

Gebrauchsanleitung RTP® Pathogen Kit



CE IVD

REF 1040500200
1040500300



50 Präparationen
250 Präparationen



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

INVITEK
Molecular

Wichtige Hinweise

Vielen Dank, dass Sie sich für das **RTP® Pathogen Kit** von Invitek Molecular entschieden haben.

Zweck des Produkts ist die manuelle Isolierung von Nukleinsäuren (bakterielle DNS, virale DNS/RNS) aus unterschiedlichsten klinischen Proben mithilfe einer spinsäulenbasierten Technologie.

WARNUNG! Unsachgemäße Handhabung und nicht bestimmungsgemäßer Gebrauch können gefährlich sein und zu Schäden führen. Wir bitten Sie daher, diese Gebrauchsanleitung sorgfältig zu lesen und zu befolgen. Sie sollte immer griffbereit sein. Zur Vermeidung von Personenschäden beachten Sie bitte auch die Sicherheitshinweise.

Alle Versionen dieser Gebrauchsanleitung stehen auf unserer Website zum Download zur Verfügung oder können dort bestellt werden: www.invitek-molecular.com

Kontakt:

Invitek Molecular GmbH

Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlin

+ 49 30 9489 2908

www.invitek-molecular.com

Technischer Kundendienst:

techsupport@invitek-molecular.com

© 2022 Invitek Molecular, alle Rechte vorbehalten.

Dieses Kit entspricht der VERORDNUNG (EU) 2017/746 über In-vitro-Diagnostika. In Ländern, in denen VERORDNUNG (EU) 2017/746 über In-vitro-Diagnostika nicht anerkannt ist, ist das Kit nicht für die In-vitro-Diagnostik vorgesehen.

Handelsmarken: Invisorb®, PSP®, InviMag®, Eppendorf®. Die in diesem Dokument verwendeten eingetragenen Marken, Handelsmarken usw. gelten als gesetzlich geschützt, und zwar auch dort, wo sie nicht entsprechend gekennzeichnet sind.

InviGenius®, InviMag®, Invisorb®, Invitek®, InviTrap®, MSB®, PSP® und RTP® sind eingetragene Handelsmarken der Invitek Molecular GmbH.

Inhaltsverzeichnis

1.	Sicherheitshinweise	3
2.	Produktinformation.....	4
2.1	Kitinhalt.....	4
2.2	Vom Anwender bereitzustellende Reagenzien und Geräte	5
2.3	Lagerung, Aussehen und Haltbarkeit	5
2.4	Zweckbestimmung.....	6
2.5	Produktinformationen und -spezifikation	6
2.6	Prinzip und Ablauf.....	7
3.	Nukleinsäureextraktion mit dem RTP® Pathogen Kit.....	8
3.1	Vor Beginn eines Protokolls	8
3.2	Probengewinnung und Lagerung des Ausgangsmaterials	9
3.3	Vorbereitung des Ausgangsmaterials	10
3.3.1	Serum, Plasma und sonstige zellfreie Flüssigkeiten	10
3.3.2	Abstriche	10
3.3.3	Stuhlproben (Überstand)	11
3.3.4	Bakterienkulturen	11
3.3.5	Urin	11
3.3.6	Trachealsekret, BAL, Sputum.....	11
3.3.7	Gewebebiopsie	12
3.3.8	Zellkulturüberstände.....	12
3.4	Kurzprotokoll RTP® Pathogen Kit.....	13
3.5	Protokoll: Gleichzeitige Isolierung von bakterieller DNS und viraler DNS/RNS aus Flüssigkeitsproben	14
4.	Anhang	15
4.1	Problembhebung	15
4.2	Garantie.....	16
4.3	Symbole auf Produkt und Etiketten	16
4.4	Weitere Dokumente und Informationen.....	17
4.5	Bestellinformation	17

1. Sicherheitshinweise

Stellen Sie sicher, dass alle Nutzer dieses Produkts mit den allgemeinen Sicherheitspraktiken für Labore und den Sicherheitshinweisen in diesem Dokument vertraut sind.

- Tragen Sie bei und während der Arbeit mit Chemikalien stets Schutzkleidung, Einweghandschuhe und eine Schutzbrille.
- Wechseln Sie nach jedem Flüssigkeitstransfer die Pipettenspitze. Zur Vermeidung einer Kreuzkontamination empfehlen wir die Verwendung von Pipettenspitzen mit Aerosolbarriere.
- Einwegmaterialien nicht wiederverwenden.
- Kontaminierte Handschuhe entsorgen.
- Nicht die Bestandteile verschiedener Kits miteinander kombinieren, es sei denn, die Chargennummern sind identisch.
- Mikrobielle Kontamination der Kit-Reagenzien vermeiden.
- Um das Risiko einer Infektion durch potenziell infektiöses Material möglichst gering zu halten, empfehlen wir, unter einem laminaren Luftstrom zu arbeiten, bis die Proben lysiert sind.

