



## EliGene<sup>®</sup> Urine Isolation Kit



**REF** 90051-50 (pro 50 vzorků)

### Složení soupravy:

|                     |        |
|---------------------|--------|
| Roztok Proteinázy K | 1 ml   |
| Roztok MI3          | 12 ml  |
| Roztok MI4          | 12 ml  |
| Roztok MI5          | 27 ml  |
| Roztok MI6          | 27 ml  |
| Roztok MI7          | 12 ml  |
| Kolonky             | 50 ks  |
| 2,0 ml zkumavky     | 100 ks |
| 1,5 ml zkumavky     | 50 ks  |
| Návod k použití     |        |

### Skladování a doba použitelnosti:

Všechny reagenty a komponenty kitu musejí být přepravovány při pokojové teplotě (15 - 30 °C).  
Proteináza K musí být po přepravě skladována při 2 - 8 °C.  
Při dodržení těchto skladovacích podmínek si kit plně udrží svou aktivitu, dokud neuběhne expirační doba uvedená na obalu.

### Účel použití

EliGene<sup>®</sup> Urine Isolation Kit je určen pro izolaci genomické a mitochondriální DNA z plné krve (čerstvé, zamražené nebo skladované při 4 °C), stěrů, spermatu, kultivovaných buněk a moče. Tento kit je optimalizován pro použití s EliGene<sup>®</sup> RealTime PCR kity.

### Obecný úvod

Při izolaci DNA z klinických vzorků se můžeme setkat s celou řadou problémů zahrnující například inhibice nebo nízkou citlivost. EliGene<sup>®</sup> Urine Isolation Kit je navržen tak, aby předešel problémům spojených s inhibicí a nízkým výtěžkem izolace DNA. Celkový čas izolace zahrnující inkubace je přibližně 1–2 hodiny. Kit obsahuje všechny komponenty nezbytné pro izolaci DNA včetně mikrozkuvek. Není třeba přidávat etanol ani jiné chemikálie.

### Vzorek

Klinický materiál: Plná krev (čerstvá, zamražená nebo skladovaná při 4 °C), stěry, sperma, kultivované buňky a moč.

### Nezbytné vybavení pro laboratoř

- Automatické pipety a sterilní špičky s filtrem bez DNA, RNA a bez DNáz a RNáz (doporučujeme použít plast s CE certifikací pro diagnostické účely), vortex.
- Sterilní stojánek bez DNA, RNA a bez DNáz a RNáz.
- Vodní lázeň nebo suchý blok na 65 °C.
- Mikrocentrifuga (13 000 x g).
- BIOhazard box.
- Laboratorní bezpečnostní rukavice.



## Upozornění

Při používání kitů používejte rukavice. Doporučuje se pracovat v BIOhazard boxu. Vyhněte se jakémukoliv kontaktu kůže s reagensy. V případě kontaktu kůže s reagensy zasažené místo důkladně opláchněte vodou. Nepolykejte reagensy. V případě náhodného užití nebo kontaktu s reagensy přečtěte MSDS protokol, který je k dispozici na vyžádání na telefonu 542 213 851 nebo na webových stránkách [www.elisabeth.cz](http://www.elisabeth.cz). Reagensy označené jako hořlavé by měly být drženy od otevřeného plamene a ohně. Vyhněte se kontaktu reagensů s bělidly nebo dalšími oxidačními činidly. Tento kit je určen pro diagnostické použití.

**V případě, že použijete Proteinázu K, která není součástí tohoto kitu, přidávejte 20 µl Proteinázy K v rámci protokolu.**

## Protokol

1. a) **Moč:** Vortexujte celý objem moče 15 sekund. Přeneste 10 ml zvortexovaného vzorku moče do 15 ml zkumavky. Centrifugujte moč při 6000 x g po dobu 20 minut, odstraňte supernatant a pelet resuspendujte v 200 µl vody pro molekulární biologii. Poté přidejte **200 µl roztoku MI3**, **20 µl Proteinázy K** a interní kontrolu ze soupravy pro detekci patogenu. Vortexujte 15 sekund.

Inkubujte 15 minut při 65 °C.

Centrifugujte lyzát 5 minut při 6000 x g. Přeneste supernatant do nové mikrozukavky a pelet vyhodte.

Přidejte k supernatantu **210 µl roztoku MI4**. Vortexujte 15 sekund. Krátce stočte, abyste odstranili kapky z víčka mikrozukavky a přeneste lyzát na centrifugační kolonku. Centrifugujte 1 minutu při 13 000 x g.

