

„Viral DNA/RNA Purification Kit“  50

REF DK0011

Rinkinys, skirtas virusinių nukleorūgščių gryninimui iš žmogaus kraujo plazmos arba serumo mėginių *in vitro* diagnostikos tikslams

Naudojimui *in vitro* diagnostikoje

IVD



UAB „Fermentas“
Thermo Fisher Scientific Inc.
dukterinė įmonė
V.A. Graičiūno 8
LT-02241 Vilnius, Lietuva
+370 700 55131



ID PA-DK001




Rev.03/04.2011

TURINYS

puslapis







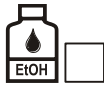

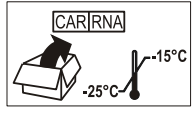
Rinkinio sudėtis	2
Ženklų išaiškinimas	2
Laikymo sąlygos ir galiojimas	3
Kokybės kontrolė.....	3
Numatyta paskirtis.....	3
Produkto naudojimo apribojimai	3
Aprašymas	4
Veikimo principas	4
Svarbūs perspėjimai.....	5
Mėginių paruošimas ir laikymas	5
Tirpalų paruošimas.....	6
Balastinė RNR.....	6
Balastinės RNR paruošimas	6
Reikiamo balastinės RNR kiekio paskaičiavimas	7
Vidinė kontrolė	7
Papildomos darbo priemonės ir įranga	7
Procedūros apžvalga.....	8
Virusinių nukleorūgščių gryninimo protokolas.....	9
Saugos informacija.....	12
Nuorodos	13

RINKINIO SUDĖTIS

	Rinkinys „Viral DNA/RNA Purification Kit“		REF DK0011  50
CPL	Kolonėlės paruošimo skystis (raudonas dangtelis)	COL PREP LIQ	2 x 1,4 ml
LS	Lizės tirpalas*	LYS SOLN	12 ml
WB1	Plovimo buferis 1 (koncentruotas)*	WASH BUF 1 CONC	25 ml
WB2	Plovimo buferis 2 (koncentruotas)	WASH BUF 2 CONC	11 ml
EL	Eliuentas (baltas dangtelis)	ELU	3 x 1,25 ml
PK	Proteinazė K (žalias dangtelis)	PROTK	2 x 1,3 ml
CR	Balastinė RNR (mėlynas dangtelis)	CAR RNA	1 mėgintuvėlis
LT	Lizės mėgintuvėliai (1,5 ml)	LYS TUBE	50
SC	Centrifuguojamosios kolonėlės su plovimo mėgintuvėliais	COL	50
WT	Plovimo mėgintuvėliai (2 ml)	WASH TUBE	4 x 50
ET	Eliucijos mėgintuvėliai (1,5 ml)	ELU TUBE	50
HB	Vartotojo instrukcija	H B	1

* sudėtyje yra guanidino hidrochlorido (guanidinio chlorido).

ŽENKLŲ IŠAIŠKINIMAS

	Dėmesio! Žiūrėkite vartotojo instrukciją	ADD	Įdėkite nurodytą komponentą
LOT	Partijos numeris	COMP	Komponentai
	Snaudoti iki	CONT	Sudėtyje yra
IVD	<i>In vitro</i> diagnostikos medicinos prietaisai	EtOH	Etanolis
	Gamintojas	ID	Medžiagos identifikacinis numeris
	Žiūrėkite vartotojo instrukciją	VOL	Kiekis
REF	Kataloginis numeris		Gaunama
	Temperatūros apribojimas		Įpylę etanolio pažymėkite atliktą žingsnį
 50	Rinkinyje esančių reagentų užtenka 50-čiai grynimų		Nedelsiant išimkite balastinę RNR ir saugokite -20°C

LAIKYMO SĄLYGOS IR GALIOJIMAS

Po pristatymo balastinę RNR (CR) nedelsiant išimkite iš dėžutės ir saugokite originalioje aliuminio pakuotėje -20°C temperatūroje. Kiti rinkinio komponentai turi būti saugomi kambario temperatūroje ($15-25^{\circ}\text{C}$). Visi rinkinio komponentai galioja iki ant pakuotės nurodytos datos. Plovimo buferis 1 (WB1) ir plovimo buferis 2 (WB2), papildyti nurodytu etanolio kiekiu, galioja iki ant pakuotės nurodytos datos.

