbek o niskiej do średniej złożoności, zawierających materiał łatwo ulegający lizie. W protokole IndiMag Pathogen dostępny jest specjalny krok, w którym jednocześnie wykonywane są wydajna liza i wiązanie, umożliwiając w ten sposób szybkie i proste przetworzenie próbki. W przypadku próbek o większej złożoności, takich jak próbki tkanek, kału lub zawierające patogeny trudno ulegające lizie, jak np. bakterie Gram-dodatnie, może być konieczne zastosowanie obróbki wstępnej obejmującej specjalistyczne rozerwanie struktur tkankowych i/lub lizę. Użytkownik powinien z wyprzedzeniem wybrać odpowiednią metodę obróbki wstępnej w przypadku materiałów tego typu. Informacje ogólne na temat zalecanych typów próbek zawierają poniższe sekcje. W celu uzyskania dalszych informacji należy skontaktować się z działem pomocy firmy INDICAL za pośrednictwem adresu e-mail **support@indical.com**.

W celu przeprowadzenia wydajnej izolacji kwasów nukleinowych patogenów z płynów o wysokiej lepkości może być wymagane zastosowanie obróbki obniżającej ich lepkość. Odpowiednie zalecenia można uzyskać, kontaktując się z działem pomocy firmy INDICAL za pośrednictwem adresu e-mail **support@indical.com**.

Należy unikać wielokrotnego rozmrażania i zamrażania próbek, ponieważ może to doprowadzić do zmniejszenia uzysku kwasów nukleinowych oraz obniżenia ich jakości.

Zwierzęca krew pełna

W celu oczyszczenia kwasu nukleinowego można użyć próbek krwi z dodatkiem antykoagulantów w postaci EDTA, cytrynianu lub heparyny. Próbkę mogą być świeże lub mrożone, pod warunkiem że nie były zamrażane i rozmrażane więcej niż jeden raz. Wykonanie więcej niż jednego cyklu zamrażania-rozmrażania może prowadzić do denaturacji i wytrącania białek, powodując obniżenie miana wirusów, a co za tym idzie obniżenie uzysków wirusowych kwasów nukleinowych.

Po pobraniu i odwirowaniu próbki krwi pełnej można przechowywać w temperaturze 2–8°C przez maksymalnie 6 godzin. W celu przechowywania długoterminowego zalecane jest podzielenie próbek na porcje i zamrożenie ich w temperaturze od -30 do -15°C lub w temperaturze -70°C.

Zalecane jest stosowanie próbek krwi o objętości 50–200 µl zawierających erytrocyty bezjądrzaste. Silnie podwyższona liczba krwinek spowodowana stanem zapalnym lub chorobą nowotworową może jednak spowodować silne podwyższenie ilości kwasów nukleinowych w próbce gospodarza. W takim przypadku obniżenie wejściowej objętości próbki do 50 µl może poprawić wyniki dalszych oznaczeń, szczególnie reakcji RT-PCR.

Jeśli używana objętość próbki krwi jest niższa niż 200 µl, należy ją uzupełnić do 200 µl przy użyciu buforu PBS lub NaCl w stężeniu 0,9%.

W przypadku próbek krwi zawierających erytrocyty jądrzaste (np. pobranych od ptaków lub ryb) należy zastosować próbkę krwi o objętości mniejszej niż 50 µl i uzupełnić ją do 200 µl przy użyciu buforu PBS lub NaCl w stężeniu 0,9%.

Zwierzęce próbki surowicy, osocza, innych płynów ustrojowych, wymazów i popłuczyn

Zamrożonych próbek osocza lub surowicy przed przetworzeniem nie należy rozmrażać więcej niż jeden raz.

Można przetwarzać próbki surowicy, osocza, innych płynów ustrojowych, supernatantów z podłoża z wymazówką lub popłuczyn o maksymalnej objętości wynoszącej 200 µl.

Podczas przetwarzania próbek z bardzo dużą zawartością inhibitorów, takich jak próbki moczu lub zawieszonego kału, może być konieczne zastosowanie mniejszej wejściowej objętości próbki i/lub dodatkowej obróbki wstępnej w celu usunięcia inhibitorów. W celu obniżenia objętości wejściowej należy zastosować 25–50 µl próbki i uzupełnić jej objętość do 200 µl przy użyciu buforu PBS lub NaCl w stężeniu 0,9%.