- b) **Krev:** Přidejte **20 µl Proteinázy K do 200 µl krve** nebo jiné tělní tekutiny v 1,5 ml zkumavce (příložená).

Přidejte **200 µl roztoku MI3**, interní kontrolu ze soupravy pro detekci patogenu a vortexujte 15 sekund.

Inkubujte 15 min při 65 °C. Krátce stočte, abyste odstranili kapky z víčka mikrozukavky.

Přidejte **210 µl roztoku MI4** a vortexujte 15 sekund. Krátce centrifugujte, abyste odstranili kapky z víčka mikrozukavky a přeneste veškerý obsah mikrozukavky do kolonky.

Centrifugujte 1 minutu při 13 000 x g.

- c) **Stěry: Cervikální stěry, uretrální stěry, stěry ze spojivky, stěry z konečníku**

Všechny tyto vzorky musejí být odebrány před nasazením antibiotik v souladu se standardním postupem do odběrových zkumavek s transportním médiem pro uchování chlamydií (kit byl validován pro transportní média MicroTest M4RT Transport a remel MicroTest M4 Transport). Vzorky v těchto transportních médiích by měly být převáženy do laboratoře při 4 °C. Vzorky mohou být poté skladovány až sedm dní při 4 °C.

### **Doporučený postup pro izolaci vzorků ze stěrů:**

Před izolací DNA pořádně vortexujte odběrovou zkumavku po dobu 10 sekund. Otevřete zkumavku a o stěry zkumavky vymačkejte roztok z odběrového tampónu. Poté tampón vyhodte.

Odběrovou zkumavku centrifugujte 15 minut při 6000 x g. Pokud nemáte centrifugu na odběrové zkumavky, rozdělte médium do dvou 1,5 ml mikrozukavek a centrifugujte. (Mikrozukavky mohou být alternativně centrifugovány 10 minut při 10 000 x g).

Odsajte supernatant. Z EliGene<sup>®</sup> Urine Isolation Kitu přidejte k peletu **200 µl roztoku MI3** a 200 µl vody pro molekulární biologii a pelet pomocí pipety resuspendujte (pokud používáte pro centrifugaci mikrozukavky, nejprve resuspendujte pelet v jedné zkumavce s danými objemy roztoků a poté resuspendujte pelet ve druhé mikrozukavce v roztoku z první mikrozukavky). Následně ke vzorku přidejte **20 µl Proteinázy K** a interní kontrolu ze soupravy pro detekci patogenu.

Vortexujte 15 sekund.



Inkubujte 15 minut při 65 °C.

Krátce stočte a přidejte k lyzátu **210 µl roztoku MI4**.

Vortexujte 15 sekund. Krátce stočte, abyste odstranili kapky z víčka mikrozkuřavky a přeneste lyzáat na centrifugační kolonku.

Centrifugujte 1 minutu při 13 000 x g.

d) *Sperma*: Pro DNA izolaci ze spermatu použijte EliGene® Sperm Isolation Supplement (Cat. No. 90051-50-SPE) nabízený společností ELISABETH PHARMACON a následujte instrukce dodávané s kitem. EliGene® Sperm Isolation Supplement obsahuje speciální puřry optimalizované pro izolaci DNA ze spermatu.

### **Další kroky izolace společně pro všechny typy vzorků:**

2. Přeneste kolonku do nové 2,0 mikrozkuřavky.
3. Do kolonky **přidejte 500 µl roztoku MI5**. Centrifugujte 30 sekund při 13 000 x g.
4. Vyjměte kolonku z mikrozkuřavky, obsah mikrozkuřavky vylijte do odpadu a vraťte do ní kolonku.
5. Do kolonky **přidejte 500 µl roztoku MI6**. Centrifugujte 30 sekund při 13 000 x g.
6. Vyjměte kolonku z mikrozkuřavky, obsah mikrozkuřavky vylijte do odpadu a vraťte do ní kolonku.
7. Centrifugujte opět 30 sekund při 13 000 x g, aby došlo k vysušení membrány.
8. **Opatrně vyjměte kolonku** a přeneste ji do nové 2,0 mikrozkuřavky aniž byste se dotkli roztoku MI6 na dně původní mikrozkuřavky.
9. **Přidejte 100 µl roztoku MI7**. Pro zvýšení výtěžku DNA inkubujte 5 minut při 65 °C.
10. Centrifugujte 1 minutu při 13 000 x g.
11. Odstraňte kolonku. Genomická DNA je nyní připravena pro různé aplikace.

