

# Istruzioni per l'uso

## Invisorb® Spin Universal Kit

---



**REF** 1050100200  
1050100300



50 preparazioni  
250 preparazioni



Invitek Molecular GmbH  
Robert-Rössle-Straße 10  
13125 Berlin  
Germania

**INVITEK**  
Molecular

## Note importanti

Grazie per aver acquistato **Invisorb® Spin Universal Kit** di Invitek Molecular.

Il prodotto serve ad isolare manualmente gli acidi nucleici (DNA genomico, DNA batterico, DNA/RNA virale) da una varietà di campioni clinici, utilizzando la tecnologia Spin Column.

**AVVERTENZA!** Un uso e una manipolazione impropri per scopi diversi da quelli previsti possono causare pericoli e danni. Pertanto, si invita a leggere e seguire attentamente le presenti istruzioni per l'uso. Tenerle sempre a portata di mano. Per evitare lesioni a persone, osservare anche le istruzioni di sicurezza.

Tutte le versioni delle istruzioni per l'uso sono scaricabili dal nostro sito web o possono essere richieste su: [www.invitek-molecular.com](http://www.invitek-molecular.com)

Contatto:

Invitek Molecular GmbH

Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlin, Germania

+ 49 (0) 30 9489 2908

[www.invitek-molecular.com](http://www.invitek-molecular.com)

Supporto tecnico:

[techsupport@invitek-molecular.com](mailto:techsupport@invitek-molecular.com)

© 2022 Invitek Molecular, tutti i diritti riservati.

Il kit è conforme al REGOLAMENTO (UE) 2017/746 relativo ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Tuttavia, non è pensato per l'uso diagnostico in vitro nei Paesi in cui il REGOLAMENTO (UE) 2017/746 sui dispositivi medico-diagnostici in vitro non è riconosciuto.

Marchi commerciali: Invisorb®, PSP®, InviMag®, Eppendorf®. I marchi registrati, quelli commerciali, ecc. utilizzati nel presente documento, anche se non specificatamente contrassegnati come tali, non sono da considerarsi non tutelati dalla legge.

InviGenius®, InviMag®, Invisorb®, Invitek®, InviTrap®, MSB®, PSP®, RTP® sono marchi commerciali registrati di Invitek Molecular GmbH.

## Indice dei contenuti

1.	Istruzioni di sicurezza.....	3
2.	Informazioni sul prodotto.....	4
2.1	Il kit contiene .....	4
2.2	Reagenti e attrezzatura che l'utente deve fornire .....	5
2.3	Conservazione, aspetto e scadenza.....	5
2.4	Uso previsto .....	6
2.5	Informazioni sul prodotto e specifiche .....	6
2.6	Principio e procedura .....	7
3.	Estrazione di acidi nucleici con Invisorb® Spin Universal Kit .....	8
3.1	Prima di avviare un protocollo .....	8
3.2	Campionamento e conservazione del materiale di partenza.....	9
3.3	Preparazione del materiale di partenza .....	11
3.3.1	Siero, plasma, altri liquidi corporei privi di cellule.....	11
3.3.2	Sangue .....	11
3.3.3	Tamponi.....	11
3.3.4	Campioni di feci (surnatante).....	11
3.3.5	Batteri coltivati.....	12
3.3.6	Urina .....	12
3.3.7	Secrezione tracheale, BAL, espettorato .....	12
3.3.8	Biopsie di tessuto .....	13
3.3.9	Surnatanti di colture cellulari .....	13
3.4	Protocollo breve Invisorb® Spin Universal Kit .....	14
3.5	Protocollo: isolamento simultaneo degli acidi nucleici totali (DNA e RNA) da tutti i campioni liquidi.....	15
4.	Appendice.....	17
4.1	Risoluzione di problemi .....	17
4.2	Garanzia .....	18
4.3	Simboli utilizzati su prodotto e etichettatura.....	18
4.4	Ulteriori documenti e informazioni aggiuntive .....	19
4.5	Informazioni sull'ordine.....	19

## 1. Istruzioni di sicurezza

Accertarsi che chiunque utilizzi il presente prodotto abbia ricevuto le istruzioni sulle pratiche di sicurezza generali per i laboratori e le informazioni sulla sicurezza riportate nel presente documento.

- Nel maneggiare i prodotti chimici, indossare sempre indumenti protettivi, guanti monouso e occhiali di sicurezza.
- Cambiare sempre i puntali delle pipette tra un trasferimento di liquidi e l'altro. Per evitare la contaminazione incrociata, si consiglia l'uso di puntali per pipette con barriera antiaerosol.
- Non riutilizzare i materiali di consumo.
- Gettare i guanti qualora fossero esposti a contaminazioni.
- Non combinare componenti di kit diversi a meno che i numeri di lotto non siano identici.
- Evitare una contaminazione microbica dei reagenti del kit.
- Per minimizzare il rischio di infezioni dal materiale potenzialmente infettivo, raccomandiamo di lavorare in flusso d'aria laminare fino alla lisi dei campioni.

Prima di maneggiare i prodotti chimici, leggere e comprendere tutte le schede dati di sicurezza applicabili (MSDS). Queste sono reperibili su [www.invitek-molecular.com](http://www.invitek-molecular.com).

Smaltire i residui del kit e i rifiuti liquidi in conformità alle normative nazionali, far riferimento alle MSDS. Invitek Molecular non ha testato i materiali infettivi residui nei rifiuti liquidi generati dal kit. La contaminazione di rifiuti liquidi con materiali infettivi residui è altamente improbabile ma non può essere esclusa del tutto. Pertanto, i rifiuti liquidi vanno considerati infettivi e devono essere manipolati e smaltiti in conformità alle normative di sicurezza locali.

