DB-1206

Automated RNA Isolation Kit

Návod k použití a uživatelská příručka

Verze: DB-1206-031-220204

Revize: 1.6 CZ

Datum vydání a poslední aktualizace: 22.09.2023

REF DB-1206-10×96rxns

DIANA Biotechnologies, a.s., Průmyslová 596, 252 50 Vestec, Česká republika
Email: support@dianabiotech.com, Web: www.dianabiotech.com

Obsah

1 Úvod ... 3
1.1 Určený účel ... 3
1.2 Použití a popis soupravy ... 3
1.3 Kontroly pro použití se soupravou ... 3
1.4 Obecné upozornění a varování ... 4
1.5 Bezpečnostní upozornění ... 4
1.6 Charakteristiky testu ... 5
2 Seznam materiálu ... 6
2.1 Požadované laboratorní vybavení ... 6
2.2 Požadovaný materiál, který není součástí soupravy ... 6
2.3 Materiál, který je součástí soupravy ... 7
2.4. Stabilita jednotlivých připravených složek soupravy ... 8
3 Příprava reagencií pro RNA izolaci ... 8
3.1 Obecné postupy ... 8
3.2. Příprava reagencií a plastu pro RNA izolaci ... 8
3.3 Příprava krabiček se špičkami ... 9
3.4 Příprava Lysis Buffer Concentrate ... 9
3.5 Příprava destiček REAGENT plate a BEAD plate ... 9
3.6 Příprava vzorků ... 9
3.7 Příprava lyzačního pufru ... 10
3.8 Přidání vzorků do LYSIS&SAMPLE plate ... 11
3.9 Kontroly pro použití se soupravou ... 12
4 Postup pro izolaci RNA ze slin ... 13
4.1 Příprava lyzačního pufru ... 13
4.2 Přidání vzorků do LYSIS&SAMPLE plate ... 13
5 Protokol pro automatizovanou izolaci RNA ... 14
5.1 Obecné informace ... 14
5.2 Spuštění RNA izolačního protokolu ... 14
6 Obecný postup pro izolaci RNA ... 18
7 Právní upozornění ... 19
8 Seznam kompatibilních souprav ... 19
9 Použité grafické symboly ... 20
10 Příloha k automatizovanému protokolu s využitím pipetovací stanice Agilent Bravo ... 21
10.1 Návod na správné zvolení počtu použití Master Mix tip box ... 21
10.2 Test nabrání špiček před RNA izolací ... 22
10.3 Návod na opravu špatně zadaného počtu použití Master Mix tip box ... 23
10.4 Návod na dodatečné napipetování PCR destičky ... 24
10.5 Označení kvadrantů v 384 jamkové destičce ... 25
Souhrnný zkrácený protokol ... 26

1 Úvod

1.1 Určený účel

Prostředek Automated RNA Isolation Kit je určen k izolaci RNA ze stěrů (např. nazálního, nasopharyngeálního, orofaryngeálního nebo bukálního stěru), nasopharyngeální tekutiny (aspirátu) nebo nasopharyngeálního výplachu, slin, sputa, výplachů dutiny ústní a výplachů hltanu kloktáním – tzv. gargling liquid. Je vhodný pro izolaci virové RNA.

1.2 Použití a popis soupravy

Automated RNA Isolation Kit je diagnostickým zdravotnickým prostředkem in vitro sloužícím k izolaci celkové RNA z biologických (lidských) vzorků za účelem detekce různých virových respiračních onemocnění, zejména COVID-19 (SARS-CoV-2), a dále chřipky A nebo B či RSV (Respiratory syncytial virus) a dalších. Souprava je optimalizována pro použití pipetovací stanice Agilent Bravo, ale je možné ji použít i s jinými laboratorními automaty či manuálně, protokol pro tyto případy je popsán v sekci 6.

Součástí soupravy jsou 3 boxy. Složení jednotlivých boxů je popsáno níže v kapitole 2.3.

Souprava byla vyvinuta k izolaci celkové RNA z následujících matric, pro které bylo validováno, že výtěžek izolace opakovaně dosahoval 50 % a více:

(i) fosfátového pufru (PBS) nebo copan universal transport media (VTM),
(ii) PBS či VTM s 10% podílem plné krve (EDTA), krevního séra, krevní plazmy (EDTA nebo citrátové) a
(iii) až 50% podílem slin nebo sputa.