KOKYBĖS KONTROLĖ

Virusinių nukleorūgščių gryninimo rinkinys „**Viral DNA/RNA Purification Kit**“ atitinka 98/79/EB direktyvos I ir III prieduose *in vitro* diagnostikos prietaisams keliamus reikalavimus, rinkinio kokybę kontroliuojama validuotais metodais. Nuolatinė produkto kokybė užtikrinama tikrinant kiekvienos rinkinio „**Viral DNA/RNA Purification Kit**“ partijos atitiktis nustatytoms specifikacijoms, kaip numatyta Bendrovės Kokybės valdymo sistemos procedūrose. Produkto kokybės sertifikatas pateikiamas atskirai pareikalavus.

NUMATYTA PASKIRTIS

Rinkinys „**Viral DNA/RNA Purification Kit**“ yra bendros paskirties *in vitro* diagnostikos medicinos prietaisas, skirtas virusinių nukleorūgščių gryninimui iš žmogaus plazmos ar serumo mėginių.

Bet kokie diagnostiniai tyrimų rezultatai, gauti, naudojant aprašytą virusinių nukleorūgščių gryninimo procedūrą ir vėlesnius nukleorūgščių diagnostinius testus, turėtų būti vertinami kartu su papildomais klinikinių ar laboratorinių tyrimų duomenimis. Produktas yra skirtas naudoti profesionaliems medicinos ir techninio personalo darbuotojams, apmokytiems *in vitro* molekulinės diagnostikos metodų.

Rinkinys yra suderinamas su tolesniais testais, kuriuose naudojama fermentinė nukleorūgščių (DNR/RNR) amplifikacija ar kita fermentinė modifikacija bei tolimesnė signalo detekcija.

Išgrynintos virusinės nukleorūgštys gali būti naudojamos tiek kokybiniais (pvz., kraujo atrankinei patikrai), tiek kiekybiniais (pvz., viruso kiekio, koncentracijos) tyrimams, pagrįstiems nukleorūgščių tyrimų metodais, atlikti.

Klaidingų diagnostinių tyrimų rezultatų tikimybei sumažinti nukleorūgščių gryninimo, amplifikacijos bei detekcijos procedūrų metu būtina naudoti vidinę, teigiamą ir neigiamą kontroles.

PRODUKTO NAUDOJIMO APRIBOJIMAI

Rinkinys „**Viral DNA/RNA Purification Kit**“ netinkamas virusinių nukleorūgščių gryninimui iš viso kraujo mėginių, audinių ar ląstelių kultūrų. Rinkinio tinkamumas virusinių nukleorūgščių gryninimui iš neląstelių kūno skysčių (pvz., šlapimas ar cerebrospinalinis skystis) nėra patikrintas. Išgrynintų virusinių nukleorūgščių išeiga gali svyruoti priklausomai nuo viruso tipo. Plazmos ar serumo mėginiai iš heparinizuoto kraujo netinkami. Už šio rinkinio charakteristikų validavimą tolimesniems diagnostiniams taikymams atsako vartotojas.

APRAŠYMAS

Rinkinyje „**Viral DNA/RNA Purification Kit**“ virusų nukleorūgštims gryninti naudojamos patogios centrifuguojamosios kolonėlės su silikagelio membrana. Po plazmos arba serumo mėginių lizės, laisvų virusinių nukleorūgščių adsorbcijos ant centrifuguojamosios kolonėlės membranos, likusio lizato šalinimo, plovimo ir eliucijos žingsnių gaunami tolimesniam naudojimui paruošti išgrynintų virusinių nukleorūgščių mėginiai. Išgrynintų nukleorūgščių mėginiuose nėra baltymų, nukleazų priemaišų ar kitų inhibitorių, galinčių įtakoti tolimesnius taikymus. Šiuo rinkiniu išgrynintos virusinės DNR arba RNR gali būti tiesiogiai naudojamos PGR, kiekybinėje PGR ar kituose nukleorūgščių testuose.