Lesen und verstehen Sie alle zugehörigen Sicherheitsdatenblätter (MSDS), bevor Sie mit Chemikalien arbeiten; diese sind online auf www.invitek-molecular.com verfügbar.

Entsorgen Sie Kit- und Flüssigkeitsreste gemäß den Bestimmungen Ihres Landes (s. MSDS). Invitek Molecular hat die durch das Kit anfallenden Flüssigkeitsabfälle nicht auf infektiöses Restmaterial getestet. Eine Kontaminierung der Flüssigkeitsabfälle mit infektiösem Restmaterial ist sehr unwahrscheinlich, lässt sich aber nicht völlig ausschließen. Daher sind Flüssigkeitsabfälle als infektiös zu betrachten und gemäß den vor Ort geltenden Bestimmungen zu handhaben und entsorgen.

Die für die Bestandteile des **RTP® Pathogen Kit** geltenden Sicherheitssätze der Europäischen Union sind:

Extraction Tube



Warnung

H302-H315-H319-H335-H411-P280-
P305+P351+P338-EUH208

Wash Buffer R1



Warnung

H302-H332-H412-P280-P305+P351
+P338-EUH032

H302: Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.

H315: Verursacht Hautreizungen.

H319: Verursacht schwere Augenreizung.

H332: Gesundheitsschädlich bei Einatmen.

H335: Kann die Atemwege reizen.

H411: Giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.

H412: Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.

P280: Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung/Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen.

P305+P351+P338: BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.

EUH208: Enthält Tritirachium-album Serin_Proteinase. Kann allergische Reaktionen hervorrufen.

EUH032: Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.

Notfallmedizinische Informationen sind rund um die Uhr verfügbar über www.infotrac.net:

außerhalb der USA: 1 – 352 – 323 – 3500
innerhalb der USA: 1 – 800 – 535 – 5053

2. Produktinformation

2.1 Kitinhalt

	50 Präparationen	250 Präparationen
Katalognr.	1040500200	1040500300
Extraction Tube	50 Gefäße	5 x 50 Gefäße
Resuspension Buffer R	30 ml/Flasche	150 ml/Flasche
Binding Solution (mit 99,7 % Isopropanol) auffüllen)	leere Flasche (Endvolumen 30 ml)	leere Flasche (Endvolumen 120 ml)
Wash Buffer R1	20 ml/Flasche	80 ml/Flasche
Wash Buffer R2	12 ml/Flasche (Endvolumen 60 ml)	50 ml/Flasche (Endvolumen 250 ml)
Elution Buffer R	15 ml/Flasche	60 ml/Flasche
RTA Spin Filter Set	50 Sets	5 x 50 Sets
RTA Receiver Tubes	3 x 50 Stück	15 x 50 Stück
1.5 ml Receiver Tubes	50 Stück	5 x 50 Stück
Short Protocol	1 Blatt	1 Blatt

2.2 Vom Anwender bereitzustellende Reagenzien und Geräte

Laborgeräte:

- Mikrozentrifuge (*alle Protokolle wurden mit einer Zentrifuge Eppendorf 5415 D validiert*)
- Optional: Zentrifuge für 15 oder 50 ml
- Thermoschüttler (37 °C - 95 °C)
- Messzylinder (250 ml)
- Einweghandschuhe
- Pipette und Pipettenspitzen
- Vortex mixer
- Reaktionsröhrchen (1,5 ml, 2,0 ml)

Flüssigkeiten und Lösungsmittel:

- 1 x PBS zur Einstellung des Probenvolumens
- 96 - 100 % Ethanol (nicht denaturiert)
- Isopropanol*
- Optional (für hochviskose Atemwegsproben): gesättigte Acetylcysteinlösung (ACC) (200 mg/ml)

*Das Kit wurde mit 2-Propanol; Rotipuran® >99,7 %, p.a., ACS, ISO (Bestellnr. 6752) von Carl Roth validiert

* **Mögliche Anbieter von Isopropanol:**

Carl Roth
2-Propanol
Rotipuran® >99,7 %, p.a., ACS, ISO
Bestellnr. 6752

Applichem
2-Propanol für die Molekularbiologie
Bestellnr. A3928

Sigma
2-Propanol
Bestellnr. 59304-1L-F

2.3 Lagerung, Aussehen und Haltbarkeit

Haltbarkeit: Alle Puffer und Kitbestandteile sollten bei Raumtemperatur gelagert werden; die Haltbarkeit ist dem Etikett auf der äußeren Verpackung zu entnehmen.

Nach dem Öffnen haben die einzelnen Kitbestandteile und die vor Erstgebrauch entsprechend vorbereiteten Komponenten eine Haltbarkeit von 3 Monaten.