Le frasi di rischio e sicurezza della Comunità Europea per i componenti di **Invisorb® Spin Universal Mini Kit** a cui si applicano sono elencate di seguito come segue:

### Proteinase K



Pericolo

H315-H319-H334-H335-P280-P305+P351+P338

### Lysis Buffer HLT



Attenzione

H302-H315-H319-P280-P305+P351+P338

H302: Nocivo se ingerito.

H315: Provoca irritazione cutanea.

H319: Provoca grave irritazione oculare.

H334: Può provocare sintomi allergici o asmatici o difficoltà respiratorie se inalato.

H335: Può irritare le vie respiratorie.

P280: Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.

P305+P351+P338:

IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.

**Informazioni mediche di emergenza possono essere ottenute 24 ore al giorno da infotrac, [www.infotrac.net](http://www.infotrac.net):**

**al di fuori degli USA: 1 – 352 – 323 – 3500**

**negli USA: 1 – 800 – 535 – 5053**

## 2. Informazioni sul prodotto

### 2.1 Il kit contiene

	<b>50 purificazioni</b>	<b>250 purificazioni</b>
<b>N. catalogo</b>	1050100200	1050100300
<b>Lysis Buffer HLT</b>	15 ml/flacone	60 ml/flacone
<b>Proteinase K</b>	1 fiala da 1,1 ml di soluzione di lavoro	3 fiale da 3 x 2 ml di soluzione di lavoro
<b>Carrier RNA</b>	1 fiala da 1,2 ml di soluzione di lavoro	3 fiale da 3 x 2 ml di soluzione di lavoro
<b>RNase Free Water</b>	2 x 2 ml/fiala	15 ml/flacone
<b>Binding Solution</b> (riempire con isopropanolo al 99,7%)	Flacone vuoto (volume finale 15 ml)	Flacone vuoto (volume finale 80 ml)
<b>Wash Buffer HLT</b>	30 ml/flacone (volume finale 50 ml)	105 ml/flacone (volume finale 175 ml)
<b>Wash Buffer</b>	2 x 18 ml/flacone (volume finale 2 x 60 ml)	2 x 60 ml/flacone (volume finale 2 x 200 ml)
<b>Elution Buffer M</b>	30 ml/flacone	120 ml/flacone
<b>RTA Spin Filter Set</b>	50 pezzi	5 x 50 pezzi
<b>RTA Receiver Tubes</b>	2 x 50 pezzi	10 x 50 pezzi
<b>Receiver Tubes da 1,5 ml</b>	50 pezzi	5 x 50 pezzi
<b>2.0 ml Safe-Lock-Tubes</b>	50 pezzi	5 x 50 pezzi
<b>Short Protocol</b>	1 volantino	1 volantino

## 2.2 Reagenti e attrezzatura che l'utente deve fornire

Attrezzatura da laboratorio:

- microcentrifuga (*tutti i protocolli sono stati validati con una centrifuga 5415 D Eppendorf*)
- opzionale: centrifuga per 15 o 50 ml
- termoshaker (37 °C - 95 °C)
- cilindro di misurazione (250 ml)
- guanti monouso
- pipette e puntali per pipette
- miscelatore Vortex
- provette di reazione (1,5 ml, 2,0 ml)

Liquidi e solventi:

- DNase/RNase free water o 1 x PBS per regolare il volume del campione
- 96 - 100 % etanolo (non denaturato)
- isopropanolo\*
- opzionale (per campioni respiratori ad alta viscosità): soluzione satura di acetilcisteina (ACC) (200 mg/ml)
- opzionale: Lysozyme (10 mg/ml)

\*Il kit è validato con 2-propanolo; Rotipuran® >99,7%, p.a., ACS, ISO (n. ordine 6752) di Carl Roth

\* **Possibili fornitori di isopropanolo:**

**Carl Roth**  
2-Propanolo  
Rotipuran® >99,7%, p.a., ACS, ISO  
N. ordine 6752

**Applichem**  
2-Propanolo per la biologia molecolare  
N. ordine A3928

**Sigma**  
2-Propanolo  
N. ordine 59304-1L-F

## 2.3 Conservazione, aspetto e scadenza

**Data di scadenza:** tutti i tamponi e i kit di componenti possono essere conservati a temperatura ambiente e presentano una scadenza, come riportato sull'etichetta della confezione del kit esterno.

**Dopo l'apertura,** i componenti individuali del kit, come quelli preparati in modo conforme prima del primo uso, hanno una scadenza di 3 mesi.

Prima di ogni uso, accertarsi che tutti i componenti siano a temperatura ambiente. Se nelle soluzioni sono presenti precipitati per via della temperatura, scioglierli riscaldandoli accuratamente (fino a 30 °C).

**La temperatura ambiente è definita come intervallo di 15-30 °C.**

**Wash Buffer:** dopo aver aggiunto l'etanolo, chiudere per bene e conservare a temperatura ambiente.

**Wash Buffer HLT e Binding Solution:** dopo aver aggiunto l'isopropanolo, chiudere per bene e conservare a temperatura ambiente.

**Carrier RNA:** una volta disciolto in DNase/RNase free water, il Carrier RNA deve essere conservato a -20°C.

**Proteinase K:** una volta disciolto in DNase/RNase free water, il Proteinase K deve essere conservato a -20°C. Per una conservazione più lunga, conservare a -20 °C, congelare e scongelare una sola volta.

## 2.4 Uso previsto

L'**Invisorb® Spin Universal Kit** è un kit di estrazione dell'acido nucleico basato sulla tecnologia Spin Column, destinato all'isolamento e alla purificazione simultanea del DNA batterico e del DNA/RNA virale.

Il kit può essere usato per una varietà di tipi di campioni umani, come sangue intero venoso fresco o congelato anticoagulato con EDTA o citrato o le rispettive preparazioni di plasma, siero, liquido risciacquato da tamponi, espettorato pretrattato, BAL, secreto tracheale, batteri coltivati, surnatante da sospensione di feci, liquido cerebrospinale, surnatanti di colture cellulari, materiale/tessuto biotico, urina e altri fluidi corporei privi di cellule.