VEIKIMO PRINCIPAS

Rinkinio „**Viral DNA/RNA Purification Kit**“ veikimas pagrįstas gerai žinomu nukleorūgščių gryninimo metodu. Visa virusinių nukleorūgščių gryninimo procedūra susideda iš šių etapų:

1 Mėginio lizė

Mėginių lizė vykdoma lizės tirpale (LS) su proteinaze K (PK) denatūruojančiose sąlygose 56°C temperatūroje. Lizės tirpalas bei proteinazė K inaktyvuoja DNazes bei RNazes ir apsaugo virusines nukleorūgštis nuo degradavimo.

2 Virusinių nukleorūgščių adsorbcija ant kolonėlės membranos

Lizuotas mėginys perkeliamas į centrifuguojamąją kolonėlę (SC), kurioje dėl chaotropinių tirpalo druskų poveikio, laisvos nukleorūgštys adsorbuojasi ant silikagelio membranos. Likęs tirpalas pašalinamas centrifuguojant kolonėlę.

3 Plovimas

Trijų plovimo žingsnių metu, naudojant Plovimo buferį 1 (WB1) ir Plovimo buferį 2 (WB2), pašalinami lizato likučiai, o ant kolonėlės membranos lieka tik grynos nukleorūgštys.

4 Virusinių nukleorūgščių eliucija

Grynos virusinės nukleorūgštys nuo kolonėlės membranos nuplaunamos eliuentu (EL). Surinktas virusinių nukleorūgščių tirpalas yra tinkamas tiesioginiam taikymui tolimesniuose nukleorūgščių tyrimuose (testuose).

SVARBŪS PERSPĖJIMAI

- Gavę rinkinį, patikrinkite, ar rinkinio pakuotė nepažeista. Apie pakuotės pažeidimą praneškite tiekėjui. Nenaudokite pažeistų rinkinio komponentų.
- **Lizės tirpalo (LS)** ir **plovimo buferio 1 (WB1)** sudėtyje yra dirginančių medžiagų. Dirbdami su šiais reagentais, visada mūvėkite apsaugines pirštines ir laikykitės numatytų saugos reikalavimų. Daugiau informacijos rasite skyriuje SAUGOS INFORMACIJA (psl. 12) ir rinkinio saugos duomenų lape (pateikiamas pareikalavus).
- Mėginiai ir visos atliekos yra potencialiai infekuotos medžiagos, todėl užtikrinkite atitinkamą apsaugą dirbdami su minėtomis medžiagomis. Venkite bet kokio kontakto su oda ir akimis! Jei įmanoma, iki mėginių sulizavimo dirbkite laminarinėje spintoje. Po procedūros kruopščiai dezinfekuokite darbinius paviršius. Užtikrinkite potencialiai infekuotų atliekų tvarkymą ir šalinimą, laikydamiesi Lietuvos higienos normos HN 66:2008 „Medicininų atliekų tvarkymo saugos reikalavimai“.
- Kryžminiam mėginių užkrėtimui išvengti po skysčių ėmimo visada keiskite pipečių antgalius (rekomenduojama naudoti antgalius su aerosolių barjeru); vienu metu atidarykite tik vieną mėgintuvėlį; mūvėkite vienkartinės pirštines ir pakeiskite, jei užteršėte mėginiu.
- Visada naudokite įrangą, neužterštą RNazėmis.
- Pradėdami naują gryninimo procedūrą visada naudokite tik šviežiai paruoštą lizės tirpalo (LS) ir balastinės RNR (CR) mišinį!
- Prieš pradėdami procedūrą paruoškite centrifugavimo kolonėlę (SC) į membranos vidurį įpildami 50 µl kolonėlės paruošimo skysčio (CPL). Kolonėlės centrifuguoti nereikia.
- Rinkinys skirtas naudoti profesionaliam personalui, apmokytam dirbti su *in vitro* diagnostikos medicinos prietaisais.