Stellen Sie vor jedem Gebrauch sicher, dass alle Bestandteile Raumtemperatur haben. Sollten sich in den Lösungen temperaturbedingt Präzipitate gebildet haben, lösen Sie diese durch vorsichtiges Erwärmen auf 30 °C auf.

Raumtemperatur (RT) ist definiert als der Temperaturbereich von 15 bis 30 °C.

Wash Buffer R1 und Wash Buffer R2: Nach Zugabe von Ethanol fest verschließen und bei Raumtemperatur lagern.

Binding Solution: Nach Zugabe von Isopropanol fest verschließen und bei Raumtemperatur lagern.

2.4 Zweckbestimmung

Das **RTP® Pathogen Kit** ist ein Kit zur Nukleinsäureextraktion auf Grundlage einer Spinsäulenteknologie. Sein Zweck ist die gleichzeitige Isolierung und Aufreinigung bakterieller DNS und viraler DNS/RNS.

Das Kit kann für eine Vielzahl menschlicher Probenarten verwendet werden, wie z. B. Serum und Plasma (aus EDTA- oder Citrat-stabilisiertem Blut, jedoch nicht aus Heparin), Abstricheluate, vorbehandeltes Sputum, BAL, Trachealsekret und Stuhlsuspensionsüberstände, Zellkulturüberstände, Biopsien/Gewebe, Urin und andere zellfreie Körperflüssigkeiten.

Das Produkt ist nicht für die Verwendung mit heparinisierten Blutproben vorgesehen. Das Produkt ist nur für die Benutzung durch ausgebildetes Personal wie Labortechniker, Ärzte und Biologen vorgesehen, die in molekularbiologischen Techniken und *In-vitro*-Diagnoseverfahren geschult sind.

2.5 Produktinformationen und -spezifikation

Ausgangsmaterial	Ausbeute	Qualität	Zeit
<ul style="list-style-type: none">• Serum, Plasma, sonstige zellfreie Flüssigkeiten, Urin• Abstriche (trocken, stabilisiert)• Stuhlsuspensionsüberstände• Bakterienkulturen• Trachealsekret, BAL, Sputum• Zellkulturüberstand <p>Bis zu 10 mg Gewebeprobe</p>	Abhängig von Blutprobe (Lagerung und Quelle)	Abhängig von Probenart u. Zielnukleinsäuren	ca. 20 min (ohne Lyse)

Ausbeute und Qualität der aufgereinigten Nukleinsäuren hängen von Art, Herkunft, Transport, Lagerung, Alter und Virustiter der Probe ab.

Das Kit eignet sich nur für Plasma- und Serumproben mit EDTA oder Zitrat, nicht aber Heparin als Gerinnungshemmer.

Bei der Ermittlung der Ausbeute beachten Sie bitte, dass die mit diesem Kit gereinigte Nukleinsäure Carrier-RNA (5 µg pro 200 µl Probe) enthält, die den größten Teil, der im Eluat vorliegenden Nukleinsäuren ausmacht. Insbesondere virale Nukleinsäuren aus biologischen Proben haben meist eine sehr niedrige Konzentration und können daher nicht fotometrisch quantifiziert werden. Zur Bestimmung der Ausbeute wird eine quantitative RT-PCR empfohlen.

Das **RTP® Pathogen Kit** bietet ein effizientes Verfahren zur Präparation hochwertiger Nukleinsäuren. Das Kit ist für die gleichzeitige Isolierung viraler DNS/RNS oder bakterieller DNS auf Grundlage eines Spinsäulenprotokolls nach dem Lyse-Binden-Waschen-Prinzip konzipiert.

Nachgelagerte Anwendungen:

Ausbeute und Qualität isolierter Nucleinsäuren sind für zahlreiche molekular diagnostische Anwendungen wie PCR-Techniken, NGS und Hybridisierungsmethoden generell geeignet. Bei nachgelagerten Anwendungen sollten die Anweisung des jeweiligen Herstellers beachtet werden.

2.6 Prinzip und Ablauf

1. Proben lysieren

Das Kit enthält Extraction Tubes mit einer lyophilisierten Mischung aus Carrier-RNA, Proteinase K, lytischen Enzymen und Lysepuffer für eine einstufige Lyse. Zum Start der Extraktion muss lediglich die Probe in das Extraction Tube gegeben werden.

Die Proben werden bei verschiedenen erhöhten Temperaturen unter kontinuierlichem Schütteln lysiert.

2. Nucleinsäuren binden

Durch Zugabe der Binding Solution zum Lysat werden optimale Bedingungen für die Bindung erhalten. Die Lysate werden sodann auf einen RTA Spin Filter gegeben, wo die Nucleinsäuren an die Membran adsorbieren.