Il prodotto non è pensato per essere impiegato con campioni di sangue eparinizzato. Esso è previsto per l'uso esclusivo da parte di professionisti, come tecnici di laboratorio, medici e biologi con formazione in tecniche di biologia molecolare e procedure diagnostiche *in vitro*.

## 2.5 Informazioni sul prodotto e specifiche

Materiale di partenza	Resa	Qualità	Tempo
Fino a 200 µl <ul style="list-style-type: none"><li>Siero, plasma, altri liquidi corporei privi di cellule, urina</li><li>Tamponi (asciutti, stabilizzati)</li><li>Surnatante da sospensioni di feci</li><li>Batteri coltivati</li><li>Secrezione tracheale, BAL, espettorato</li><li>Surnatante di coltura cellulare</li></ul> Fino a 100 µl: <ul style="list-style-type: none"><li>sangue fresco o congelato (EDTA/citrato stabilizzato, ma non eparina)</li></ul> Fino a 10 mg di campione di tessuto	A seconda del campione (archiviazione e fonte)  Sangue intero: in media 1 µg di DNA	DNA genomico dal sangue: $A_{260} : A_{280}$ 1,8 – 2,1  Altri tipi di campione: in base al tipo di campione, acidi nucleici target	Circa 30 min per 12 campioni (escl. lisi)

La resa e la qualità degli acidi nucleici purificati dipendono dal tipo di campione, dalla fonte del campione, dal trasporto, dalla conservazione, dall'età e dal titolo del virus e per i campioni di sangue anche dalla conta leucocitaria.

Per la determinazione della resa, tenere presente che gli acidi nucleici purificati con questo kit contengono Carrier DNA (5 µg per 200 µl di campione), che rappresenta la maggior parte degli acidi nucleici presenti nell'eluato. In particolare gli acidi nucleici virali derivanti dal materiale ottenuto da campioni biologici sono generalmente a concentrazione molto bassa e quindi quasi impossibili da quantificare fotometricamente. La RT-PCR quantitativa è consigliata per la determinazione della resa.

L'**Invisorb® Spin Universal Kit** fornisce una procedura efficiente per isolare gli acidi nucleici di alta qualità. Il kit è pensato per l'isolamento simultaneo di DNA/RNA virale, DNA batterico e DNA genomico tramite un protocollo Spin Column di lisi-legame-lavaggio-eluzione.

Il kit è validato per la conta dei leucociti di  $3 \times 10^6$  -  $1 \times 10^7$  cells/ml. Conteggi cellulari eccessivamente elevati possono causare l'ostruzione dell'RTA Spin Filter e quindi effetti indesiderati sul processo di purificazione. Si raccomanda pertanto di considerare il volume di input del campione come parametro durante l'implementazione del protocollo diagnostico in vitro. Se necessario, i campioni possono essere pre-diluiti con PBS o DNase/RNase free water prima del processo di isolamento e purificazione.

#### **Applicazioni a valle:**

Il rendimento e la qualità degli acidi nucleici isolati sono in generale adatti a molte applicazioni di diagnostica molecolare come le tecniche di PCR, NGS, metodi di ibridazione e tipizzazione HLA. Le applicazioni a valle dovrebbero essere eseguite secondo le specifiche dei rispettivi produttori.

## **2.6 Principio e procedura**

### **1. Campioni di lisi**

I campioni vengono lisati a temperature elevate. La lisi viene eseguita in presenza di Lysis Buffer HLT, Proteinase K e opzionalmente lisozima per rompere le pareti cellulari batteriche e per digerire le proteine.

L'aggiunta di Carrier RNA è necessaria per il potenziamento e la stabilizzazione del recupero del DNA/RNA virale e per purificare quantità molto piccole di acidi nucleici virali.

### **2. Legare gli acidi nucleici**

Aggiungendo la Binding Solution al lisato, vengono regolate condizioni di legame ottimali. Ogni lisato è poi applicato ad un RTA Spin Filter e gli acidi nucleici vengono adsorbiti alla membrana.

### **3. Lavare per rimuovere le contaminazioni residue**

I contaminanti vengono eliminati in modo efficiente utilizzando Wash Buffer HLT e Wash Buffer, mentre gli acidi nucleici rimangono legati alla membrana.

### **4. Eluire gli acidi nucleici**

Gli acidi nucleici sono eluiti dall'RTA Spin Filter utilizzando 100 - 200 µl di Elution Buffer M.



### 3. Estrazione di acidi nucleici con Invisorb® Spin Universal Kit

#### 3.1 Prima di avviare un protocollo

Quando si utilizza il kit per la prima volta, accertarsi che tutti i tamponi e i reagenti siano preparati come indicato:

<b>Preparazioni di tampone prima del primo utilizzo: 50 preparazioni</b>
<b>Carrier RNA:</b> risospendere il <b>Carrier RNA</b> liofilizzato aggiungendo 1,2 ml di <b>DNase/RNase free Water</b> alla fiala e mescolare accuratamente fino al completo scioglimento (almeno 1 minuto).
<b>Proteinase K:</b> risospendere il <b>Proteinase K</b> liofilizzato aggiungendo 1,1 ml di <b>DNase/RNase free Water</b> alla fiala e mescolare accuratamente fino al completo scioglimento (almeno 1 minuto).
<b>Binding Solution (flacone vuoto):</b> riempire il flacone con 15 ml di <b>isopropanolo al 99,7%</b> (grado per biologia molecolare), tenendolo sempre ben chiuso.
<b>Wash Buffer HLT:</b> aggiungere 20 ml di <b>isopropanolo al 99,7%</b> al flacone. Miscelare per bene, tenendo il flacone sempre ben chiuso.
<b>Wash Buffer:</b> aggiungere 42 ml di <b>etanolo al 96 -100%</b> al flacone. Miscelare per bene, tenendo il flacone sempre ben chiuso.
<b>Preparazioni di tampone prima del primo utilizzo: 250 preparazioni</b>
<b>Carrier RNA:</b> risospendere il <b>Carrier RNA</b> liofilizzato aggiungendo 1 ml di <b>DNase/RNase free Water</b> alla fiala e mescolare accuratamente fino al completo scioglimento (almeno 1 minuto), poi aggiungere 1 altro ml di <b>DNase/RNase free water</b> .
<b>Proteinase K:</b> risospendere il <b>Proteinase K</b> liofilizzato aggiungendo 2 ml di <b>DNase/RNase free Water</b> alla fiala e mescolare accuratamente fino al completo scioglimento (almeno 1 minuto).
<b>Binding Solution (flacone vuoto):</b> riempire il flacone con 80 ml di <b>isopropanolo al 99,7%</b> (grado per biologia molecolare).
<b>Wash Buffer HLT:</b> aggiungere 70 ml di <b>isopropanolo al 99,7%</b> al flacone. Miscelare per bene, tenendo il flacone sempre ben chiuso.
<b>Wash Buffer:</b> aggiungere 140 ml di <b>etanolo al 96 -100%</b> al flacone. Miscelare per bene, tenendo il flacone sempre ben chiuso.

- Regolare il termoshaker a 65°C.
- Riscaldare la quantità necessaria di **Elution Buffer M** a 65 °C (occorrono 50 - 200 µl di **Elution Buffer M** per campione).
- Determinare il numero di reazioni necessarie inclusi i controlli ed etichettare la quantità necessaria di RTA Spin Filter (coperchio) e di Receiver Tubes da 1,5 ml (per campione: 1 Receiver Tube necessario).

#### Master mix

Per una più facile manipolazione, si consiglia di preparare un master mix composto da Lysis Buffer HLT, Proteinase K e, se necessario, Carrier RNA. Quando si prepara il master mix, si consiglia di preparare un volume che superi del 5% il numero totale di reazioni.

Preparare il master mix sempre fresco e poco prima dell'uso.

### **Isolare DNA genomico, DNA batterico e DNA/RNA virale:**

per campione sono necessari 200 µl di Lysis Buffer HLT, 20 µl di Proteinase K e 20 µl di Carrier RNA.

### **Isolare il DNA genomico:**

per campione sono necessari 220 µl di Lysis Buffer HLT e 20 µl di Proteinase K. L'uso di Carrier RNA non è necessario.

### **Controllo dell'estrazione**

Far riferimento alle istruzioni del produttore per determinare l'importo ottimale di controllo dell'estrazione per applicazioni a valle specifiche.

Bassi volumi di controllo dell'estrazione (DNA o RNA) devono essere combinati con il Carrier RNA fornito in un'unica miscela. Le fiale con Carrier RNA contengono 1,2 ml o 2,0 ml di soluzione madre, a seconda delle dimensioni della confezione. Aggiungere la rispettiva quantità di acido nucleico di controllo dell'estrazione al Carrier RNA, se è necessario un volume elevato (> 25% del volume totale di Carrier RNA), sostituire la quantità appropriata di DNase/RNase free Water durante la diluizione di Carrier RNA.

## **3.2 Campionamento e conservazione del materiale di partenza**

Per rese riproducibili ed elevate, è essenziale una corretta conservazione del campione. Le rese possono variare a seconda di fattori come salute del donatore, età del campione, tipo di campione, trasporto e conservazione.

Evitare cicli ripetuti di congelamento-scongelo dei campioni per evitare una degradazione dell'acido nucleico. In linea generale, sono i campioni freschi a dare i migliori risultati. Si raccomanda di tener conto di guide tecniche, come standard CEN/TS e ISO, in materia di processo di pre-esame per la diagnostica molecolare in IVDR, come evidenziato in G. Dagher, et al. (<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.05.002>).

**Siero, plasma, altri liquidi corporei privi di cellule:** per l'estrazione possono essere utilizzati siero o plasma derivati da sangue intero venoso (trattato con anticoagulanti come EDTA o citrato, ma non con eparina), campioni di liquido sinoviale o altri fluidi corporei privi di cellule. Il sangue intero non deve essere agitato su vortex per evitare l'emolisi. Far riposare le provette di siero per almeno 30 minuti prima della centrifugazione. Seguire le istruzioni del sistema di raccolta del sangue per la preparazione del siero o del plasma. Si raccomanda di separare plasma/siero mediante centrifugazione entro 12 ore. I surnatanti ottenuti utilizzando sistemi senza gel separatore devono essere trasferiti in provette per campioni fresche. Per la conservazione a breve termine, i campioni possono essere conservati in ghiaccio per 1-2 ore. I campioni possono essere conservati a -20°C per un massimo di 24 ore. Per la conservazione a lungo termine, si consiglia di congelare i campioni in aliquote a -80°C. Cicli ripetuti di congelamento-scongelo possono influire negativamente sull'integrità del campione e causare ad es. denaturazione/precipitazione delle proteine, con conseguente potenziale riduzione di resa, qualità o dei titoli virali. Inoltre, i crioprecipitati formati durante i cicli di scongelamento e congelamento possono causare problemi. Se il crioprecipitato è visibile, centrifugare a 6,800 x g per 3 min. Il surnatante trasparente deve essere utilizzato immediatamente.

**Sangue:** i campioni di sangue (stabilizzati con EDTA o citrato ma non eparinizzati) possono essere conservati a temperatura ambiente per 2-3 ore. Per la conservazione a breve termine (fino a 24 h), i campioni andrebbero conservati a 2-8 °C. Per la conservazione a lungo termine si consiglia di congelare i campioni in aliquote a -20°C or -80°C.

**Tamponi:**

tamponi asciutti: preparare i campioni come descritto nel metodo di preparazione del campione corrispondente. Conservare a secco a 4-8 °C.