MĖGINIŲ PARUOŠIMAS IR LAIKYMAS

- Po surinkimo ir centrifugavimo plazmos ar serumo mėginius galite saugoti 2-8°C temperatūroje iki 6 val. Ilgalaikiam saugojimui mėginius laikykite -20°C ar -70°C temperatūroje.
- Nešaldykite ir neatitirpinkite mėginių daugiau, nei vieną kartą.
- Prieš naudojimą atšildykite mėginius iki kambario temperatūros (20±5°C). Susidariusias nuosėdas pašalinkite centrifuguodami 5 min. 3000 x g kambario temperatūroje.
- Naudokite tik EDTA arba citratais konservuotus mėginius. Plazmos mėginiai iš heparinizuoto kraujo netinkami!

TIRPALŲ PARUOŠIMAS

Prieš pirmą naudojimą į koncentruotus **plovimo buferį 1 (WB1)** ir **plovimo buferį 2 (WB2)** įpilkite lentelėje nurodytus etanolio (96-100%) kiekius:

	REF DK0011 Σ 50	
	Plovimo buferis 1 (WB1)	Plovimo buferis 2 (WB2)
Koncentruotas plovimo buferis	25 ml	11 ml
Etanolis (96-100%)	15 ml	44 ml
Galutinis tūris	40 ml	55 ml

- Visus tirpalus būtina paruošti remiantis pateiktomis rekomendacijomis.
- Paruošę plovimo buferinius tirpalus, etiketėse pažymėkite atliktą žingsnį.
- Prieš naudojimą patikrinkite, ar tirpaluose nėra druskų nuosėdų. Susidariusias nuosėdas ištirpinkite pašildydami tirpalus iki 37°C temperatūros ir vėl atvėsindami iki kambario temperatūros (20±5°C).
- Už atitinkamų kontrolių naudojimą procedūros metu atsakingas pats rinkinio vartotojas.

BALASTINĖ RNR

Balastinė RNR (CR) svarbi efektyviam virusinių nukleorūgščių gryninimui ir yra naudojama dėl dviejų priežasčių. Visų pirma, balastinė RNR palengvina virusinių nukleorūgščių sąveiką su silikagelio membrana. Tai ypač svarbu, kai mėginyje yra labai mažai virusinių nukleorūgščių. Jei po lizės chaotropinių druskų tirpale vis dėlto išlieka keletas funkcionalių RNazės molekulių, santykinai didelis balastinės RNR kiekis sumažina virusinės RNR suardymo tikimybę. Naudojant lizės tirpalą (LS) be balastinės RNR, gali sumažėti virusinių nukleorūgščių išeiga.

BALASTINĖS RNR PARUOŠIMAS

Balastinė RNR (CR) klientui pristatoma džiovintoje formoje specialioje, drėgmei nepralaidžioje aliuminio pakuotėje, todėl prieš naudojimą džiovintą **balastinę RNR (CR)** būtina ištirpinti **300 µl eliuento (EL)**. Šviežiai paruoštą balastinės RNR tirpalą palaikykite 5 min. kambario temperatūroje ir kruopščiai išmaišykite, o ant mėgintuvėlio sienelių susidariusius lašelius surinkite centrifuguodami. Paruoštas balastinės RNR tirpalas turi būti naudojamas iš karto arba saugomas -20°C temperatūroje. Balastinės RNR tirpalo (CR) negalima atšildyti ir užšaldyti daugiau nei 10 kartų! Jei planuojate vienu metu gryninti ne daugiau kaip keletą mėginių, balastinės RNR (CR) tirpalą išpilstykite po 50 µl į mėgintuvėlius (be nukleazių) ir saugokite -20°C temperatūroje.

REIKIAMO BALASTINĖS RNR KIEKIO PASKAIČIAVIMAS

Kiekvieną kart, prieš pradėdant naują gryninimo procedūrą, turi būti paruoštas šviežias lizės tirpalo (LS) ir balastinės RNR (CR) mišinys. Pageidaujama mėginių kiekiui paruošti reikalingi lizės tirpalo (LS) ir balastinės RNR (CR) kiekiai paskaičiuojami remiantis žemiau pateikta lentele. Į reikiamą lizės tirpalo (LS) kiekį įpilkite apskaičiuotą balastinės RNR (CR) kiekį ir sumaišykite purtykle ar pipetuodami.