3. Waschen zur Entfernung von Restverunreinigungen

Verunreinigungen werden mit Wash Buffer R1 und Wash Buffer R2 effektiv entfernt, während die Nucleinsäuren an die Membran gebunden bleiben.

4. Nucleinsäuren eluieren

Die Nucleinsäuren werden mit 60 - 200 µl Elution Buffer R vom RTA Spin Filter eluiert.

3. Nukleinsäureextraktion mit dem RTP® Pathogen Kit

3.1 Vor Beginn eines Protokolls

Wenn Sie zum ersten Mal mit dem Kit arbeiten, achten Sie darauf, dass alle Puffer und Reagenzien wie dargestellt angesetzt wurden:

Ansetzen der Puffer vor Erstgebrauch: 50 Ansätze
Binding Solution (leere Flasche): 30 ml 99,7 % Isopropanol (molekularbiologische Qualität) in Flasche füllen; Flasche immer gut verschlossen halten.
Wash Buffer R1: 20 ml 99,7 % Isopropanol in die Flasche füllen. Gründlich mischen; Flasche immer gut verschlossen halten.
Wash Buffer R2: 48 ml 96 - 100 % Isopropanol in die Flasche füllen. Gründlich mischen; Flasche immer gut verschlossen halten.
Ansetzen der Puffer vor Erstgebrauch: 250 Ansätze
Binding Solution (leere Flasche): 120 ml 99,7 % Isopropanol (molekularbiologische Qualität) in Flasche füllen; Flasche immer gut verschlossen halten.
Wash Buffer R1: 80 ml 99,7 % Isopropanol in die Flasche füllen. Gründlich mischen; Flasche immer gut verschlossen halten.
Wash Buffer R2: 200 ml 96 - 100 % Isopropanol in die Flasche füllen. Gründlich mischen; Flasche immer gut verschlossen halten.

- Thermoschüttler auf 37 °C einstellen.
- Thermoschüttler/Heizblöcke auf 65 °C und 95 °C einstellen.
- Benötigtes Volumen **Elution Buffer R** auf 65 °C aufwärmen (pro Probe sind 60 - 200 µl **Elution Buffer R** erforderlich).
- Anzahl der benötigten Ansätze einschließlich Kontrollen bestimmen und die erforderliche Zahl RTA Spin Filter (Deckel) und 1.5 ml Receiver Tubes (pro Probe wird 1 Receiver Tube benötigt) beschriften.

Extraktionskontrolle

Gehen Sie bei der Bestimmung der optimalen Menge für die Extraktionskontrolle für Ihre nachgeschalteten Anwendungen nach Herstelleranweisungen vor.

DNS bzw. RNS zur Extraktionskontrolle ist dem Lysat nach dem Heizschritt zuzugeben. Um optimale Ergebnisse zu erhalten, sollten die Moleküle der Extraktionskontrolle länger als 100 Nukleotide sein, da kleinere Moleküle nicht effektiv isoliert werden.

3.2 Probengewinnung und Lagerung des Ausgangsmaterials

Zur Gewährleistung einer hohen und reproduzierbaren Ausbeute ist die richtige Lagerung der Proben von entscheidender Bedeutung. Die Ausbeute hängt von Faktoren wie Gesundheit des Spenders, Alter, Art, Transport und Lagerung der Probe ab.

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben sollte unterbleiben, um einer Degradation der Nukleinsäuren vorzubeugen. Die besten Ergebnisse lassen sich im Allgemeinen mit frischen Proben erzielen. Es wird empfohlen, technische Richtlinien wie CEN/TS und ISO-Normen zum Voruntersuchungsprozess in der Molekulardiagnostik unter IVDR (G. Dagher et al., <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.05.002>) zu berücksichtigen.

Serum, Plasma und sonstige zellfreie Flüssigkeiten Zur Extraktion kann aus (mit Gerinnungshemmern wie EDTA oder Zitrat, nicht aber mit Heparin behandeltem) venösem Vollblut gewonnenes Serum oder Plasma, Synovialflüssigkeitsproben oder sonstige zellfreie Flüssigkeiten herangezogen werden. Vollblut sollte zur Vermeidung einer Hämolyse nicht gevortext werden. Serumröhrchen vor dem Zentrifugieren mindestens 30 min lang stehen lassen. Zur Präparation von Serum bzw. Plasma nach den Anweisungen für das Blutgewinnungssystem vorgehen. Es wird empfohlen, Plasma/Serum innerhalb von 12 h durch Zentrifugieren abzutrennen. Überstände, die mit Systemen ohne Gelseparator gewonnen wurden, sollten in frische Probenröhrchen überführt werden. Zur kurzfristigen Lagerung können die Proben 1 bis 2 Stunden lang auf Eis belassen werden. Die Proben können bis zu 24 h bei -20 °C gelagert werden. Für die langfristige Lagerung empfiehlt es sich, die Proben bei -80 °C einzufrieren. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen kann die Integrität der Proben beeinträchtigen und z. B. zur Denaturierung/Ausfällung von Proteinen führen, was wiederum Ausbeute, Qualität oder Virustiter beeinflussen kann. Außerdem können problematische Kryopräzipitate entstehen. Ist Kryopräzipitat erkennbar, 3 min bei 6.8000 x g zentrifugieren. Der klare Überstand sollte unverzüglich weiterverwendet werden.