Tamponi in fluido stabilizzante: il liquido stabilizzante può essere maneggiato come fluido corporeo privo di cellule. Si noti che alcuni agenti stabilizzanti possono causare una resa ridotta a causa dell'incompatibilità con la chimica utilizzata nel kit. Conservare secondo i requisiti del produttore.

**Campioni di feci:** i campioni contengono DNasi e RNasi che possono causare rapidamente la degradazione del DNA e dell'RNA. Pertanto, i campioni devono essere conservati congelati a – 80°C.

**Batteri coltivati:** Dopo la coltivazione i batteri devono essere pellettizzati e congelati a -20°C o -80°C per la conservazione a lungo termine. La risospensione è descritta nel corrispondente metodo di preparazione del campione.

**Urina:** A seconda del titolo batterico e dell'applicazione si raccomanda un volume iniziale di 15-50 ml di urina. Centrifugare il campione per pellettizzare i batteri e rimuovere completamente il surnatante (le contaminazioni da urea possono inibire le reazioni della PCR). Per alcune applicazioni è possibile utilizzare direttamente l'urina fresca. Per la conservazione a lungo termine si consiglia di congelare i campioni in aliquote a -20°C or -80°C.

**Secrezione tracheale, BAL, espettorato:** i campioni contengono DNasi e RNasi, che possono causare rapidamente la degradazione di DNA e RNA. Pertanto, i campioni devono essere conservati congelati a – 80°C.

**Biopsie di tessuto:** i campioni devono essere congelati immediatamente e conservati a – 20°C or –80°C. Evitare un congelamento e uno scongelamento ripetuti. La quantità di DNA purificato dipende dal tipo di materiale di partenza. Scongelare il campione nella miscela di lisi.

**Surnatanti di colture cellulari:** preparare campioni di surnatanti come altri campioni di fluidi corporei privi di cellule descritti nel metodo di preparazione del campione corrispondente. Per la conservazione a lungo termine si consiglia di congelare i campioni in aliquote a -20°C or -80°C.

### **3.3 Preparazione del materiale di partenza**

Di seguito viene descritta la preparazione della lisi del campione per diversi materiali di partenza. Utilizzare provette Safe Lock da 2 ml per la preparazione del campione, poiché queste sono necessarie anche nella successiva fase di lisi.

Dopo la preparazione del materiale di partenza, far riferimento al capitolo 3.5 "Protocollo: isolamento simultaneo degli acidi nucleici totali (DNA e RNA) da tutti i campioni liquidi" per seguire il passaggio 1a) - d) del protocollo per continuare, salvo diversa indicazione.

#### **3.3.1 Siero, plasma, altri liquidi corporei privi di cellule**

Miscelare sempre per bene il campione prima dell'estrazione.

Utilizzare un campione per estrazione da 200 µl. Se il volume del campione è inferiore a 200 µl, regolare con PBS Buffer o DNase/RNase free water per un volume finale di 200 µl.

#### **3.3.2 Sangue**

Miscelare sempre per bene il campione prima dell'estrazione.

Diluire 100 µl di sangue fresco o congelato con 100 µl di DNase/RNase free water.

#### **3.3.3 Tamponi**

##### **a) Tamponi asciutti**

Sciacquare i tamponi in una fiala adatta nel volume più basso possibile di PBS o DNase/RNase free water (per tamponi nasofaringei circa 400 µl, per tamponi orali circa 600 µl). Premere il tampone sulla parete interna della fiala per ottenere quanto più campione possibile.

Utilizzare 200 µl della soluzione risciacquata per l'estrazione.

In alternativa, i tamponi possono essere risciacquati direttamente in una miscela di 200 µl di Lysis Buffer HLT, 20 µl di Proteinase K, 20 µl di Carrier DNA (opzionale per la preparazione del DNA genomico) e 200 µl di DNase/RNase free water. Incubare tamponi per 5-10 min a temperatura ambiente, mescolare di tanto in tanto. Accertarsi di evitare contaminazioni incrociate.

##### **b) Tamponi nel fluido stabilizzante**

Utilizzare 200 µl della soluzione stabilizzante per l'estrazione.

Alcuni fluidi stabilizzanti possono interferire con la reazione di lisi (per chiarimenti, far riferimento alle FAQ o rivolgersi al supporto di assistenza).

#### **3.3.4 Campioni di feci (surnatante)**

##### **a) Estrazione di acidi nucleici da virus**

Per preparare il surnatante, trasferire 100 µl / 100 mg di campione di feci in una fiala da 2 ml e aggiungere 900 µl di DNase/RNase free water. Agitare su vortex per 30 secondi, proseguire con una fase di centrifugazione di 1 minuto a 12.000 x g.

Trasferire 200 µl di surnatante in una fiala fresca per l'estrazione del campione. Evitare particelle solide nel campione.

### **b) Estrazione di DNA batterico**

Per preparare il surnatante, trasferire 100 µl / 100 mg di campione di feci in una fiala da 2 ml e aggiungere 300 µl di DNase/RNase free water. Agitare su vortex per 30 secondi, proseguire con una fase di centrifugazione di 30 s a 1.000 x g.

Trasferire 200 µl di surnatante in una fiala fresca per l'estrazione del campione. Evitare particelle solide nel campione.

### **3.3.5 Batteri coltivati**

Trasferire 1 ml di coltura batterica durante la notte in una provetta Safe Lock da 2,0 ml. Centrifugare per 2 min a 10.000 x g e rimuovere completamente il surnatante. Risospendere il pellet in 200 µl di PBS Buffer e avviare l'estrazione del campione.

### **3.3.6 Urina**

a seconda del titolo batterico e dell'applicazione si raccomanda un volume iniziale di 15-50 ml di urina. Centrifugare il campione per pellettizzare i batteri e rimuovere completamente il surnatante (le contaminazioni da urea possono inibire le reazioni della PCR). Risospendere il pellet di batteri in 200 µl di PBS Buffer.