Na potrzeby izolacji bakteryjnego DNA można zastosować wejściową objętość próbki większą niż 200 µl, np. 1,5 ml, w celu poprawy czułości detekcji materiału bakteryjnego. Bakterie Gram-ujemne w płynach niezawierających komórek można zagęścić poprzez odwirowanie większych objętości. Osad należy ponownie zawiesić w buforze PBS i zastosować 200 µl jako objętość wyjściową. W celu izolacji DNA z bakterii trudno ulegających lizie należy zastosować protokół Pretreatment B2.

Tkanki zwierzęce

Warunkiem wstępnym podczas pracy przy użyciu tkanek zwierzęcych jest mechaniczne lub enzymatyczne rozerwanie struktur tkanki, umożliwiające uwolnienie komórek, następnie uwolnienie kwasów nukleinowych oraz zapewnienie odpowiedniej przepuszczalności błony komórkowej.

Różne typy tkanek mogą się znacznie różnić pod względem tekstury i sztywności, typów komórek oraz zawartości kwasów nukleinowych gospodarza i inhibitorów. Dodatkowo lokalizacja kwasów nukleinowych

patogenów w tkance może się różnić w zależności od typu tkanki, patogenu oraz stadium zakażenia. Informacje na temat dodatkowych protokołów wstępnej obróbki próbek tkanek, w tym informacje dotyczące szybkiego protokołu, oraz zalecenia dla tkanek trudnych są dostępne w dziale pomocy firmy INDICAL.

Jako ilości wyjściowej można użyć do 25 mg świeżej lub zamrożonej tkanki. W przypadku tkanek z bardzo wysoką zawartością komórek w stosunku do danej masy tkanki (np. tkanka śledziony) należy zastosować mniejszą ilość materiału wyjściowego (5–10 mg).

Uwaga: Części nienaruszone pozostałe w homogenacie mogą łączyć się z cząstkami magnetycznymi MagAttract, co może doprowadzić do zmniejszenia uzysku kwasów nukleinowych.

Uzysk kwasów nukleinowych

W przypadku próbek zawierających małą ilość komórek (np. surowicy lub osocza) uzysk wirusowych kwasów nukleinowych może być niższy niż 1 µg, dlatego oznaczenie ilościowe przy użyciu spektrofotometru może być trudne. Ponadto eluaty przygotowane z nośnikiem Carrier RNA mogą zawierać dużo więcej nośnika Carrier RNA niż docelowych kwasów nukleinowych. W kasecie IndiMag Pathogen Cartridge odzyskiwane są wszystkie kwasy nukleinowe. Dlatego, oprócz wirusowego RNA i DNA oraz bakteryjnego DNA, równocześnie oczyszczane są również komórkowe DNA i RNA zawarte we wszystkich komórkach znajdujących się w próbce; rozróżnienie oczyszczonych kwasów nukleinowych podczas pomiaru spektrofotometrycznego jest niemożliwe. Zalecane jest stosowanie ilościowych metod amplifikacji, takich jak ilościowa reakcja PCR w czasie rzeczywistym lub RT-PCR w czasie rzeczywistym, umożliwiających określenie uzysków kwasów nukleinowych poszczególnych patogenów.

Używanie nośnika Carrier RNA i kontroli wewnętrznych

Carrier RNA

Gotowy do użycia bufor Lysis Buffer zawiera nośnik Carrier RNA. Nośnik wzmacnia adsorpcję wirusowego RNA i DNA do cząstek magnetycznych, co jest szczególnie ważne, gdy ilość cząsteczek docelowych w próbce nie jest duża. Ponadto nadmiar nośnika Carrier RNA zmniejsza prawdopodobieństwo degradacji wirusowego RNA w rzadkich przypadkach, gdy cząsteczki RNaz nie ulegną denaturacji pod wpływem soli chaotropowych i detergentów zawartych w buforze do lizy.

Kontrola wewnętrzna

Zastosowanie kontroli wewnętrznych, takich jak intype IC-DNA lub intype IC-RNA jest opcjonalne i zależy od wybranego systemu do amplifikacji. Stosowanie kasety IndiMag Pathogen Cartridge z systemami do amplifikacji, które wykorzystują kontrole wewnętrzne, może wymagać włączenia tych kontroli do procedury oczyszczania w celu monitorowania wydajności przygotowywania próbki i dalszych oznaczeń.

