

ePure FFPE DNA Extraction Kit (E2009)

Návod k použití (Příručka)



Verze: 1.1



48



Ecoli Dx, s.r.o.

IČO: 10707409

Purkyňova 74/2

110 00 Praha 1

Česká republika



Před použitím tohoto produktu si přečtěte a dodržujte tento návod k použití.

Obsah

Použití.....	3
Úvod	3
Obsah soupravy a skladování	4
Požadovaný materiál, který není součástí soupravy.....	5
Varování a bezpečnostní opatření	5
Princip izolace	7
Před zahájením.....	8
Příprava vzorku	8
Postup izolace virových nukleových kyselin.....	9
Izolační protokol – řada MagPurix®	9
Purification Protocol - řada ePure a MagPurix® EVO	10
Skladování, kvantifikace a stanovení kvality DNA.....	12
Skladování vyizolované DNA	12
Řešení problémů.....	13
Související produkty	14
Omezená záruka na produkt	15
Historie revizí	15

Použití

Souprava ePure FFPE DNA Extraction Kit obsahuje všechny potřebné reagensie a spotřební materiál pro automatickou purifikaci celkových nukleových kyselin ze vzorků tkáně fixovaných ve formalínu, zalitých v parafínu (FFPE) a biopsii jehlou.

Produkt je určen k použití profesionálními uživateli, jako jsou technici a lékaři vyškolení v technikách molekulární biologie.

Úvod

Název produktu	ePure FFPE DNA Extraction Kit
Katalogové číslo	E2009
Přehled produktu	Souprava ePure FFPE DNA Extraction Kit je navržena tak, aby extrahovala veškeré nukleové kyseliny z pevné zvířecí tkáně (tkáň), vysušené stěry a vysušené krve. Magnetická technologie ZiBeads® umožňuje izolaci vysoce kvalitních nukleových kyselin. Vyizolované nukleové kyseliny jsou připraveny k přímému použití v následných aplikacích. Konečný produkt je vhodný pro širokou škálu diagnostických a výzkumných aplikací, jako je sekvenování, genotypizace, qPCR, ddPCR a NGS.
Použitelný model přístroje	Všechny přístroje ePure a MagPurix®
Název protokolu na displeji přístroje	2009 FFPE DNA
Čas zpracování	ePure: 40-45 minut MagPurix® 12: 45-60 minut MagPurix® 24: 45-60 minut MagPurix® EVO:40-45minut

Obsah soupravy a skladování

Doprava a skladování	Souprava je zasílána při pokojové teplotě. Po dodání skladujte soupravu při pokojové teplotě. Při správném skladování jsou všechny součásti soupravy stabilní až do data expirace uvedeného na krabičce soupravy.	
Obsah soupravy	Níže jsou uvedeny komponenty dodávané v soupravě. Dostatečné množství reagensů pro provedení 48 izolací.	
	Obsah	Množství
	1 Reagenční kazeta	48 ks (6x8)
	2 Reakční komůrku	48 ks (6x8)
	3 Držák špiček	48 ks (6x8)
	4 Propichovací kolík	50 ks
	5 Špičky s filtrem	50 ks
	6 Zkumavka na vzorek (2 mL)	50 ks
	7 Eluční zkumavka (1,5 ml)	50 ks
	Proteináza K, 10 mg / ml (1 ml)	1 ks
	BL4 pufr (25 ml)	1 ks
	DP pufr (15 ml)	1 ks
	Kolonka s filtrem	50 ks
	Sběrná zkumavka	50 ks
	Nálepka s čárovým kódem (pouze ePure, EVO)	50 ks

Obsah reagenčních kazet

Každá reagenční kazeta má 10 pozic a 10 uzavřených jamek.
Pozice 1-10 obsahují reagensie pro tento protokol.