Mėginių sk.	Lizės tirpalo (LS) kiekis (ml)	Balastinės RNR (CR) kiekis (μl)	Mėginių sk.	Lizės tirpalo (LS) kiekis (ml)	Balastinės RNR (CR) kiekis (μl)
1	0,22	5,5	13	2,86	71,5
2	0,44	11,0	14	3,08	77,0
3	0,66	16,5	15	3,30	82,5
4	0,88	22,0	16	3,52	88,0
5	1,10	27,5	17	3,74	93,5
6	1,32	33,0	18	3,96	99,0
7	1,54	38,5	19	4,18	104,5
8	1,76	44,0	20	4,40	110,0
9	1,98	49,5	21	4,62	115,5
10	2,20	55,0	22	4,84	121,0
11	2,42	60,5	23	5,06	126,5
12	2,64	66,0	24	5,28	132,0

Pastaba:

Reikiamas balastinės RNR (CR) kiekis (μl) paskaičiuojamas pagal formulę:

$$N \times 0,22 \text{ ml} = Y \text{ ml}$$

$$Y \text{ ml} \times 25,0 \text{ μl/ml} = Z \text{ μl}$$

Sutrumpinimai: N – vienos procedūros metu ruošiamų mėginių skaičius;

Y – paskaičiuotas lizės tirpalo (LS) kiekis (ml);

Z – balastinės RNR (CR) kiekis (μl), kurį reikia įdėti į paskaičiuotą Y lizės tirpalo (LS) kiekį.

VIDINĖ KONTROLĖ

Vidinės kontrolės naudojimas visuose gryninimo procedūros etapuose būtinas, kai išgrynintos nukleorūgštys toliau naudojamos diagnostinėse amplifikacijos sistemose. Informacijos, kaip naudoti vidines kontroles, ieškokite tolimesnių diagnostinių tyrimų/testų vartojimo instrukcijose.











PAPILDOMOS DARBO PRIEMONĖS IR ĮRANGA

- Mikropipetės, pipečių antgaliai; sterilūs, be nukleazijų (su aeroxolių barjeru)
- Purtyklė (Vortex)
- Etanolis (96-100%)
- Mikrocentrifuga
- Termomikseris
- Vienkartinės pirštinės
- Matavimo cilindras
- Mėgintuvėliai (be nukleazijų) reikiamam lizės tirpalo (LS) ir balastinės RNR (CR) mišinio kiekiui paruošti

PROCEDŪROS APŽVALGA

Prieš pradėdami įdėmiai perskaitykite protokolą (psl. 9). Įdėmiai susipažinkite su visų rinkinio komponentų ženkliniu ir sutrumpinimais (psl. 2)

Procedūros trukmė vienam mėginiui paruošti – apie 30 min.

		Trukmė	
	Kolonėlės paruošimas	<ul style="list-style-type: none"> 1 Ant SC membranos užpilkite 50 µl CPL Necentrifuguokite! 	-
	Lizė	<ul style="list-style-type: none"> 2 Į LT įpilkite 200 µl mėginio Įpilkite 200 µl LS (su pridėta CR) Įpilkite 50 µl PK Sumaišykite Inkubuokite 15 min. 56°C termomikseryje 	15 min.
	Adsorbcijos sąlygų pritaikymas	<ul style="list-style-type: none"> 3 Įpilkite 300 µl etanolio (96-100%) Sumaišykite Inkubuokite 3 min. kambario temperatūroje 	3 min.
	Adsorbcija	<ul style="list-style-type: none"> 4 Perkelkite mėginį į SC Centrifuguokite 1 min 6000 x g Pašalinkite plovimo mėgintuvėlį Įdėkite SC į naują WT 	1 min.
	Plovimas (WB1)	<ul style="list-style-type: none"> 5 Įpilkite 700 µl WB1 į SC Centrifuguokite 1 min 6000 x g Pašalinkite plovimo mėgintuvėlį Įdėkite SC į naują WT 	1 min.
	Plovimas (WB2)	<ul style="list-style-type: none"> 6 Įpilkite 500 µl WB2 į SC Centrifuguokite 1 min 6000 x g Pašalinkite WT Įdėkite SC į naują WT 	1 min.
	Plovimas (WB2)	<ul style="list-style-type: none"> 7 Įpilkite 500 µl WB2 į SC Centrifuguokite 1 min 6000 x g Pašalinkite WT Įdėkite SC į naują WT 	1 min.
	Sausinimas	<ul style="list-style-type: none"> 8 Centrifuguokite 3 min 16000 x g Pašalinkite WT 	3 min.
	Eliucija	<ul style="list-style-type: none"> 9 Įdėkite SC į ET Ant SC membranos užpilkite 50 µl iki 56°C temperatūros pašildyto EL Inkubuokite 2 min kambario temperatūroje Centrifuguokite 1 min 13000 x g Pašalinkite SC 	2+1 min.
	Saugojimas	<ul style="list-style-type: none"> Išsaugokite ET su išgrynintomis virusinėmis nukleorūgštimis. Išgrynintas nukleorūgštis naudokite iš karto arba saugokite -20°C 	