Abstriche:

Trockenabstriche: Proben wie in der entsprechenden Probenverarbeitungsmethode beschrieben verarbeiten. Trocken bei 4 bis 8 °C lagern.

Abstriche in Stabilisierungsmedium: Die Stabilisierungsflüssigkeit kann wie eine zellfreie Körperflüssigkeit gehandhabt werden. Bitte beachten Sie, dass manche Stabilisierer wegen Inkompatibilität mit den Chemikalien im Kit zu einem Verlust an Ausbeute führen können. Gemäß Herstelleranweisungen lagern.

Stuhlproben: Die Proben enthalten DNase und RNase, die zu einer raschen Degradation von DNS und RNS führen können. Aus diesem Grund sollten sie bei -80 °C eingefroren werden.

Bakterienkulturen: Nach der Kultivierung müssen die Bakterien pelletiert und wie in der entsprechenden Probenaufbereitungsmethode beschrieben resuspendiert werden.

Urin: Je nach bakteriellem Titer und Anwendung wird ein Ausgangsvolumen von 15 bis 50 ml Urin empfohlen. Bakterien durch Zentrifugieren pelletieren und Überstand vollständig entfernen (eine Kontamination mit Harnstoff kann PCR-Reaktionen inhibieren). Bei manchen Anwendungen kann direkt frischer Urin eingesetzt werden.

Trachealsekret / BAL / Sputum: Die Proben enthalten DNase und RNase, die zu einer raschen Degradation von DNS und RNS führen können. Aus diesem Grund sollten sie bei -80 °C eingefroren werden.

Gewebebiopsie: Die Proben sind unverzüglich bei -20 °C oder -80 °C einzufrieren. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden. Die Ausbeute an aufgereinigter DNS hängt von der Art des Ausgangsmaterials ab. Probe im Lysemix auftauen.

Zellkulturüberstände: Bei der Herstellung von Überstandproben wie bei anderen Proben zellfreier Körperflüssigkeiten vorgehen, die unter der jeweiligen Probenverarbeitungsmethode beschrieben werden.

3.3 Vorbereitung des Ausgangsmaterials

Das Vorgehen bei der Vorbereitung der Probenlyse bei verschiedenen Ausgangsmaterialien wird im Folgenden beschrieben.

Nach Verarbeitung des Ausgangsmaterials fahren Sie wie in Kapitel 3.5 "Protokoll: Gleichzeitige Isolierung von bakterieller DNS und viraler DNS/RNS aus Flüssigkeitsproben", Schritt 1a) oder 1b) beschrieben fort, soweit nicht anders angegeben.

3.3.1 Serum, Plasma und sonstige zellfreie Flüssigkeiten

Probe vor der Extraktion stets gut durchmischen.

Bis zu 200 µl Probe einsetzen und Volumen mit Resuspension Buffer R auf 400 µl einstellen.

3.3.2 Abstriche

a) Trockenabstriche

Abstriche in einem geeigneten Gefäß in der geringstmöglichen Menge PBS oder Resuspension Buffer R auswaschen (bei Nasenrachenabstrichen ca. 400 µl, bei Mundabstrichen ca. 600 µl). Abstrich an der Gefäßinnenwand absteifen, um ein möglichst großes Probenvolumen zu erhalten.

Für das Extraktionsprotokoll 400 µl einsetzen.

Alternativ 400 µl Resuspension Buffer R in das Extraction Tube pipettieren und Abstrich direkt im aufgelösten Lysepuffer spülen.

b) Abstriche in Stabilisierungsflüssigkeit

200 µl der Stabilisierungslösung einsetzen und Volumen mit Resuspension Buffer R auf insgesamt 400 µl einstellen. Abstrich spülen und vor Entfernen an der Gefäßinnenwand abstreifen.

Manche Stabilisierungsmedien können die Lysereaktion stören (bei Fragen lesen Sie bitte den Abschnitt FAQ oder wenden Sie sich an den Kundendienst).