Činidlo	Množství
Prázdny	1
Prázdny	2
Vazebny pufr 1	3
Roztok s magnetickými kuličkami	4
Promývací pufr 6	5
Promývací pufr 2A	6
Promývací pufr 2B	7
Eluční pufr 1	8
Eluční pufr 2	9
Prázdny	10



Požadovaný materiál, který není součástí soupravy

K provedení soupravy je zapotřebí následující obecné laboratorní vybavení a spotřební materiál. Veškeré laboratorní vybavení by mělo být instalováno, kalibrováno, provozováno a udržováno dle doporučení výrobce. Následující tabulka zobrazuje požadované a speciální vybavení spolu se seznamem spotřebního materiálu.

Položka
Přístroj ePure nebo MagPurix®
1,5 nebo 2,0 ml mikrocentrifugační zkumavky
Pipety a špičky s filtrem
Fosfátový pufr (PBS, může být vyžadován pro ředění vzorků)
Volitelné: Spotřební plast, DNase-free RNáza A (pro minimalizování obsahu RNA)

Varování a bezpečnostní opatření

Pouze pro *in vitro* diagnostické použití. Před použitím soupravy si pozorně přečtěte všechny pokyny. Použití tohoto produktu by mělo být omezeno na vyškolený personál v technikách izolace DNA. Pro dosažení optimálních výsledků je nutné přísné dodržování uživatelské příručky. Je třeba věnovat pozornost datům expirace vytištěným na krabičce a štítcích všech komponent. Nepoužívejte soupravu po uplynutí doby použitelnosti.

Při práci s chemikáliemi vždy noste vhodný laboratorní plášť, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Další informace naleznete v příslušných bezpečnostních listech. Ty jsou k dispozici online v pohodlném a kompaktním formátu PDF na adrese <https://www.biolife-sro.cz>.

- Nepoužívejte soupravu, pokud je některý spotřební materiál deformovaný nebo je poškozena kartridž, nebo pokud nebyly dodrženy podmínky přepravy a skladování dle návodu k použití.
- Při nedodržení pracovních podmínek může dojít k ovlivnění funkcí soupravy a získané výsledky nemusí být validní.
- V laboratorních pracovištích nejezte, nepijte, nekuřte, nepoužívejte kosmetiku a nemanipulujte s kontaktními čočkami.

- Všechny vzorky a nepoužitá činidla zlikvidujte v souladu s místními předpisy.
- Vzorky by měly být považovány za potenciálně infekční a mělo by se s nimi manipulovat v biologickém boxu v souladu s příslušnými postupy biologické bezpečnosti.
- Vyčistěte a dezinfikujte všechny rozlité vzorky nebo činidla pomocí dezinfekčního prostředku, například 0,5 % chlornanu sodného nebo jiného vhodného dezinfekčního prostředku.
- Zamezte kontaktu vzorků a činidel s kůží, očima a sliznicemi. Při kontaktu s těmito roztoky okamžitě opláchněte zasažené místo vodou a v případě potřeby desinfikujte, či vyhledejte lékařskou pomoc.
- Při dodržení podmínek přepravy, provozu a skladování nehrozí nebezpečí výbuchu a vznícení.
- Izolační souprava je určena k jednorázovému použití pro izolaci na automatickém izolátoru ePure na počet vzorků 48. Soupravu používejte výhradně k určenému účelu.
- Jakákoliv závažná nežádoucí příhoda, ke které došlo v souvislosti s používáním kitu, musí být hlášena výrobci EcoliDx a písemně oznámena Státnímu ústavu pro kontrolu léčiv.
- V případě poruchy soupravy nebo zhoršení její funkce, které mohou ohrozit jeho funkční způsobilost, se musí souprava přestat používat a neprodleně kontaktovat výrobce.



UPOZORNĚNÍ: NEPOUŽÍVEJTE bělidla nebo kyselé roztoky přímo do odpadu z přípravy vzorku.