Niezabezpieczone kwasy nukleinowe będące kontrolami wewnętrznymi (np. plazmidowy DNA lub transkrybowany in vitro RNA) należy dodać wyłącznie do buforu Lysis Buffer. Kwasów nukleinowych będących kontrolami wewnętrznymi nie należy dodawać bezpośrednio do próbki.

Ilość dodawanej kontroli wewnętrznej zależy od systemu oznaczenia oraz objętości elucji. Użytkownik musi ocenić, jaka ilość kwasów nukleinowych będących kontrolami wewnętrznymi jest odpowiednia. W celu określenia optymalnego stężenia kontroli wewnętrznej należy zapoznać się z instrukcjami producenta lub skontaktować się z działem pomocy firmy INDICAL (**support@indical.com**), aby uzyskać więcej informacji.

Przechowywanie kwasów nukleinowych

W przypadku przechowywania krótkoterminowego, wynoszącego maksymalnie 24 godziny, zalecane jest, aby próbki oczyszczonego wirusowego RNA i DNA były przechowywane w temperaturze 2–8°C. W przypadku przechowywania długoterminowego, wynoszącego więcej niż 24 godziny, zalecane jest, aby próbki oczyszczonych kwasów nukleinowych były przechowywane w temperaturze od -30 do -15°C, lub w przypadku RNA nawet -70°C.

Postępowanie z RNA

RNazy są bardzo stabilnymi i aktywnymi enzymami, które na ogół nie wymagają kofaktorów do działania. Ponieważ RNazy trudno inaktywować i nawet ich bardzo małe ilości wystarczają do zniszczenia RNA, nie należy używać jakiegokolwiek sprzętu wykonanego ze szkła lub tworzywa sztucznego bez wcześniejszego wyeliminowania możliwego zanieczyszczenia RNazami. Należy zachować ostrożność, aby nie dopuścić do przypadkowego wprowadzenia RNaz do próbki RNA w trakcie trwania lub po zakończeniu procedury oczyszczania.

Protokół: Oczyszczanie kwasów nukleinowych patogenów z próbek płynnych

Protokół jest przeznaczony do oczyszczania wirusowego RNA i DNA oraz DNA łatwo ulegających lizie bakterii z próbek płynnych lub próbek tkanek po obróbce wstępnej przy użyciu systemów wykorzystujących technologię cząstek magnetycznych, takich jak IndiMag 48/ IndiMag 48s i KingFisher Flex, oraz kompatybilnej kasety IndiMag Pathogen Cartridge.

Ważne informacje przed rozpoczęciem

- Upewnić się, że użytkownik potrafi obsługiwać stację roboczą. Instrukcje dotyczące obsługi stacji zawiera odpowiedni podręcznik użytkownika.
- Przed rozpoczęciem procedury należy przeczytać część „Ważne informacje” (na stronie 18).

Czynności do wykonania przed rozpoczęciem

- Rozmrozić próbki i doprowadzić je do temperatury pokojowej (15–25°C).
- Jeśli objętość próbki jest mniejsza niż 200 µl, dolać buforu PBS lub NaCl w stężeniu 0,9%, aby uzyskać końcową objętość 200 µl.
- Przed użyciem należy kilkakrotnie obrócić kasetę IndiMag Pathogen IM48 Cartridge lub płytkę „Wash 1” kasety IndiMag Pathogen KF96 Cartridge (w zależności od stosowanego zestawu), tak aby kulki swobodnie unosiły się w roztworze. Odwirować kasetę w temperaturze pokojowej (15–25°C) przez 1 minutę przy 500 x g.

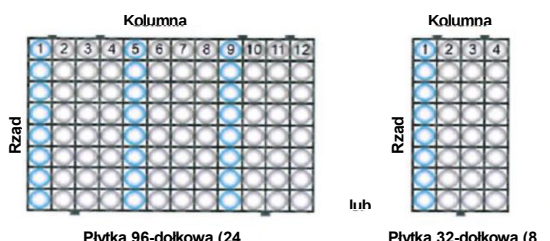
Uwaga: W celu odwirowania kaset IndiMag Pathogen IM48 wymagany jest specjalny adapter do odwirowywania IndiMag.