3.3.3 Stuhlproben (Überstand)

a) Nukleinsäureextraktion aus Viren

Zur Herstellung von Überstand 100 µl / 100 mg Stuhlprobe in ein 2-ml-Reaktionsgefäß geben und 900 µl Resuspension Buffer R hinzufügen. 30 s vortexen und 1 min bei 12.000 x g zentrifugieren. Bis zu 200 µl Probe einsetzen und Volumen mit Resuspension Buffer R auf 400 µl einstellen. Feste Partikel aus der Probe vermeiden.

b) Extraktion bakterieller DNS

Zur Herstellung von Überstand 100 µl / 100 mg Stuhlprobe in ein 2-ml-Reaktionsgefäß geben und 300 µl Resuspension Buffer R hinzufügen. 30 s vortexen und 1 min bei 1.000 x g zentrifugieren. Bis zu 200 µl Probe einsetzen und Volumen mit Resuspension Buffer R auf 400 µl einstellen. Die Probe sollte keine festen Partikel enthalten.

3.3.4 Bakterienkulturen

1 ml der Übernacht-Bakterienkultur in ein 2-ml-Safelock-Reaktionsgefäß überführen. 2 min bei 10.000 x g zentrifugieren und Überstand vollständig entfernen. Pellet in 400 Resuspension Buffer R resuspendieren.

3.3.5 Urin

Je nach bakteriellem Titer und Anwendung wird ein Ausgangsvolumen von 15 bis 50 ml Urin empfohlen. Bakterien durch Zentrifugieren pelletieren und Überstand vollständig entfernen (eine Kontamination mit Harnstoff kann PCR-Reaktionen inhibieren).

Bakterienpellet in 400 µl Resuspension Buffer R resuspendieren.

Bei manchen Anwendungen kann direkt frischer Urin eingesetzt werden. Bis zu 200 µl Probe einsetzen, Volumen mit Resuspension Buffer R auf 400 µl einstellen und mit Extraktionsprotokoll beginnen.

3.3.6 Trachealsekret, BAL, Sputum

a) Nicht oder wenig viskose Proben

Probe vor der Extraktion stets gut durchmischen.

Bis zu 200 µl Probe einsetzen und Volumen mit Resuspension Buffer R auf 400 µl einstellen.

b) Isolierung von Bakterien aus viskosen Proben

150 µl der Sputumprobe oder 1 ml Trachealsekret oder BAL in ein Safelock-Reaktionsgefäß überführen und 150 µl bzw. 1 ml gesättigte Acetylcystein-Lösung (ACC) zugeben (Verhältnis Probe - Puffer 1:1).

10 min bei 95 °C unter kontinuierlichem Schütteln inkubieren.

5 min bei 10.000 x g zentrifugieren, Überstand verwerfen.

Bakterienpellet in 400 µl Resuspension Buffer R resuspendieren.

c) Isolierung viraler DNS/RNS aus viskosen Proben

150 µl der Probe in Safelock-Reaktionsgefäß überführen und 150 µl gesättigte Acetylcystein-Lösung (ACC) zugeben (Verhältnis Probe - Puffer 1:1).

10 min bei 95 °C unter kontinuierlichem Schütteln inkubieren.

Probe abkühlen lassen.

Bis zu 200 µl Probe einsetzen und Volumen mit Resuspension Buffer R auf 400 µl einstellen.

3.3.7 Gewebebiopsie

400 µl Resuspension Buffer R in das Extraction Tube pipettieren. 1 - 10 mg Gewebebiopsiematerial in den aufgelösten Lysepuffer geben.

Für die Lyse empfiehlt es sich, schwer zu lysierende Gewebe wie Knorpel, Niere und Herzmuskel mit Zirconia-Beads aufzubrechen.

Nach der mechanischen Behandlung 10 min bei 65 °C unter kontinuierlichem Schütteln inkubieren.

10 min bei 95 °C unter kontinuierlichem Schütteln inkubieren.

1 min bei 10.000 x g zentrifugieren und Überstand in ein frisches Röhrchen überführen. Feste Partikel vermeiden.

Fahren Sie mit Schritt 2 des Protokolls fort

3.3.8 Zellkulturüberstände

Bis zu 200 µl Probe einsetzen und Volumen mit Resuspension Buffer R auf 400 µl einstellen.

3.4 Kurzprotokoll RTP® Pathogen Kit



Proben lysieren

Siehe Kapitel 3.3 "Vorbereitung des Ausgangsmaterials" zur probenspezifischen Vorbehandlung.

1. 400 µl volumenangepasstes Probenmaterial in das Extraction Tube überführen
Die folgenden Heizschritte sind auf einem Thermomischer unter kontinuierlichem Schütteln durchzuführen:
 - a) **Gleichzeitige Isolierung bakterieller und viraler Nukleinsäuren:**
10 min bei 37 °C inkubieren
15 min bei 65 °C inkubieren
Optional: 10 min bei 95 °C inkubieren
 - b) **Isolierung viraler Nukleinsäuren:**
10 min bei 65 °C inkubieren
Optional: 10 bei 95 °C inkubieren

Extraktionskontrolle bitte nach der Lyse hinzufügen.