Per alcune applicazioni è possibile utilizzare direttamente 200 µl di urina fresca.

### **3.3.7 Secrezione tracheale, BAL, espettorato**

#### **a) Campioni non viscosi o a bassa viscosità**

Miscelare sempre per bene il campione prima dell'estrazione.

Utilizzare un campione per estrazione da 200 µl. Se il volume del campione è inferiore a 200 µl, regolare con PBS Buffer o DNase/RNase free water per un volume finale di 200 µl.

#### **b) Isolamento di DNA batterico da campioni viscosi**

Trasferire 150 µl del campione di espettorato o 1 ml di secreto tracheale o BAL in una provetta Safe Lock e aggiungere rispettivamente 150 µl o 1 ml di soluzione satura di acetilcisteina (ACC) (con rapporto campione/tampone 1:1).

Incubare per 10 min a 95 °C agitando continuamente.

Centrifugare a 10.000 x g per 5 min. Eliminare il surnatante.

Risospendere il pellet batterico in 200 µl di PBS o DNase/RNase free water e procedere con l'estrazione del campione.

#### **c) Isolamento di DNA/RNA virali da campioni viscosi**

Trasferire 150 µl del campione in una provetta Safe Lock e aggiungere rispettivamente 150 µl o 1 ml di soluzione satura di acetilcisteina (ACC) (rapporto campione/tampone 1:1).

Incubare per 10 min a 95 °C agitando continuamente.

Far raffreddare il campione.

Utilizzare un campione per estrazione da 200 µl.

### **3.3.8 Biopsie di tessuto**

Trasferire 1 - 10 mg di campione di biopsia tissutale in una provetta Safe Lock da 2,0 ml e aggiungere 200 µl di DNase/RNase free water o PBS, 200 µl di Lysis Buffer HL, 20 µl di Carrier RNA (opzionale, per campioni di DNA/RNA bassi) e 20 µl di Proteinase K per ogni campione. Per la rottura di tessuti difficili da lisare, come cartilagine, reni e muscolo cardiaco, si consiglia il bead beating con sfere di Zirconia (disponibili separatamente).

Dopo il trattamento meccanico, incubare per 10 min a 65 °C agitando continuamente.

Incubare per 10 min a 95 °C agitando continuamente.

Centrifugare per 1 minuto a 10.000 x g e trasferire il surnatante ad un nuovo tubo.

Continuare con il protocollo di estrazione al passaggio 2, aggiungendo la Binding solution.

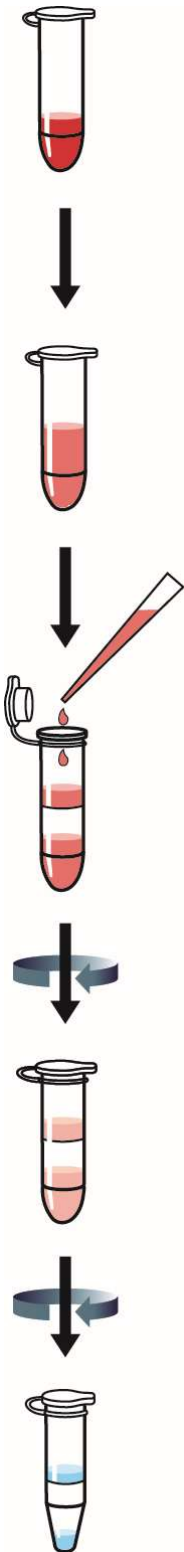
### **3.3.9 Surnatanti di colture cellulari**

Utilizzare un campione per estrazione da 200 µl.

### 3.4 Protocollo breve Invisorb® Spin Universal Kit

#### Campioni di lisi

Far riferimento al capitolo 3.3 "Preparazione del materiale di partenza" per il pretrattamento specifico del campione.



#### **1.a) Purificazione degli acidi nucleici batterici**

Miscelare un campione di 200 µl\* con 20 µl di Lysozyme in una provetta Safe Lock da 2,0 ml  
Incubare 10 min a 37 °C  
Aggiungere 20 µl di Carrier RNA, 200 µl di **Lysis Buffer HLT** e 20 µl di **Proteinase K**  
Incubare per 15 min a 65 °C agitando.

#### **1.b) Isolamento simultaneo di acidi nucleici batterici e virali**

Miscelare un campione di 200 µl\* con 20 µl di Lysozyme in una provetta Safe Lock da 2,0 ml  
Incubare per 10 min a temperatura ambiente  
Aggiungere 20 µl di Carrier RNA, 200 µl di **Lysis Buffer HLT** e 20 µl di **Proteinase K**  
Incubare per 10 min a 65 °C agitando.  
Incubare per 10 min a 95°C agitando.

#### **1.c) Purificazione degli acidi nucleici virali**

Miscelare un campione di 200 µl di **Lysis Buffer HLT**, 20 µl di **Carrier RNA** e 20 µl di **Proteinase K** in un Safe Lock da 2,0 ml  
Incubare per 10 min a 65 °C agitando.  
Incubare per 10 min a 95°C agitando.

#### **1.d) Purificazione del DNA genomico**

Miscelare un campione\* di 200 µl di **Lysis Buffer HLT**, 20 µl di **Proteinase K** in un Safe Lock da 2,0 ml  
Incubare per 10 min a 65 °C agitando.  
Incubare per 10 min a 95 °C agitando (da saltare nel caso di campioni di sangue)

\*Se il volume del campione è inferiore a 200 µl, regolare con PBS o DNase/RNase free water

#### **Legare gli acidi nucleici**

2. Aggiungere 260 µl di **Binding Solution**, miscelare pipettando su e giù o agitando su vortex.  
Incubare per 5 min a temperatura ambiente  
Trasferire il campione nel set di RTA Spin Filter  
Centrifugare per 1 min a 11.000 x g  
Eliminare l'RTA Receiver Tube con il filtrato e posizionare l'RTA Spin Filter in un nuovo RTA Receiver Tube.