Kontrola kvality

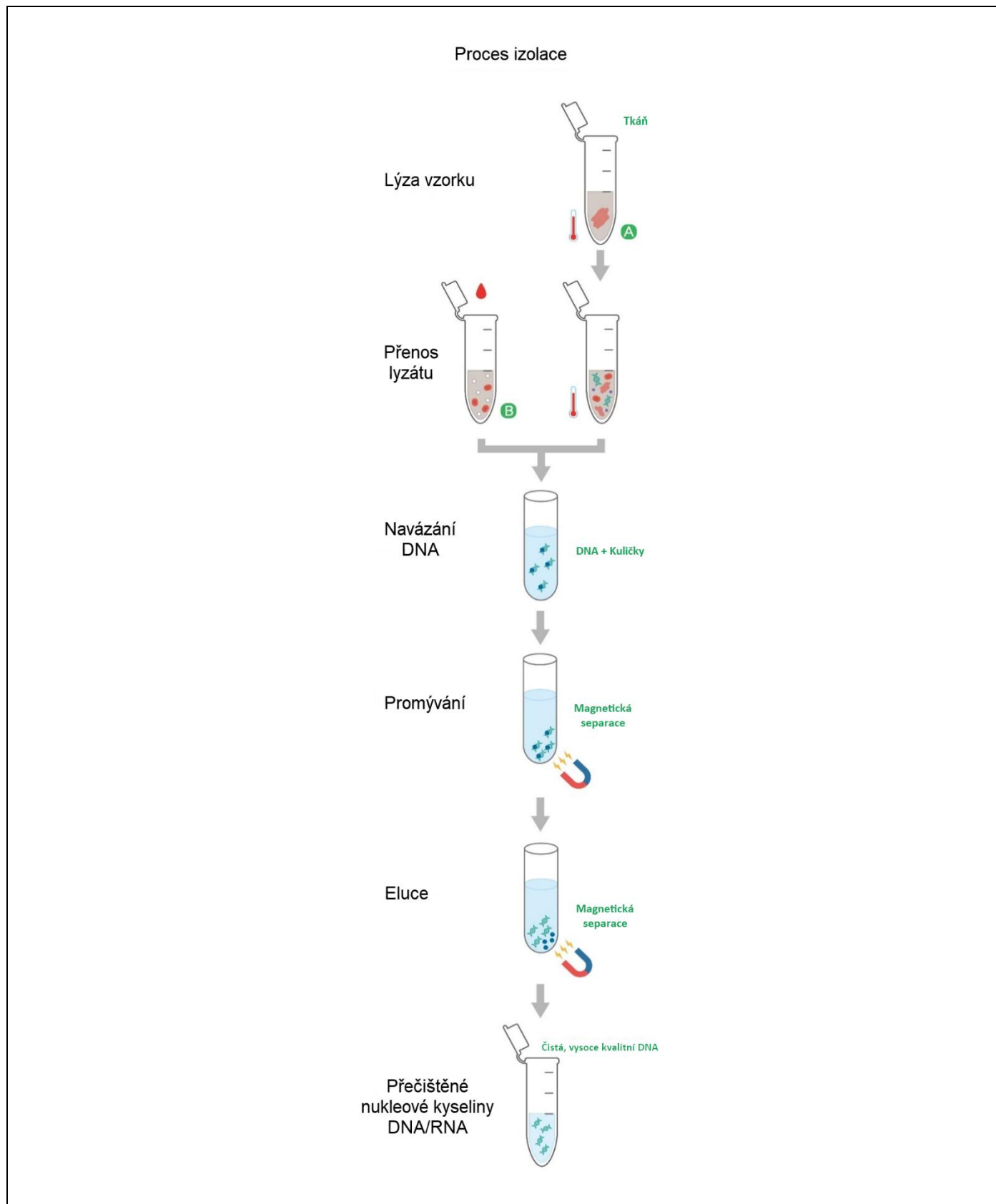
V souladu s ISO certifikovaným systémem managementu kvality EcoliDx je každá souprava testována podle předem stanovených specifikací, aby byla zajištěna stálá kvalita produktu.