### **Interpretace výsledků**

Celý proces izolace DNA musí být kontrolován pomocí vnitřní kontroly. Vnitřní kontrola poskytne informaci o účinnosti DNA izolace a o přítomnosti případných inhibitorů. V případě inhibovaných vzorků je nejlepší provést novou izolaci DNA.

### **Upozornění**

Kontaminace laboratorního prostoru je také možná. Používejte proto zvlášť pipety pro MasterMixy, pipety pro pozitivní kontroly a samostatné pipety na DNA vzorky. Dodržujte všechna doporučení pro laboratoře DNA analýz.

### **Omezení metody**

Výsledky získané pomocí tohoto produktu jsou závislé na správném odběru, transportu, uchování a zpracování vzorků. K zamezení chybných výsledků je nutné dodržovat pokyny uvedené v tomto návodu.

K zamezení chybných výsledků musí být tento produkt používán osobou zkušenou v provádění molekulárně-biologických metod, jako jsou izolace, amplifikace a detekce nukleových kyselin.

K zamezení falešně pozitivních výsledků je nutné oddělit místa pro izolaci/připravu amplifikační reakce a pro amplifikaci/detekci produktů amplifikace.

Získané výsledky musejí být interpretovány s ohledem na výsledky dalších laboratorních testů (kultivace, mikroskopie, atd.) a s ohledem na klinický stav pacienta.



### Varování a bezpečnostní opatření

Tato souprava je určena výhradně k použití *in vitro*.

- Pracujte se všemi biologickými vzorky jako s potenciálně infekčním materiálem. Vyhněte se přímému kontaktu s biologickými vzorky. Vyhněte se rozlití vzorků a tvorbě aerosolů. Jakýkoliv materiál, který přišel do styku s biologickými vzorky, musí být před umístěním do odpadu autoklávován při 121 °C nejméně 60 minut.
- Pracujete se všemi reagensy a používaným materiálem s vědomím, že mohou přenášet infekční agens. Vyhněte se přímému kontaktu s reagensy. Odpad musí být likvidován v souladu s adekvátními bezpečnostními předpisy. Spotřební materiál musí být spálen. Tekuté odpady obsahující kyseliny nebo zásady musejí být před likvidací zneutralizovány.
- Používejte vhodné ochranné oblečení, rukavice a ochranu očí a obličeje.
- Nikdy nepipetujte roztoky ústy.
- Nejezte, nepijte. Nekuřte a neaplikujte kosmetiku v laboratorních prostorách.
- Řádně si umyjte ruce po práci se vzorky a reagensy.
- Likvidujte zbylé reagensy a odpad v souladu s adekvátními bezpečnostními předpisy.
- Před započítím práce si řádně přečtěte veškeré instrukce uvedené v tomto návodu.
- Při práci postupujte přesně podle návodu k použití.
- Soupravu nepoužívejte po době expirace, která je uvedena na obalu.
- Používejte pouze reagensy poskytované v rámci soupravy a reagensy doporučené výrobcem.
- Nemíchejte reagensy z různých šarží!
- Nepoužívejte reagensy ze souprav jiných výrobců!

### Varování a bezpečnostní opatření pro molekulární biologii

- Molekulárně-biologické postupy jako jsou izolace nukleové kyseliny, reverzní transkripce, amplifikace a detekce vyžadují kvalifikovaný personál z důvodu zamezení chybných výsledků, speciálně vzhledem k degradaci nukleových kyselin obsažených ve vzorcích a k možné kontaminaci.
- Je nezbytné mít k dispozici samostatnou místnost pro extrakci nukleových kyselin, pro přípravu amplifikačních směsí a pro detekci. Zabezpečte, aby se produkt amplifikace nikdy nedostal do místnosti pro extrakci nukleových kyselin nebo do místnosti pro přípravu amplifikačních směsí.
- Je nezbytné používat vhodné laboratorní pláště, rukavice a pomůcky určené pro izolaci nukleových kyselin nebo pro přípravu amplifikačních směsí nebo pro detekci. Nikdy nepřenášejte laboratorní pláště, rukavice a pomůcky mezi místnostmi pro extrakci nukleových kyselin, pro přípravu amplifikačních směsí a pro detekci.
- Vzorek, ze kterého se analýza provádí, musí být hned od počátku pro DNA analýzu určen a musí s ním být podle toho nakládáno, např. vzhledem k možné kontaminaci, degradaci nukleových kyselin atd. Vzorek musí být zpracováván v laminárním boxu. Různé vzorky nesmějí být otevřeny ve stejnou dobu. Automatické pipety užívané pro práci s biologickými vzorky musejí být používány pouze pro tuto specifickou práci a musejí být používány špičky s filtrem. Používané špičky musejí být sterilní a prosté DNA/RNA a DNáz a RNáz.
- Automatické pipety užívané pro práci se vzorky musejí být používány pouze pro tuto specifickou práci a musejí být používány špičky s filtrem. Používané špičky musejí být sterilní a prosté DNA/RNA a DNáz a RNáz.