VIRUSINIŲ NUKLEORŪGŠČIŲ GRYNINIMO PROTOKOLAS

Protokolas skirtas virusinių nukleorūgščių (DNR/RNR) gryninimui iš 200 µl tūrio **žmogaus kraujo plazmos arba serumo** mėginių. Naudokite tik EDTA arba citratu konservuotus mėginius (nenaudokite plazmos ar serumo iš heparinizuoto kraujo mėginių)! Žemiau pateiktas protokolas skirtas vieno mėginio ruošimui.

Prieš pradėdami

- Perskaitykite visą vartojimo instrukciją ir laikykitės visų nurodymų.
- Paruoškite visus tirpalus ir serumo/plazmos mėginius remiantis pateiktomis rekomendacijomis (psl. 5-7).
- Įsitinkite, kad turite visą reikiamą papildomą įrangą, medžiagas ir kitas darbo priemones (psl. 7).
- Užtikrinkite tinkamą potencialiai infekuotų atliekų šalinimą.
- Laikykitės darbo su potencialiai infekuotomis medžiagomis saugos taisyklių.
- Visą procedūrą būtina atlikti kruopščiai ir dėmesingai.
- Centrifugavimas atliekamas kambario temperatūroje.

Procedūra

1) Centrifuguojamosios kolonėlės paruošimas



⚠ Pradedant procedūrą būtina paruošti kiekvieną centrifugavimo kolonėlę (SC) panaudojant kolonėlės paruošimo skystį (CPL). Kolonėlės paruošimo skystis gerina nukleorūgščių susirišimą su membrana ir didina išėigą.

- a. Į **centrifuguojamosios kolonėlės (SC)** membranos centrą įpilkite 50 µl **kolonėlės paruošimo skystio (CPL)**. Membrana turi būti visiškai sudrėkinta.

⚠ Paruoštos kolonėlės centrifuguoti nereikia. Kolonėlę saugokite kambario temperatūroje iki tolesnio panaudojimo.

Naudojami rinkinio komponentai:
CPL

COL	PREP	LIQ
SC		COL

2) Mėginio lizė



⚠ Prieš naudojimą lizės tirpalas (LS) turi būti papildytas balastine RNR (CR) (psl. 7)! Naudokite atitinkamą vidinę kontrolę, kaip reikalaujama tolesnio tyrimo vartojimo instrukcijoje. Vidinės kontrolės nepilkite tiesiai į plazmą. Proteinazės K (PK) negalima pilti tiesiai į lizės tirpalą (LS).

- a. Į tuščią 1,5 ml **lizės mėgintuvėlį (LT)** įpilkite 200 µl serumo arba plazmos.
- b. Įpilkite 200 µl **lizės tirpalo (LS)** (papildyto balastine RNR) ir 50 µl **proteinazės K (PK)**, išmaišykite purtykle ar pipetuodami.
- c. Inkubuokite mėginį 15 min. termomikseryje 56°C temperatūroje. Palikite termomikserį įjungtą eliuento (EL) pašildymui vėlesniame etape.
- d. Surinkite ant mėgintuvėlio dangtelio susidariusius lašelius centrifuguodami 3-5 sekundes maksimaliu mikrocentrifugos greičiu.