Ważne: Buforu Lysis Buffer nie należy dodawać bezpośrednio do dołków w pierwszej (zaznaczonej na niebiesko na poniższej rycinie) kolumnie! Może to spowodować zlepienie cząstek lub wytrącenie osadu. Należy postępować zgodnie z procedurą opisaną poniżej (pipetowanie próbek do dołków, a następnie dodanie buforu Lysis Buffer).

Procedura dla stacji roboczej IndiMag 48 lub IndiMag 48s

1. Przed użyciem kilkakrotnie odwrócić kasetę, tak aby kulki swobodnie unosiły się w roztworze.
2. Kasetę w specjalnym adapterze do odwirowywania IndiMag odwirować w temperaturze pokojowej (15–25°C) przez 1 minutę przy 500 x g.
3. Ostrożnie zdjąć folię pokrywającą kasetę.
4. Za pomocą pipety przenieść 200 µl próbki na dno dołka w pierwszej kolumnie (zaznaczonej na niebiesko na Ryc. 3).

Uwaga: Jeśli objętość próbki jest mniejsza niż 200 µl, należy ją zwiększyć do 200 µl, dodając buforu PBS.



Ryc. 3. Różne typy i konfiguracje kaset

5. Za pomocą pipety dodać po 500 µl buforu Lysis Buffer do poszczególnych próbek w pierwszej kolumnie (zaznaczonej na niebiesko na Ryc. 3).
6. Natychmiast załadować przygotowane płytki do stacji roboczej IndiMag 48 lub IndiMag 48s, załadować paski z osłonami prętów magnetycznych na odpowiednie pozycje i uruchomić odpowiedni protokół.

Uwaga: W stacjach roboczych IndiMag 48 i IndiMag 48s protokół „Pathogen” jest zainstalowany fabrycznie.

Procedura dla stacji roboczej KingFisher Flex (lub podobnej)

1. Przed użyciem kilkakrotnie odwrócić płytkę „Wash 1” kasety IndiMag Pathogen KF96 Cartridge (②), tak aby kulki swobodnie unosiły się w roztworze.
2. Kasety IndiMag Pathogen KF96 (①–⑤) w adapterze do odwirowywania płytek 96-dołkowych z głębokimi dołkami odwirować w temperaturze pokojowej (15–25°C) przez 1 minutę przy 500 x g.
3. Ostrożnie zdjąć folię pokrywającą płytkę „Lysate” kasety IndiMag Pathogen KF96 (①).
4. Za pomocą pipety przenieść 200 µl próbki na dno dołka płytki „Lysate” kasety IndiMag Pathogen KF96 (①).

Uwaga: Jeśli objętość próbki jest mniejsza niż 200 µl, należy ją zwiększyć do 200 µl, dodając buforu PBS.

Tabela 3: Konfiguracja aparatu KingFisher Flex lub aparatu alternatywnego

Gniazdo	Komunikat ładowania	Format	Element, który należy dodać
6	Load Rod Cover (Załaduj osłonę pręta)	płytką 96-dołkową z głębokimi dołkami	Rod Cover
5	Load Elution (Załaduj płytkę „Elution”)	mikropłytką 96-dołkową	Elution
4	Load Wash 3 (Załaduj płytkę „Wash 3”)	płytką 96-dołkową z głębokimi dołkami	Wash 3
3	Load Wash 2 (Załaduj płytkę „Wash 2”)	płytką 96-dołkową z głębokimi dołkami	Wash 2
2	Load Wash 1 (Załaduj płytkę „Wash 1”)	płytką 96-dołkową z głębokimi dołkami	Wash 1
1	Load Lysate (Załaduj płytkę „Lysate”)	płytką 96-dołkową z głębokimi dołkami	Lysate*

* Zawiera 200 µl próbki i 500 µl buforu Lysis Buffer

5. Dodać po 500 µl buforu Lysis Buffer do każdej próbki na płytce „Lysate” kasety IndiMag Pathogen KF96 (①).
6. Ostrożnie zdjąć folię pokrywającą pozostałe płytki kasety IndiMag Pathogen KF96 (②–⑤).
7. Natychmiast załadować przygotowane płytki do systemu do oczyszczania, załadować płytkę z osłonami prętów magnetycznych i uruchomić odpowiedni protokół.

Rozwiązywanie problemów

Ta część instrukcji może okazać się pomocna podczas rozwiązywania jakichkolwiek zaistniałych problemów.