Pro posouzení shody byly dále použity a dodrženy následující technické normy:

ČSN EN ISO 13485 Zdravotnické prostředky – Systém managementu kvality – Požadavky pro účely předpisů

ČSN EN ISO 14971 Zdravotnické prostředky – Aplikace řízení rizika na zdravotnické prostředky

Princip izolace



A Přeneste vzorek přímo do extrakce.

B Před izolací je prováděna určitá předúprava vzorku.

Před zahájením

Příprava vzorku

Purifikační postup je optimalizován pro použití vhodné hodnoty, jak je uvedeno v níže uvedené tabulce, pevné zvířecí tkáň(e), vysušené stěry a vysušené vzorky krve.

Vzorky tkáně fixované ve formalínu, zalité v parafínu (FFPE)	<ol style="list-style-type: none">Přeneste jeden až pět kusů vzorků zalitých v parafínu o tloušťce přibližně 5 až 10 μm do zkumavky pro mikrocentrifugu o objemu 1,5 ml.Přidejte 200 μl DP pufru do zkumavky pro mikrocentrifugu a intenzivně vortexujte po dobu 10 sekund.Inkubujte při 56 °C po dobu 3 minut a poté ochlaďte na pokojovou teplotu.Přidejte 220 μl pufru BL4 a vortexujte.Centrifugujte při 11 000 xg po dobu 1 minuty.Přidejte 20 μl proteinázy K přímo do spodní modré fáze a jemně promíchejte.Inkubujte při 56 °C po dobu 2 hodin (nebo dokud se vzorek úplně nerozpustí).Inkubujte při 90 °C po dobu 1 hodiny.Přeneste 200 μl spodní modré fáze do filtrační kolony se sběrnou zkumavkou. Centrifugujte při 6000 xg po dobu 1 minuty.
Biopsie jehlou	<ol style="list-style-type: none">Přeneste tři až deset biopsií do 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky.Přidejte 200 μl DP pufru do zkumavky pro mikrocentrifugu a intenzivně vortexujte po dobu 10 sekund.Inkubujte při 56 °C po dobu 3 minut a poté ochlaďte na pokojovou teplotu.Přidejte 220 μl pufru BL4 a vortexujte.Centrifugujte při 11 000 xg po dobu 1 minuty.Přidejte 20 μl proteinázy K přímo do spodní modré fáze a jemně promíchejte.Inkubujte při 56 °C po dobu 2 hodin (nebo dokud se vzorek úplně nerozpustí).Inkubujte při 90 °C po dobu 1 hodiny. Přeneste 200 μl spodní modré fáze do filtrační kolony se sběrnou zkumavkou. Centrifugujte při 6000 xg po dobu 1 minuty.

Poznámka:

Pro účinnou izolaci genomové DNA z tkání je nezbytná destrukce a homogenizace materiálu vzorku. Nadměrné narušení a homogenizace však povede k naštěpení vysokomolekulární genomové DNA.

Navrhovaný výchozí materiál a eluční objem se může měnit v závislosti na typu vzorku použitého pro izolaci nukleových kyselin.

Typ vzorku	Počáteční materiál vzorku	Eluční objem
Vzorky tkáně fixované ve formalínu, zalité v parafínu (FFPE)	1-5 sekcí (5-10 µm)	50-200 µl
Biopsie jehlou	3-10 biopsí	

Postup izolace virových nukleových kyselin

Postup práce pro ePure a Magpurix



* Výstup záznamu (volitelně)

Poznámka: Všechny kroky provádějte při pokojové teplotě (20-25°C), pokud není uvedeno jinak.

