

ePure cfDNA Extraction Kit Plus (E2024)

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
Purification Protocol - řada ePure a MagPurix® EVO	9
Skladování, kvantifikace a stanovení kvality DNA.....	11
Skladování vyizolované DNA.....	11
Řešení problémů.....	12
Související produkty	13
Omezená záruka na produkt.....	14
Historie revizí	14

Použití

Souprava ePure cfDNA Extraction Kit Plus obsahuje všechny potřebné reagentie a spotřební materiál pro rychlou automatickou izolaci vysoce kvalitních cfDNA z bezbuněčných vzorků, jako je plazma nebo sérum, nebo ze směsi takových bezbuněčných tělních tekutin.

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

Úvod

Název produktu	ePure cfDNA Extraction Kit Plus
Katalogové číslo	E2024
Přehled produktu	Souprava ePure cfDNA Extraction Kit Plus je navržena k extrakci cfDNA z bezbuněčných vzorků, jako je plazma nebo sérum, nebo ze směsi takových bezbuněčných tělních tekutin. Magnetická technologie ZiBeads® umožňuje izolaci vysoce kvalitních nukleových kyselin. Výsledný produkt je vhodný pro širokou škálu diagnostických a výzkumných aplikací, včetně sekvenování, genotypizace a detekce qPCR.
Použitelný model přístroje	Všechny přístroje ePure a MagPurix® EVO
Název protokolu na displeji přístroje	2024 CfDNA PLUS
Čas zpracování	ePure: 68-75 minut EVO řada 68-75 minut

Obsah soupravy a skladování

Doprava a skladování	<p>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.</p>	
Obsah soupravy	<p>Níže jsou uvedeny komponenty dodávané v soupravě. Dostatečné množství reagensů pro provedení 48 izolací.</p>	
	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 se vzorkem (7 ml)	50 ks (25x2)
	7 Eluční zkumavka (1,5 ml)	50 ks
	S Malá špička	50 ks
	Nálepka s čárovým kódem	50 ks

Obsah reagenčních kazet

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

Činidlo	Množství
Prázdný	1
Vyrovnávací paměť LB1	2
Vyrovnávací paměť LB1	3
Roztok magnetických kuliček C	4
Promývací pufr8	5
Promývací pufr8	6
Promývací pufr A	7
Promývací pufr B	8
Eluční pufr 3	9
Prázdný	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 a MagPurix® EVO
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), Proteináza K (20 mg / ml), roztok dodecylsulfátu sodného (SDS) (20 %, w/v)

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

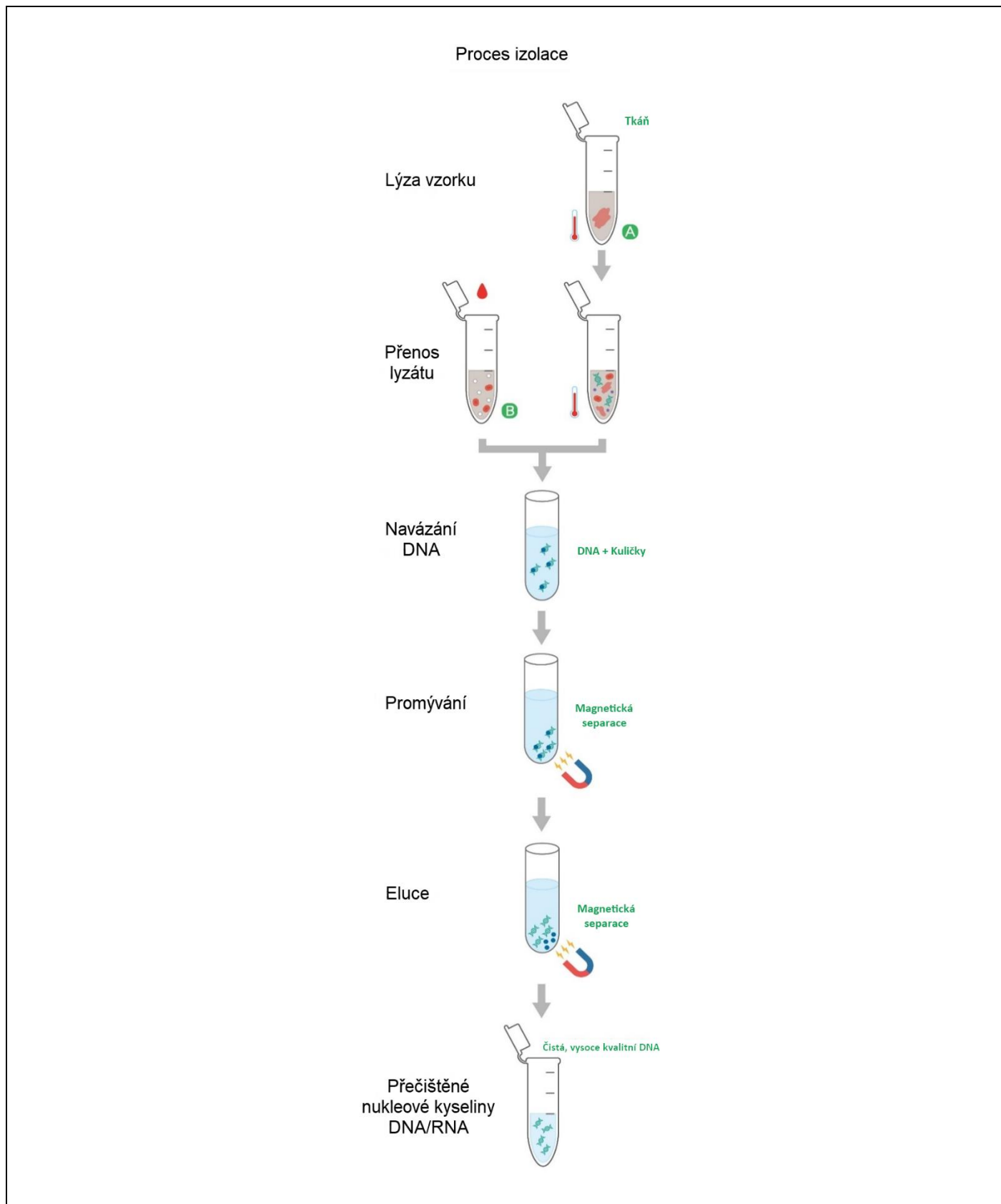
V souladu s ISO certifikovaným systémem managementu kvality EcoliDx je každá souprava testována podle předem stanovených specifikací, aby byla zajištěna stálá kvalita produktu.