W celu uzyskania dodatkowych informacji lub pomocy należy skontaktować się z działem pomocy firmy INDICAL za pośrednictwem adresu e-mail **support@indical.com**.

Komentarze i wskazówki	
Niski uzysk DNA i RNA	
1 Niepełna liza próbki	W przypadku DNA niektórych wirusów i bakterii zastosowanie wyższej temperatury może poprawić wydajność lizy. W tym celu dostępny jest protokół lizy wykonywanej poza aparatem. Aby uzyskać więcej informacji, należy skontaktować się z działem pomocy firmy INDICAL za pośrednictwem adresu e-mail support@indical.com .
2 Bufor do elucji jest zanieczyszczony RNazą	Należy uważać, aby nie zanieczyścić materiału RNazami, które mogą doprowadzić do degradacji wirusowego RNA. W przypadku zanieczyszczenia RNazą należy powtórzyć procedurę oczyszczania, używając nowych próbek.
3 Kwasy nukleinowe w próbkach uległy degradacji przed przeprowadzeniem oczyszczania	Próbki zostały poddane więcej niż jednemu cyklowi zamrażania-rozmrażania lub były przechowywane w temperaturze pokojowej (15–25°C) przez zbyt długi czas. Należy zawsze używać świeżych próbek lub próbek, które były rozmrażane tylko jeden raz. Powtórzyć protokół oczyszczania, używając nowych próbek.
Niska wydajność DNA lub RNA w dalszych procedurach analitycznych	
1 Niewielka ilość/brak DNA lub RNA w eluacie	Możliwe przyczyny opisano w powyższej części „Niski uzysk wirusowego DNA i RNA”. Jeśli jest to możliwe, zwiększyć ilość eluatu dodawanego do reakcji.

2	Przeniesienie cząstek magnetycznych	Ewentualne przeniesienie cząstek magnetycznych do eluatów nie wpływa na większość dalszych procedur analitycznych. Stopień przenoszenia cząstek magnetycznych można zminimalizować poprzez umieszczenie mikro płytki zawierającej eluaty na odpowiednim magnesie (np. 96-Well Magnet Type A lub 12-Tube Magnet) na 1 minutę, a następnie przeniesienie eluatów do czystej mikro płytki. Jeśli odpowiedni magnes nie jest dostępny, należy odwirować mikro płytkę zawierającą eluaty przez 1 minutę przy maksymalnej prędkości, aby osadzić wszelkie pozostałe cząstki magnetyczne, a następnie przenieść supernatant do czystej mikro płytki.
3	Nadmiar eluatu w reakcji amplifikacji	Określić maksymalną objętość eluatu odpowiednią dla danej reakcji amplifikacji. Odpowiednio zwiększyć lub zmniejszyć objętość eluatu dodawaną w reakcji amplifikacji.
4	Degradacja RNA	Do degradacji RNA w oryginalnej próbce mogło dojść z powodu obecności RNaz. Upewnić się, że próbki są przetwarzane natychmiast po pobraniu lub wyjęciu z miejsca przechowywania. Powtórzyć protokół oczyszczania, używając nowych próbek.
5	Kwasy nukleinowe w próbkach uległy degradacji przed przeprowadzeniem oczyszczania	Próbki zostały poddane więcej niż jednemu cyklowi zamrażania-rozmrażania lub były przechowywane w temperaturze pokojowej (15–25°C) przez zbyt długi czas. Należy zawsze używać świeżych próbek lub próbek, które były rozmrażane tylko jeden raz. Powtórzyć protokół oczyszczania, używając nowych próbek.
6	Inhibicja reakcji PCR	Niektóre typy próbek (np. zwierzęce próbki krwi pełnej lub kału) mogą zawierać duże ilości inhibitorów reakcji PCR. Bez zastosowania odpowiednich metod obróbki całkowite usunięcie inhibitorów może nie być możliwe. Zmniejszyć wejściową ilość próbki i/lub ilość eluatu dodawanego w reakcji amplifikacji.

Informacje dotyczące zamawiania

Nazwa produktu	Nr kat.
IndiMag Pathogen IM48 Cartridge (2 x 24)	SP947654P224
IndiMag Pathogen IM48 Cartridge (6 x 8)	SP947654P608
IndiMag Pathogen KF96 Cartridge (1 x 96)	SP947855P196
IndiMag 48s	IN943048
IndiMag 48 PW Rod cover (672)	PW940237
intype IC-DNA	IC289980
intype IC-RNA	IC289970

Firma INDICAL oferuje szeroką gamę gotowych do użycia zestawów ELISA, oznaczeń qPCR/ RT-qPCR oraz odczynników przeznaczonych do oznaczania konkretnych patogenów.