Izolační protokol – řada MagPurix®


1	Zapněte přístroj	a. Zapněte přístroj přepínačem na ON – a vyčkejte na spuštění obrazovky.
2	Vložte nový jednorázový plast a reagenční kazety	a. Otevřete dveře a vyjměte stojánek na vzorky z přístroje. b. Vložte 1 Reagenční kazetu a potřebný jednorázový plast 2 Reakční komůrku, 3 Držák špiček, 4 Propichovací kolíky, 5 Špičky s filtrem a další součásti, pokud jsou přítomny v soupravě, která má být použita). c. Umístěte 6 Zkumavky pro vzorek a 7 Eluční zkumavky do stojánku.
3	Přeneste vzorky do přístroje	a. Přeneste příslušné množství vzorku do zkumavek se vzorky na stojánek na vzorky. b. Vložte stojánek zpět do přístroje a zavřete dvířka.


4	Nastavení programu	a. Naskenujte čárové kódy protokolu a vyberte protokol izolace, množství vzorku a eluční objem.
5	Start izolace	<p>a. Před spuštěním programu se řiďte pokyny zobrazenými na obrazovce a znovu zkontrolujte, zda byly dokončeny provozní kroky.</p> <p>b. Stisknutím „ENTER“ zahájíte experiment. Přístroj provede automaticky program protokolu až do dokončení celého procesu.</p> <p>c. Na konci běhu (přibližně MagPurix® 12:45-60 minut, MagPurix® 24:45-60 minut), přístroj krátce zapípá.</p>
6	Odeberte eluční zkumavky	<p>a. Otevřete dvířka přístroje.</p> <p>b. Odeberte eluční zkumavky obsahující izolované nukleové kyseliny.</p> <p>c. Izolované nukleové kyseliny jsou připraveny k okamžitému použití. Před provedením následné analýzy skladujte izolované nukleové kyseliny při teplotě 4 °C (krátkodobě, méně než 10 dní) nebo v alikvotách při -70 °C (dlouhodobě).</p> <p>d. Zlikvidujte použité reagenční kazety, veškerý jednorázový plast do biohazardního odpadu. *Reagenční kazety nepoužívejte opakovaně.</p> <p>e. Pokud přístroj nepoužíváte, umístěte stojánek na vzorky zpět na pracoviště, zavřete dvířka přístroje a stiskněte tlačítko „Start“ na 2 sekundy, abyste se dostali do „režimu spánku“. Pokud přístroj delší dobu nepoužíváte, vypněte jej.</p>

Purification Protocol - řada ePure a MagPurix® EVO

1	Zapněte přístroj	<p>a. Zapněte přístroj přepínačem na ON – a vyčkejte na spuštění obrazovky.</p> <p>b. Přihlaste se a zobrazte domovskou stránku.</p>
2	Vložte nový jednorázový plast a reagenční kazety	<p>a. Otevřete dveře a vyjměte stojánek na vzorky z přístroje.</p> <p>b. Otevřete víko držáku špiček.</p> <p>c. Vložte 1 Reagenční kazetu a potřebný jednorázový plast 2 Reakční komůrku, 3 Držák špiček, 4 Propichovací kolíky, 5 Špičky s filtrem a další součásti, pokud jsou přítomny v soupravě, která má být použita).</p> <p>d. Zavřete víko držáku špiček.</p> <p>e. Nalepte nálepku s čárovým kódem na Elution Tubes.</p> <p>f. Umístěte 6 Zkumavky pro vzorek a 7 Eluční zkumavky do stojánku.</p>
3	Přeneste vzorky do přístroje	<p>a. Přeneste příslušné množství vzorku do zkumavek se vzorky na stojánek na vzorky.</p> <p>b. Vložte stojánek zpět do přístroje a zavřete dvířka.</p>
4	Nastavení programu	<p>a. Vyberte příslušný protokolový program na přístroji. Stiskněte NEXT.</p> <p>b. Vyberte příslušný objem vzorku/eluční objem a stiskněte NEXT.</p>

- c. Stisknutím číselného tlačítka vyberte správný počet vzorků.
- d. Skenujte / upravte přímo každé primární ID vzorku. Po dokončení stiskněte NEXT.
- e. Přímou oskenujte / upravte každé ID eluční zkumavky. Po dokončení stiskněte NEXT.
- f. Naskenujte čárový kód kazety s reagenciemi. Stiskněte NEXT.
***Pokud uplynula doba použitelnosti kazety, nelze provést další krok.**
- g. Postupujte dle pokynů na obrazovce a před spuštěním programu znovu zkontrolujte kroky nastavení před spuštěním programu. Stiskněte NEXT.