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

Postup izolace je optimalizován pro použití 1000-2000 µl vzorků séra, plazmy*.

Sérum/plazma*

a. Dávkuje 1000-2000 µl vzorku do každé 7ml zkumavky

Ošetření proteinázou K** (Volitelné)

Pokud byly vzorky odebrány pomocí zkumavky Streck Cell

a. Přidejte příslušné množství plazmy do zkumavky vhodné

b. Přidejte 15 µl Proteinázy K (20 mg/ml) na každý 1 ml po

c. Přidejte 50 µl 20% roztoku SDS na každý 1 ml použité

d. Promíchejte jemným převrácením 5x.

e. Inkubujte při 60 °C po dobu 20 min.

f. Po inkubaci umístěte zkumavku na 5 minut na led, a
ochladila na pokojovou teplotu.

g. Dávkuje 1000-2000 µl vzorku do každé 7ml zkumavky

Poznámka:

*Plazma musí být připravena z čerstvých nebo zmrazených vzorků krve odebraných do zkumavek, které obsahují běžné antikoagulanty jako EDTA a citrát. (Heparin má inhibiční účinek na amplifikační reakci nukleové kyseliny)**Pokud byly vzorky odebrány pomocí zkumavky Streck Cell-Free DNA BCT, je k zajištění optimálních výtěžků nutné ošetření proteinázou K (není součástí sady). Pokud krev nebyla odebrána zkumavkou Streck Cell-Free DNA BCT, pokračujte podle protokolu čištění.

K extrakci se doporučuje použít čerstvý vzorek (skladovaný při 2-8°C po dobu až 6 hodin).

Celkový výtěžek a kvalita nukleové kyseliny se bude s časem nebo po vícenásobném zmrazování – rozmrazování snižovat. Pro delší dobu skladování je třeba vzorky zmrazit na -20 °C nebo nižší a vyvarovat se opakování zmrazování a rozmrazování. Vzorky rozmrazte při pokojové teplotě (15-25° C) a ihned po ekvilibraci na pokojovou teplotu zpracujte vzorek. Vzorek po rozmrazení znovu nezmrazujte. Pokud je ve vzorku viditelná precipitace, odstřeďte při 6800 x g po dobu 3 minut a přeneste supernatant do nové zkumavky, aniž byste narušili sraženinu, a okamžitě zahajte purifikační postup.

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
Sérum	1000-2000 µl	50-200 µl
Plazma		

Postup izolace virových nukleových kyselin

Postup práce pro ePure a Magpurix

Umístěte reagenční kazetu a spotřební plast do přístroje ePure a Magpurix

Vyberte protokol a nastavte podmínky

Nastavte pracovní stůl, postupujte dle informačních zpráv na obrazovce

Zahajte běh protokolu

Odeberte eluát *


UV dekontaminace


* Výstup záznamu (volitelně)

Purification Protocol - řada ePure a MagPurix® EVO

- | | | |
|----------|--|---|
| 1 | Zapněte přístroj | a. Zapněte přístroj přepínačem na ON – a vyčkejte na spuštění obrazovky.
b. Přihlaste se a zobrazte domovskou stránku. |
| 2 | Vložte nový jednorázový plast a reagenční kazety | a. Otevřete dveře a vyjměte stojánek na vzorky z přístroje.
b. Otevřete víko držáku špiček.
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).
d. Zavřete víko držáku špiček.
e. Nalepte nálepkou s čárovým kódem na Elution Tubes.
f. 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. Vyberte příslušný protokolový program na přístroji. Stiskněte NEXT.
b. Vyberte příslušný objem vzorku/eluční objem a stiskněte NEXT.
c. Stisknutím číselného tlačítka vyberte správný počet vzorků. |

- d. Skenujte / upravte přímo každé primární ID vzorku. Po dokončení stiskněte NEXT.
- e. Přímou skenujte / upravte každé ID eluční zkumavky. Po dokončení stiskněte NEXT.
- f. Naskenujte čárový kód kazety s reagensy. 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 **68-75 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 alikvotní podíly a skladujte 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

Výtěžek DNA je vysoce variabilní v závislosti na jednotlivém vzorku; zdraví jedinci 1-100 ng/ml plazmy nebo séra, vzorky pacientů mohou obsahovat podstatně více nukleových kyselin. Měření koncentrací ccfDNA na spektrofotometrech není účinné, protože ccfDNA je přítomna v nízkých koncentracích a standardní spektrofotometrií ji nelze snadno detekovat. PCR je zlatý standard pro kvantifikaci ccfDNA z plazmy.

Skladování vyizolované DNA

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

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 reagenty 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, rozpusťte 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)