Nukleinsäuren binden

2. 400 µl **Binding Solution** zugeben und durch Auf- und Abpipettieren oder Vortexen mischen.
Probe in das RTA Spin Filter Set überführen
1 min inkubieren
2 min bei 11.000 x g zentrifugieren

RTA Receiver Tube mit dem Filtrat verwerfen und RTA Spin Filter in frisches RTA Receiver Tube überführen.

Waschen zur Entfernung von Restverunreinigungen

- c) 500 µl **Wash Buffer R1** hinzufügen und 1 min bei 11.000 x g zentrifugieren

RTA Receiver Tube mit dem Filtrat verwerfen und RTA Spin Filter in frisches RTA Receiver Tube überführen.
- d) 700 µl **Wash Buffer R2** hinzufügen und 1 min bei 11.000 x g zentrifugieren

RTA Receiver Tube mit dem Filtrat verwerfen und RTA Spin Filter in frisches RTA Receiver Tube überführen.
- e) 4 min bei Maximalgeschwindigkeit zentrifugieren, um Ethanolreste zu entfernen

RTA Receiver Tube mit Filtrat verwerfen.

Nukleinsäuren eluieren

- f) Spin Filter in ein 1.5 ml Receiver Tube überführen.
60 µl **Elution Buffer R** (auf 65 °C vorgewärmt) direkt auf den RTA Spin Filter pipettieren.
1 min bei RT inkubieren und 1 min bei 11.000 x g zentrifugieren.

RTA Spin Filter verwerfen und eluierte Nukleinsäuren auf Eis lagern.

3.5 Protokoll: Gleichzeitige Isolierung von bakterieller DNS und viraler DNS/RNS aus Flüssigkeitsproben

Siehe Kapitel 3.3 "Vorbereitung des Ausgangsmaterials" zur probenspezifischen Vorbehandlung.

1. 400 µl Probenmaterial in das **Extraction Tube** überführen. Probenvolumen je nach Ausgangsmaterial mit **Resuspension Buffer R** oder PBS-Puffer auf 400 µl einstellen und kurz vortexen.

Schritt a) oder b) je nach Art der Probe und Ziel-Nukleinsäure auf einem Thermomischer unter kontinuierlichem Schütteln durchführen:

a) Isolierung bakterieller DNS oder gleichzeitige Isolierung bakterieller und viraler Nukleinsäuren

10 min bei 37 °C inkubieren.

15 min bei 65 °C inkubieren.

Bei schwer zu lysierenden Bakterien (z. B. Mykobakterien) oder Geweben empfiehlt sich eine zusätzliche 10-minütige Inkubation bei 95 °C.

b) Isolierung viraler Nukleinsäuren:

10 min bei 65 °C inkubieren.

Bei schwer zu lysierenden Proben (z. B. Gewebe) empfiehlt sich eine zusätzliche 10-minütige Inkubation bei 95 °C.

Hinweis: Wenn Sie Nukleinsäuren zur Extraktionskontrolle hinzufügen wollen, tun Sie dies jetzt, vor dem Bindungsschritt.

2. 400 µl **Binding Solution** zur Probe zugeben und durch Auf- und Abpipettieren oder Vortexen mischen.
Probe in das RTA Spin Filter Set überführen und 1 min inkubieren.
2 min bei 11.000 x g zentrifugieren.
RTA Receiver Tube mit dem Filtrat verwerfen und RTA Spin Filter in frisches RTA Receiver Tube überführen.
3. 500 µl **Wash Buffer R1** hinzufügen und 1 min bei 11.000 x g zentrifugieren.
RTA Receiver Tube mit dem Filtrat verwerfen und RTA Spin Filter in frisches RTA Receiver Tube überführen.
4. 700 µl **Wash Buffer R2** auf den RTA Spin Filter pipettieren und 1 min bei 11.000 x g zentrifugieren.
RTA Receiver Tube mit dem Filtrat verwerfen und RTA Spin Filter in frisches RTA Receiver Tube überführen.
5. Ethanolreste durch eine letzte Zentrifugation über 4 min bei Maximalgeschwindigkeit entfernen.
RTA Receiver Tube mit Filtrat verwerfen.
6. Spin Filter in ein 1.5 ml Receiver Tube setzen und 60 µl **Elution Buffer R** (auf 65 °C vorgewärmt) direkt auf die Oberfläche des RTA Spin Filter pipettieren.
1 min bei RT inkubieren und 1 min bei 11.000 x g zentrifugieren.