Naudojami rinkinio komponentai:
CR

CAR	RNA
-----	-----

LS

LYS	SOLN
-----	------

LT

LYS	TUBE
-----	------

PK

PROTK

Papildomi komponentai:
Vidinės kontrolės tolesniems tyrimams

3) Adsorbcijos sąlygų pritaikymas



- Išpilkite 300 µl etanolio (96-100%) ir išmaišykite purtykle arba pipetuodami.
- Inkubuokite mėginį kambario temperatūroje 3 minutes.
- Ant mėgintuvėlio dangtelio susidariusius lašelius surinkite centrifuguodami 3-5 sekundes maksimaliu mikrocentrifugos greičiu.

Papildomi komponentai:
etanolis (96-100%)

4) Nukleorūgščių adsorbcija ant kolonėlės



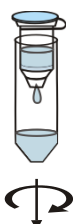
⚠ Įsitikinkite, kad nauja centrifuguojamoji kolonėlė (SC) buvo paruošta, kaip nurodyta 1 žingsnyje!

- Perkelkite lizatą į paruoštą **centrifuguojamąją kolonėlę (SC)** su plovimo mėgintuvėliu.
- Centrifuguokite kolonėlę 1 min. 6000 x g.
- Pašalinkite plovimo mėgintuvėlį su filtratu.
- Centrifuguojamąją kolonėlę (SC) įdėkite į naują 2 ml talpos **plovimo mėgintuvėlį (WT)**.

Naudojami rinkinio komponentai:

SC COL
WT WASH TUBE

5) Plovimas su plovimo buferiu 1 (WB1)



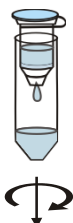
⚠ Prieš pirmą naudojimą į koncentruotą plovimo buferį 1 (WB1) įpilkite etanolio, kaip nurodyta psl. 6.

- Į centrifuguojamąją kolonėlę (SC) įpilkite 700 µl paruošto **plovimo buferio 1 (WB1)**.
- Centrifuguokite kolonėlę (SC) 1 min. 6000 x g.
- Pašalinkite plovimo mėgintuvėlį su filtratu.
- Centrifuguojamąją kolonėlę įdėkite į naują 2 ml talpos **plovimo mėgintuvėlį (WT)**.

Naudojami rinkinio komponentai:

WB1 WASH BUFF1|CONC
WT WASH TUBE

6) Plovimas su plovimo buferiu 2 (WB2)



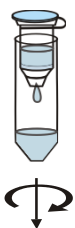
⚠ Prieš pirmą naudojimą į koncentruotą plovimo buferį 2 (WB2) įpilkite etanolio, kaip nurodyta psl. 6.

- Į centrifuguojamąją kolonėlę (SC) įpilkite 500 µl paruošto **plovimo buferio 2 (WB2)**.
- Centrifuguokite kolonėlę (SC) 1 min. 6000 x g.
- Pašalinkite plovimo mėgintuvėlį su filtratu.
- Centrifuguojamąją kolonėlę įdėkite į naują 2 ml talpos **plovimo mėgintuvėlį (WT)**.

Naudojami rinkinio komponentai:

WB2 WASH BUFF2|CONC
WT WASH TUBE

7) Pakartotinis plovimas su plovimo buferiu 2 (WB2)



- Į centrifuguojamąją kolonėlę (SC) įpilkite 500 µl paruošto **plovimo buferio 2 (WB2)**.
- Centrifuguokite kolonėlę (SC) 1 min. 6000 x g.
- Pašalinkite plovimo mėgintuvėlį su filtratu.
- Centrifuguojamąją kolonėlę įdėkite į naują 2 ml talpos **plovimo mėgintuvėlį (WT)**.

Naudojami rinkinio komponentai:

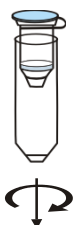
WB2

WASH	BUFF2	CONC
------	-------	------

WT

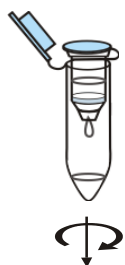
WASH	TUBE
------	------

8) Sausinimas



- Centrifuguokite kolonėlę 3 min. 16000 x g.
- Pašalinkite plovimo mėgintuvėlį (WT) su filtratu.