-
- 5** Start izolace
- a. Zkontrolujte na obrazovce "PROGRAM CONFIRMATION".
 - b. Stisknutím tlačítka „START“ zahájíte experiment. Přístroj provede automaticky program protokolu až do dokončení celého procesu.
 - c. Na konci běhu (přibližně 40-45 minut), přístroj krátce zapípá a na obrazovce se zobrazí „PROGRAM FINISH“.
 - d. Pokud experiment nespustíte znovu, stiskněte funkční tlačítko „ HOME“, aby existoval experimentální režim.

-
- 6** Odeberte eluční zkumavky
- a. Otevřete dvířka přístroje.
 - b. Odeberte eluční zkumavky obsahující izolované nukleové kyseliny.
 - c. Izolované nukleové kyseliny jsou připraveny k okamžitému použití. Před provedením následné analýzy skladujte izolované nukleové kyseliny při teplotě 4 °C (krátkodobě, méně než 10 dní) nebo v alikvotách při -70 °C (dlouhodobě).
 - d. Zlikvidujte použité reagenční kazety, veškerý jednorázový plast do biohazardního odpadu. *Reagenční kazety nepoužívejte opakovaně.
 - e. Pokud nebudete přístroj dále používat, vraťte stojánek na vzorky zpět do přístroje, zavřete dvířka přístroje a stiskněte tlačítko „ POWER“ funkční tlačítko pro přechod do režimu spánku. Nebudete-li přístroj delší dobu používat, vypněte jej hlavním vypínačem.
-

Skladování, kvantifikace a stanovení kvality DNA

Typickým následným využitím izolované DNA je kvalitativní nebo kvantitativní Real-Time PCR při detekci určitého patogenu nebo skupiny patogenů. Pro kontrolu izolačního procesu a dostatečné kvality vyizolované DNA se v kombinaci s komerčně dostupnými amplifikačními systémy do vzorku před izolací standardně přidává exogenní nukleová kyselina, tzv. interní kontrola. RNA nebo DNA interní kontroly by měly být přidány do lyzačního pufru, vždy dle pokynů výrobce soupravy. Interní kontrola je vhodná a rutinně používaná kontrola v testech pro detekci patogenů a kontroluje i kvalitu a celkovou přítomnost DNA v následné qPCR aplikaci.

Kvantifikace DNA

Koncentrace a čistota DNA by měla být stanovena měřením absorbance při 260 nm (A₂₆₀) respektive poměrem absorbancí A₂₆₀/A₂₈₀ ve spektrofotometru. Běžně používaný je např. NanoDrop (Thermo Scientific).

Skladování vyizolované DNA

Purifikovaná genomická DNA může být skladována při 2–8 °C, při –15 °C až –30 °C nebo –65 °C až –90 °C.

Řešení problémů

* Tato tabulka je užitečná při řešení běžných problémů. Pokud potřebujete další technickou podporu, kontaktujte distributora Biolife anebo výrobce Ecoli Dx (<https://ecolidx.com>).