#### **Lavare per rimuovere le contaminazioni residue**

- c) Aggiungere 600 µl di **Wash Buffer HLT**, centrifugare 1 min a 11.000 x g  
Eliminare l'RTA Receiver Tube con il filtrato e posizionare l'RTA Spin Filter in un nuovo RTA Receiver Tube.
- d) Aggiungere 700 µl di **Wash Buffer**, centrifugare 1 min a 11.000 x g  
Eliminare il filtrato e riposizionare l'RTA Spin Filter nell'RTA Receiver Tube.
- e) Ripetere questa fase di lavaggio una volta
- f) Centrifugare 5 min a velocità max. per rimuovere l'etanolo residuo  
Eliminare l'RTA Receiver Tube con il filtrato

#### **Eluire gli acidi nucleici**

- g) Posizionare lo Spin Filter nel Receiver Tube da 1,5 ml  
Aggiungere 50-200 µl di **Elution Buffer M** (preriscaldato a 65 °C) direttamente all'RTA Spin Filter.  
Incubare 1 min a temperatura ambiente e centrifugare 1 min a 11.000 x g  
Eliminare l'RTA Spin Filter e conservare gli acidi nucleici eluiti con ghiaccio

### **3.5 Protocollo: isolamento simultaneo degli acidi nucleici totali (DNA e RNA) da tutti i campioni liquidi**

Fare riferimento al capitolo 3.3 "Preparazione del materiale di partenza" per il pretrattamento specifico del campione.

---

#### **1.a) Lisi del campione per la purificazione degli acidi nucleici batterici**

Miscelare un campione di 200 µl o pellet batterico risospeso con 20 ml di Lysozyme in una provetta Safe Lock da 2 ml.

Incubare 10 min a 37 °C

Aggiungere 20 µl di Carrier RNA. Mescolare agitando su vortex.

Aggiungere 20 µl di **Lysis Buffer HLT** e 20 µl di **Proteinase K**.

In alternativa, aggiungere 240 µl di Master Mix ad ogni campione.

Mescolare accuratamente 10 sec. agitando su vortex e incubare per 10-15 min a 65 °C agitando continuamente.

Opzionale per batteri difficili da lisare come i micobatteri: incubare per 10 min a 95 °C

#### **1.b) Lisi del campione per isolamento simultaneo di acidi nucleici batterici e virali**

Miscelare un campione di 200 µl con 20 µl di Lysozyme in una provetta Safe Lock da 2 ml.

Incubare per 10 min a temperatura ambiente.

Aggiungere 20 µl di Carrier RNA. Mescolare agitando su vortex.

Aggiungere 20 µl di **Lysis Buffer HLT** e 20 µl di **Proteinase K**.

In alternativa, aggiungere 240 µl di Master Mix ad ogni campione.

Mescolare accuratamente 10 sec. agitando su vortex e incubare per 10 min a 65 °C agitando continuamente.

Incubare per 10 min a 95 °C agitando continuamente.

#### **1.c) Lisi del campione per la purificazione degli acidi nucleici virali**

Miscelare un campione di 200 µl di **Lysis Buffer HLT**, 20 µl di **Carrier RNA** e 20 µl di **Proteinase K** in una provetta Safe Lock da 2 ml.

In alternativa, aggiungere 240 µl di Master Mix ad ogni campione.

Mescolare accuratamente 10 sec. agitando su vortex e incubare per 10-15 min a 65 °C agitando continuamente.

Incubare 10 min a 95°C

#### **1.d) Lisi del campione per la purificazione del DNA genomico**

Miscelare un campione di 200 µl di **Lysis Buffer HLT**, 20 µl di **Proteinase K** in una provetta Safe Lock da 2 ml.

In alternativa, aggiungere 240 µl di Master Mix ad ogni campione.

Mescolare accuratamente 10 sec. agitando su vortex e incubare per 10-15 min a 65 °C agitando continuamente.

Incubare 10 min a 95 °C (saltare per l'isolamento del DNA genomico da campioni di sangue diluito)

***Nota:*** Se si desidera aggiungere acidi nucleici per il controllo dell'estrazione, farlo ora, prima della fase di legamento.



2. Aggiungere 260 µl di **Binding Solution**, miscelare completamente pipettando su e giù o agitando su vortex.  
Incubare il campione a temperatura ambiente per 5 minuti.  
Prendere un set di RTA Spin Filter. Trasferire la miscela nel set dell'RTA Spin Filter  
Centrifugare per 1 min a 11.000 x g  
Eliminare l'RTA Receiver Tube con il filtrato e posizionare l'RTA Spin Filter in un nuovo RTA Receiver Tube.
3. Aggiungere 600 µl di **Wash Buffer HLT** all'RTA Spin Filter e centrifugare 1 min a 11.000 x g.  
Eliminare l'RTA Receiver Tube con il filtrato e posizionare l'RTA Spin Filter in un nuovo RTA Receiver Tube.
4. Aggiungere 700 µl di **Wash Buffer** all'RTA Spin Filter e centrifugare 1 min a 11.000 x g.  
Eliminare il filtrato e riposizionare l'RTA Spin Filter nell'RTA Receiver Tube usato.
5. Aggiungere 700 µl di **Wash Buffer** all'RTA Spin Filter e centrifugare 1 min a 11.000 x g.  
Eliminare il filtrato e riposizionare l'RTA Spin Filter nell'RTA Receiver Tube usato.
6. Centrifugare per 5 min a 11.000 x g e rimuovere completamente l'etanolo.  
Eliminare l'RTA Receiver Tube con il filtrato.
7. Posizionare l'RTA Spin Filter in un Elution Tube da 1,5 ml.  
Aggiungere 50 - 200 µl di **Elution Buffer M** preriscaldata (65°C) direttamente sulla superficie dell'RTA Spin Filter.  
Incubare a temperatura ambiente per 1 min.  
Centrifugare a 11.000 x g per 1 minuto.  
Eliminare l'RTA Spin Filter.  
Chiudere il Receiver Tube da 1,5 ml e conservare il campione da -20 °C a -80°C.