4. Anhang

4.1 Problembehebung

Problem	Mögliche Ursache	Empfehlung
Geringe Ausbeute an Nukleinsäuren	Unzureichende Zellyse	Lysezeit verlängern Kontinuierliches Schütteln verbessert das Lyseergebnis Weniger Ausgangsmaterial verwenden, um die Säule nicht zu überladen
	Unvollständige Elution	Inkubationszeit mit vorgewärmtem Elution Buffer R auf 5-10 min verlängern Zweimal mit 100 µl Elution Buffer R eluieren Mehr Elution Buffer R verwenden
	Niedrige Nukleinsäurekonzentration in der Probe	Nukleinsäuren mit weniger Elution Buffer R eluieren, aber nicht weniger als 40 µl verwenden
	Unsachgemäße Lagerung des Ausgangsmaterials	Sicherstellen, dass das Ausgangsmaterial sachgemäß gelagert wird. Probenmaterial nicht wiederholt auftauen und einfrieren.
	Falsch hergestellte Waschpuffer	Sicherstellen, dass die richtige Menge an Ethanol/Isopropanol zu den Waschpuffern hinzugefügt wird und dass alle Lösungen fest verschlossen gelagert werden.
Nukleinsäuren degradiert	Material alt	Sicherstellen, dass das Ausgangsmaterial unter geeigneten Bedingungen (-20 °C/-80 °C) gelagert wird.
	Kontamination mit Ethanol während der Elution	Trockenschritt zur Entfernung des Ethanols verlängern.
Nukleinsäuren funktionieren nicht gut in downstream Anwendungen (z. B. RT-PCR oder NGS)	Kontamination mit Salz während der Elution	Waschpuffer auf präzipitiertes Salz kontrollieren. Sollten sich Präzipitate gebildet haben, lösen Sie diese durch vorsichtiges Erwärmen auf 30 °C auf. Sicherstellen, dass die Waschpuffer bei Gebrauch Raumtemperatur haben.
	Unzureichende Zellyse	Siehe oben
Farbige Rückstände auf dem RTA Spin Filter	Waschschritt ineffizient	Waschschritt wiederholen
	Falsch hergestellte Waschpuffer	Siehe oben

4.2 Garantie

Invitek Molecular garantiert die einwandfreie Funktion des Kits in den in dieser Anleitung genannten Anwendungen und bei bestimmungsgemäßem Gebrauch. Zur Sicherstellung der Produktqualität wurden alle Kitbestandteile nach dem EN ISO 13485-zertifizierten Qualitätsmanagementsystem von Invitek Molecular auf Leistung getestet.

Probleme, Vorfälle und Mängel sollten Invitek Molecular gemeldet werden, sobald sie auftreten. Kontrollieren Sie das Produkt sofort bei Erhalt auf Vollständigkeit und Unversehrtheit. Bei Abweichungen informieren Sie bitte Invitek Molecular umgehend schriftlich. Änderungen am Kit und an den Protokollen sowie Verwendungen, die vom bestimmungsgemäßen Gebrauch abweichen, unterliegen nicht der Garantie.

Invitek Molecular behält sich vor, das Produkt jederzeit zu ändern, anzupassen oder zu modifizieren, um seine Leistung und sein Design zu verbessern.

Invitek Molecular garantiert für seine Produkte gemäß seiner AGB auf www.invitek-molecular.com. Bei Fragen wenden Sie sich bitte an techsupport@invitek-molecular.com.

4.3 Symbole auf Produkt und Etiketten



Hersteller



Chargennummer



Eindeutige Kennzeichnung eines Medizinprodukts



Katalognummer



Verfallsdatum



Lesen Sie die Gebrauchsanweisung



Temperaturbeschränkung



Nicht wiederverwenden



Anzahl Ansätze



In-vitro-Diagnostikum

4.4 Weitere Dokumente und Informationen

Auf www.invitek-molecular.com finden Sie weitere Informationen zu:

- FAQ und Tipps zur Problembeseitigung
- Anleitungen in anderen Sprachen
- Sicherheitsdatenblätter (MSDS)
- Online-Support
- Produktvideos

Sollten Sie trotz sorgfältiger Kenntnisnahme der Gebrauchsanweisung und weiterer Informationen noch Hilfe benötigen, kontaktieren Sie uns bitte auf techsupport@invitek-molecular.com oder wenden Sie sich an Ihren Vertriebspartner.

4.5 Bestellinformation

Produkt	Packungsgröße	Katalognr.
RTP® Pathogen Kit	50 Präparationen	1040500200
RTP® Pathogen Kit	250 Präparationen	1040500300

Änderungshistorie

Version	Datum	Beschreibung
DE-v1-2022	2022-05-18	Neues Dokument
DE-v2-2022	2022-06-30	Formfehler betr. Bez. Resuspension Buffer R

INVITEK Molecular

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

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

www.invitek-molecular.com



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

2022-06-30 DE-v2-2022