Problém	Možná příčina	Komentáře a návrhy
Špatná kvalita nebo výtěžnost DNA	Degradace nebo kontaminace reagensů	Před použitím se prosím ujistěte, že reagensie soupravy jsou stále v efektivní době používání. Zlikvidujte jakékoli činidlo soupravy, které vykazuje změnu barvy nebo známky mikrobiální kontaminace.
	Souprava byla skladována v nevhodných podmínkách	Sadu skladujte při teplotě 15-25°C po celou dobu po dodání. Pokud se při přepravě v chladném počasí nebo při dlouhodobém skladování vysráží činidlo nebo pufr, rozpustěte sraženiny jemným zahřátím a promícháním roztoku. Prosím, nezmrazujte kazety s činidly.
	Nedostatečné množství vzorku	Výtěžek DNA závisí na typu vzorku a počtu jaderných buněk ve vzorku. Proporcionálně upravte celkové vstupní množství vzorku, abyste zvýšili výtěžek DNA.
	Bylo použito příliš mnoho elučního pufru	Eluční objem lze úměrně snížit.
	Eluát konečného produktu (produktů) nestačí.	Shromážděte prosím informace o problému a poskytněte je co nejdříve svému zástupci podpory / technické podpoře.
Problém s ucpáním	Bylo použito příliš mnoho vstupního materiálu vzorku.	Snižte vstupní množství materiálu vzorku nebo vzorek naředte.
Žádné výsledky v následné analýze	Žádný signál / PCR byla inhibována.	Použití vhodných kontrol pro analýzu. Zkontrolujte pozitivní kontrolu, negativní kontrolu, vodu (NTC) a interní kontrolu, abyste objasnili možné příčiny problému.
Porucha přístroje / abnormální zvuk	Abnormální spotřební materiál: 1. Deformita Špičky s filtrem 2. Deformita Reakční komůrky	Vyměňte prosím abnormální spotřební plast za normální.

	3. Deformita Držáku špičky	
	<p>Abnormální činnost nástroje:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Nepřesná hodnota korekce 2. Poškozený náhradní díl nebo součástka 	Shromážděte prosím informace o problému (videa a obrázky) a poskytněte je co nejdříve svému zástupci podpory / technické podpoře za účelem kalibrace nebo výměny jakýchkoli jiných poškozených nebo opotřebovaných dílů.

Související produkty

Jméno produktu	Katalogové číslo
ePure Blood DNA Extraction kit	E2001
ePure Blood DNA Extraction kit 1200	E2002
ePure Viral Nucleic Acid Extraction Kit	E2003
ePure Tissue DNA Extraction Kit	E2004
ePure Bacterial DNA Extraction Kit	E2006
ePure STD DNA Extraction Kit	E2007
ePure TB DNA Extraction Kit	E2008
ePure FFPE DNA Extraction Kit	E2009
ePure Forensic DNA Extraction Kit	E2010
ePure Pathogen NA Extraction Kit B	E2012
ePure Plant DNA Extraction Kit	E2014
ePure Total RNA Extraction Kit	E2015
ePure CFC DNA Extraction Kit	E2017
ePure cfDNA Extraction Kit Plus	E2024
ePure cfDNA Extraction Kit LV	E2025

Omezená záruka na produkt

Společnost Ecoli Dx se zavázala poskytovat zákazníkům vysoce kvalitní produkty a služby. Naším cílem je zajistit, aby každý zákazník byl 100% spokojen s našimi produkty a službami. Máte-li jakékoli dotazy nebo obavy, obraťte se na naše zástupce technické podpory.

Ecoli Dx zaručuje funkci všech produktů podle specifikací uvedených v naší literatuře k produktu. Kupující / uživatel musí určit vhodnost produktu pro jeho konkrétní použití.

Na produkty po vypršení doby expirace se neposkytuje žádná záruka. Záruka se nevztahuje na zboží, u kterého nejsou všechny komponenty skladovány a používány v souladu s pokyny.

Historie revizí

Verze	datum	Popis
1.0	18.3.2022	Uvolnění nového dokumentu
1.1	22.5.2022	Doplněny údaje dle IVDR legislativy (Varování a bezpečnostní opatření, kvantifikace a stanovení kvality DNA)