## 4. Appendice

### 4.1 Risoluzione di problemi

Problema	Causa possibile	Raccomandazione
<b>Quantità ridotta degli acidi nucleici</b>	Lisi cellulare insufficiente	Aumentare il tempo di lisi con <b>Lysis Buffer HLT</b> L'agitazione continua migliora l'efficienza della lisi Ridurre la quantità di materiale di partenza per evitare un sovraccarico della colonna
	Eluizione incompleta	Aumentare il tempo di incubazione con <b>Elution Buffer M</b> preriscaldato a 5-10 min Eluire due volte con 100 µl di <b>Elution Buffer M</b> Impiegare un volume maggiore di <b>Elution Buffer M</b>
	Bassa concentrazione di acido nucleico nel campione	Eluire gli acidi nucleici con un volume inferiore di Elution Buffer M, non usare volumi inferiori a 30 µl
	Conservazione errata del materiale di partenza	Assicurarsi che il materiale di partenza sia conservato in modo consono. Evitare ripetuti cicli di scongelamento del materiale campione.
	I Wash Buffer sono stati preparati in modo scorretto	Accertarsi che la quantità corretta di etanolo/isopropanolo sia aggiunta ai Wash Buffer e che tutte le soluzioni siano conservate ben chiuse.
	Volume/concentrazione di Proteinase K troppo basso	Accertarsi che il Proteinase K liofilizzato sia risospeso con il volume d'acqua appropriato prima dell'uso
<b>Acidi nucleici degradati</b>	Conservazione errata del materiale di partenza	Accertarsi che il campione sia prelevato e conservato correttamente, far riferimento alla sezione FAQ sul nostro sito web per maggiori informazioni
	Materiale vecchio	Assicurarsi che il materiale di partenza sia conservato in condizioni adeguate (-20°C/-80°C).
<b>Gli acidi nucleici non funzionano bene nelle applicazioni a valle (ad es. PCR in tempo reale o NGS)</b>	Etanolo residuo durante l'eluizione	Aumentare il tempo di asciugatura per la rimozione dell'etanolo.
	Riporto di sale durante l'eluizione	Controllare eventuali precipitati di sale nei Wash Buffer. Se sono visibili dei precipitati, scioglierli riscaldandoli accuratamente fino a 30 °C Accertarsi che i <b>Wash Buffer</b> siano a temperatura ambiente prima dell'uso.
<b>Residui colorati sull'RTA Spin filter dopo il lavaggio</b>	Lisi cellulare insufficiente	Vedi sopra
	Lavaggio inefficiente	Lavare di nuovo con <b>Wash Buffer</b>
	I Wash Buffer sono stati preparati in modo scorretto	Vedi sopra

## 4.2 Garanzia











Invitek Molecular garantisce il perfetto funzionamento del kit per le applicazioni descritte nel presente manuale e in conformità all'uso previsto. In conformità al sistema di gestione della qualità a norma EN ISO 13485 di Invitek Molecular, la prestazione di tutti i componenti del kit è stata testata per assicurare la qualità del prodotto.

Qualsiasi problema, incidente o difetto sarà riportato a Invitek Molecular subito dopo il rilevamento. Ispezionare il prodotto al ricevimento dello stesso per garantirne la completezza e l'integrità. In presenza di discrepanze, informare subito Invitek Molecular per iscritto. La garanzia non copre eventuali modifiche al kit e ai protocolli né un uso diverso da quello previsto.

Invitek Molecular si riserva il diritto di modificare, alterare o cambiare qualsiasi prodotto per migliorarne la prestazione e il design in qualsiasi momento.

Invitek Molecular garantisce i prodotti come stabilito nelle Condizioni Generali disponibili all'indirizzo [www.invitek-molecular.com](http://www.invitek-molecular.com). Per eventuali domande contattare [techsupport@invitek-molecular.com](mailto:techsupport@invitek-molecular.com).

## 4.3 Simboli utilizzati su prodotto e etichettatura

	Produttore
	Numero di lotto
	Identificatore univoco del dispositivo medico
	Numero di catalogo
	Data di scadenza
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Limitazione della temperatura
	Non riutilizzare
	Quantità di preparati per campioni
	dispositivo medico diagnostico in vitro

## 4.4 Ulteriori documenti e informazioni aggiuntive

Visitare [www.invitek-molecular.com](http://www.invitek-molecular.com) per ulteriori informazioni su:

- FAQ e suggerimenti per la risoluzione di problemi
- Manuali in varie lingue
- Schede dati di sicurezza (MSDS)
- Supporto web
- Video prodotti

Se, nonostante un attento studio delle istruzioni per l'uso e ulteriori informazioni, si avesse ancora bisogno di assistenza, scrivere all'indirizzo [techsupport@invitek-molecular.com](mailto:techsupport@invitek-molecular.com) o contattare il proprio rivenditore.

## 4.5 Informazioni sull'ordine

<b>Prodotto</b>	<b>Dimensione della confezione</b>	<b>N. catalogo</b>
Invisorb® Spin Universal Kit	50 preparazioni	1050100200
Invisorb® Spin Universal Kit	250 preparazioni	1050100300

Cronologia delle revisioni

<b>Revisione</b>	<b>Data</b>	<b>Descrizione</b>
IT-v1-2022	2022-05-18	Nuovo documento

# **INVITEK** Molecular

Invitek Molecular GmbH  
Robert-Rössle-Str. 10  
13125 Berlin  
Germania

Telefono: +49 30 9489 2908  
Fax: +49 30 9489 3795  
info@invitek-molecular.com

[www.invitek-molecular.com](http://www.invitek-molecular.com)



<https://www.invitek-molecular.com/resources/manuals.html>

2022-05-18 IT-v1-2022