Aby zoptymalizować przebieg pracy oraz sprostać wymaganiom związanym z przetwarzaniem próbek i przepustowością, firma INDICAL oferuje również aparaty i zestawy do wydajnej izolacji kwasów nukleinowych z różnych typów próbek.

Aby uzyskać więcej informacji na temat produktów bactotype, cador, cattletype, flocktype, IndiMag, IndiSpin, intype, pigtype i virotype należy odwiedzić stronę www.indical.com.

Aktualne informacje licencyjne oraz dotyczące wyłączenia odpowiedzialności dla poszczególnych produktów znajdują się w instrukcji obsługi lub podręczniku użytkownika odpowiedniego produktu firmy INDICAL.

Umowa ograniczonej licencji dla kasety IndiMag Pathogen Cartridge

Korzystanie z tego produktu oznacza zgodę nabywcy lub użytkownika produktu na następujące warunki:

1. Niniejszy produkt może być użytkowany wyłącznie zgodnie z protokołami dołączonymi do produktu oraz niniejszą instrukcją i wyłącznie ze składnikami znajdującymi się w tym zestawie. Firma INDICAL nie udziela żadnej licencji w zakresie praw własności intelektualnej do użytkowania niniejszego zestawu ze składnikami nienależącymi do zestawu z wyjątkiem przypadków opisanych w protokołach dołączonych do produktu, niniejszej instrukcji oraz dodatkowych protokołach dostępnych na stronie www.indical.com. Niektóre dodatkowe protokoły zostały sformułowane przez użytkowników rozwiązań INDICAL z myślą o innych użytkownikach rozwiązań INDICAL. Takie protokoły nie zostały dokładnie przetestowane ani poddane procesowi optymalizacji przez firmę INDICAL. Firma INDICAL nie gwarantuje, że nie naruszają one praw osób trzecich.
2. Z wyjątkiem wyraźnie określonych licencji, firma INDICAL nie udziela gwarancji, że niniejszy zestaw i/lub jego użytkowanie nie narusza praw osób trzecich.
3. Zestaw oraz jego składniki są przeznaczone do jednorazowego użytku, nie można ich ponownie używać, regenerować ani odsprzedawać.
4. Firma INDICAL nie udziela innych licencji wyrażonych lub dorozumianych poza tymi, które są wyraźnie określone.
5. Nabywca i użytkownik zestawu zobowiązuje się nie podejmować działań ani nie zezwalać innym osobom na podejmowanie działań, które mogą doprowadzić do wykonania lub umożliwić wykonanie zabronionych czynności wymienionych powyżej. Firma INDICAL może egzekwować przestrzeganie zakazów niniejszej Umowy ograniczonej licencji i wnieść sprawę do dowolnego sądu. Ma także prawo zażądać zwrotu kosztów wszelkich postępowań i kosztów sądowych, w tym wynagrodzeń prawników, związanych z egzekwowaniem postanowień Umowy ograniczonej licencji lub wszelkich praw własności intelektualnej w odniesieniu do zestawu i/lub jego składników.

Aktualne warunki licencji są dostępne na stronie www.indical.com.

Znaki towarowe: bactotype®, cadof®, cattletype®, flocktype®, IndiMag®, IndiSpin®, intype®, pigtype®, virotype® (INDICAL BIOSCIENCE GmbH); MagAttract®, QIAGEN® (QIAGEN Group, Hilden, Niemcy). Zarejestrowane nazwy, znaki towarowe itp. wykorzystane w niniejszym dokumencie, nawet jeśli nie są specjalnie oznakowane, nie mogą być uznawane jako prawnie niechronione.

HB-2552-EN-002 © 2020-2021 INDICAL BIOSCIENCE GmbH, wszelkie prawa zastrzeżone.

Indeks zmian

Instrukcja obsługi	Wersja	Zmiana
HB-2552-EN-002	Wrzesień 2021 r.	Ponowne wprowadzenie produktu na rynek
HB-2552-EN-001	Sierpień 2020 r.	Wprowadzenie produktu na rynek