9) Grynų nukleorūgščių eliucija



- Centrifuguojamąją kolonėlę (SC) įdėkite į naują 1,5 ml talpos **eliucijos mėgintuvėlį (ET)**.
- Į centrifuguojamosios kolonėlės (SC) membranos vidurį įpilkite 50 µl iki 56°C temperatūros pašildyto **eliuento (EL)**.
- Inkubuokite 2 min. kambario temperatūroje.
- Centrifuguokite kolonėlę 1 min. 13000 x g.
- Pašalinkite centrifuguojamąją kolonėlę (SC).

Naudojami rinkinio komponentai:

ET

ELU	TUBE
-----	------

EL

ELU

Saugojimas ir tolesnis naudojimas



- Išsaugokite **eliucijos mėgintuvėlį (ET)** su išgrynintomis virusinėmis nukleorūgštimis.
- Išgrynintas nukleorūgštis naudokite iš karto arba saugokite -20°C.

⚠ Tolimesniam naudojimui kiekybinėje PGR naudokite 10 µl virusinės DNR, 25 µl reakcijos mišinio tūryje.

⚠ Atvirkštinės transkripcijos (AT) reakcijai naudokite 10 µl virusinės RNR, 20 µl kDNR sintezės reakcijos mišinio tūryje.

SAUGOS INFORMACIJA



Lizės tirpalas (LS)

Xn Kenksminga

Komponentai, dėl kurių preparatas klasifikuotas kaip pavojingas: **guanidinio chloridas**

Rizikos frazės

- R22 Kenksminga prarijus.
R38 Dirgina odą.
R41 Gali smarkiai pažeisti akis.
R52/53 Kenksminga vandens organizmams, gali sukelti ilgalaikius nepalankius vandens ekosistemų pakitimus.

Saugos frazės

- S23 Neįkvėpti dujų, dūmų, garų, aerozolių.
S26 Patekus į akis, nedelsiant gerai praplauti vandeniu ir kreiptis į gydytoją.
S36/37/39 Dėvėti tinkamus apsauginius drabužius, mūvėti tinkamas pirštines ir naudoti akių (veido) apsaugos priemones.
S60 Šios medžiagos atliekos ir jos pakuotė turi būti šalinamos kaip pavojingos atliekos.
S61 Vengti patekimo į aplinką. Naudotis specialiomis instrukcijomis (saugos duomenų lapais).



Plovimo buferis 1 (WB1)

Xn Kenksminga

Komponentai, dėl kurių preparatas klasifikuotas kaip pavojingas: **guanidinio chloridas**

Rizikos frazės

- R22 Kenksminga prarijus.
R36/38 Dirgina akis ir odą.

Saugos frazės

- S23 Neįkvėpti dujų, dūmų, garų, aerozolių.
S26 Patekus į akis, nedelsiant gerai praplauti vandeniu ir kreiptis į gydytoją.
S36/37 Dėvėti tinkamus apsauginius drabužius ir mūvėti tinkamas pirštines.
S60 Šios medžiagos atliekos ir jos pakuotė turi būti šalinamos kaip pavojingos atliekos.



Proteinazė K (PK)

Xn Kenksminga

Komponentai, dėl kurių preparatas klasifikuotas kaip pavojingas: **proteinazė K**

Rizikos frazės

R42 Gali sukelti alergiją įkvėpus.

Saugos frazės

S23 Neįkvėpti dujų, dūmų, garų, aerozolių.

S36 Dėvėti tinkamus apsauginius drabužius.

S45 Nelaimingo atsitikimo atveju arba pasijutus blogai, nedelsiant kreiptis į gydytoją (jeigu įmanoma, parodyti šią etiketę).

S60 Šios medžiagos atliekos ir jos pakuotė turi būti šalinamos kaip pavojingos atliekos.

Saugos duomenų lapas pateikiamas pagal užklausą.

Saugos pranešimai priimami:

Faks.: +370 5 2602142

El. paštas: helpdesk.fermentas.lt@thermofisher.com

NUORODOS

1. Boom, R., C.J.A. Sol, M.M.M. Salimans, C.L. Jansen, P.M.E.W. Dillen, and J. van der Noordaa. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28:495–503.