- S produkty amplifikace je třeba zacházet velmi opatrně, aby nedošlo k jejich rozptýlení do prostředí laboratoří a k případné kontaminaci nově testovaných vzorků.

### **Varování a bezpečnostní opatření týkající se složek této soupravy**

- Použité roztoky nesou následující bezpečnostní věty (P; H):

#### **Roztok MI3**

|                |   |
|----------------|---|
| H302+H332      | Zdraví škodlivý při požití nebo při vdechování.   |
| H315           | Způsobuje vážné podráždění kůže.  |
| H319           | Způsobuje vážné podráždění očí.   |
| P261           | Zamezte vdechování prachu/dýmu/plynu/mlhy/par/aerosolů.   |
| P280           | Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.  |
| P301+P312+P330 | PŘI POŽITÍ: Necítíte-li se dobře, volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO /lékaře. Vypláchněte ústa.   |
| P304+P340+P312 | PŘI VDECHNUTÍ: Přeneste osobu na čerstvý vzduch a ponechte ji v poloze usnadňující dýchání. Necítíte-li se dobře, volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO /lékaře. Vypláchněte ústa. |
| P305+P351+P338 | PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny, a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování.                        |
| P337+P313      | Přetrvává-li podráždění očí: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.   |

#### **Roztok MI4**

|                |  |
|----------------|--|
| H225           | Vysoce hořlavá kapalina a páry.  |
| H319           | Způsobuje vážné podráždění očí.  |
| H336           | Může způsobit ospalost nebo závratě.   |
| P210           | Chraňte před teplem, horkými povrchy, jiskrami, otevřeným ohněm a jinými zdroji zapálení. Zákaz kouření.   |
| P233           | Uchovávejte obal těsně uzavřený.   |
| P305+P351+P338 | PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny, a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování. |

#### **Roztok MI5**

|      |  |
|------|--|
| H225 | Vysoce hořlavá kapalina a páry.  |
| H315 | Způsobuje vážné podráždění kůže.   |
| H319 | Způsobuje vážné podráždění očí.  |
| P210 | Chraňte před teplem, horkými povrchy, jiskrami, otevřeným ohněm a jinými zdroji zapálení. Zákaz kouření. |
| P280 | Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.                               |



#### **Roztok MI6**

- H225 Vysoce hořlavá kapalina a páry.  
H315 Způsobuje vážné podráždění kůže.  
H319 Způsobuje vážné podráždění očí.  
P210 Chraňte před teplem, horkými povrchy, jiskrami, otevřeným ohněm a jinými zdroji zapálení. Zákaz kouření.  
P280 Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.

#### **Roztok MI7**

- P280 Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.  
P281 Používejte požadované osobní ochranné prostředky.

#### **Roztok Proteinázy K**

- H334 Při vdechování může vyvolat příznaky alergie nebo astmatu nebo dýchací potíže.  
P304+P340 PŘI VDECHNUTÍ: Přeneste osobu na čerstvý vzduch a ponechte ji v poloze usnadňující dýchání.  
P261 Zamezte vdechování prachu/dýmu/plynu/mlhy/par/aerosolů.  
P342+P311 Při dýchacích potížích: Volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO/lékaře/...  
P284 Používejte vybavení pro ochranu dýchacích cest.

#### **Literatura**

Barbara A. Bannister, Norman T. Begg and Stephen H. Gillespie: Infectious Disease. Blackwell Science, 2th Ed., 2000



## Vysvětlivky



Katalogové číslo



Horní teplotní hranice



Číslo šarže



Spotřebujte do (poslední den v měsíci).



Diagnostický zdravotnický prostředek *in vitro*



V souladu s požadavky Evropské Direktivy 98\79\EEC pro diagnostické zdravotnické prostředky *in vitro*.



Obsah dostatečný pro "N" testů



Prosím, řiďte se instrukcemi pro použití.



Výrobce

## Výrobce

**ELISABETH PHARMACON, spol. s r.o.**

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

E-mail: [info@elisabeth.cz](mailto:info@elisabeth.cz)