Souprava byla testována i na kultivovaném SARS-CoV-2 viru. Validována byla pro izolaci SARS-CoV-2 RNA z lidských klinických vzorků:

(i) nasopharyngeálního stěru vytřepaného do VTM nebo PBS a
(ii) slin.

Je však vždy nutné, aby uživatel soupravu validoval pro konkrétní typ vzorku a konkrétní použití (virus) za použití pozitivních a negativních kontrol.

Jedna souprava obsahuje veškeré reagencie a spotřební materiál potřebný pro izolaci RNA pomocí protokolu „DIANA RNA izolace“ na Agilent Bravo (popsáno v kapitole 4). Jedna souprava je určena na 960 izolací (10 sad po 96 vzorcích v 96jamkovém formátu). Protokol je součástí *Agilent Bravo installation package for Automated RNA Isolation kit* (kat.č. DB-1214).

Izolace RNA funguje na principu separace ribonukleové kyseliny (RNA) z testovaného vzorku pomocí specifické adsorpce na povrch magnetických částic. RNA navázána na magnetické částice je oddělena od analyzovaného vzorku, promyta od nečistot a poté z magnetických částic vyeluována a připravena k následné PCR analýze.

1.3 Kontroly pro použití se soupravou

Pro použití soupravy v diagnostice je nutné používat kontroly, které jsou popsány v sekci 3.9.

1.4 Obecné upozornění a varování

Tato souprava je určena pouze pro profesionální použití v laboratoři. Dodržujte proto obecné zásady chemické bezpečnosti. Používejte vhodné ochranné pomůcky (např. rukavice, brýle, plášť), zamezte přímému kontaktu s chemikáliemi a vyvarujte se konzumace jídla nebo pití v laboratořích. Vyměňujte si rukavice, kdykoli máte podezření, že jsou kontaminovány.

Pro zamezení kontaminace jednotlivých vzorků je nutné dodržovat správnou laboratorní praxi, a to zejména používání jednorázových pipetovacích špiček s filtrem.

Aby nedošlo ke kontaminaci zásobních roztoků soupravy, práce se vzorky a pozitivními kontrolami by měla být prostorově oddělena od míst, kde se pracuje se zásobními roztoky soupravy. Také nepipetujte roztoky přímo ze zásobních lahví, potřebný objem si předem odlijte do vhodného rezervoáru a roztoky nikdy nevracejte zpět do lahví.

Uchovávejte všechny části soupravy v souladu s výrobcem uvedenými skladovacími podmínkami, které naleznete na jednotlivých balení a v kapitole 2.3. a 2.4. tohoto návodu.

Jakákoliv závažná nežádoucí příhoda (tedy taková při níž došlo k dočasnému závažnému nebo trvalému zhoršení zdravotního stavu či smrti pacienta, uživatele či jiné osoby, nebo taková kdy došlo k závažnému ohrožení veřejného zdraví), ke které došlo v souvislosti s použitím tohoto prostředku, musí být hlášena výrobci a příslušnému orgánu členského státu (SÚKLu).

Nesprávné zacházení se složkami soupravy a nedodržení postupů uvedených v této uživatelské příručce může nepříznivě ovlivnit výsledky.

Používejte stejnou verzi uživatelské příručky (viz záhlaví), která je uvedena na obalu.

Nepoužívejte soupravu po uplynutí doby použitelnosti, která je uvedena na obalu.

1.5 Bezpečnostní upozornění

⚠ ***Lysis Buffer Concentrate* a roztoky v REAGENT plate obsahují guanidium isothiokyanát, který je toxický.** K roztokům ani odpadním lahvím obsahujícím tyto roztoky nesmí být přidáno SAVO (či látky obsahující chlornan sodný) nebo jiné kyseliny! Důsledkem by byla tvorba toxického plynu. **REAGENT plate obsahuje roztoky s nejvýše 80% etanolem, který je hořlavý.** Příslušné bezpečnostní listy (SDS – Safety data sheet) jsou k dispozici na webových stránkách výrobce.

⚠ Při práci s biologickými vzorky věnujte pozornost bezpečnostním pravidlům pro práci s infekčním biologickým materiálem, **používejte vhodné ochranné vybavení** (např. štít, respirátor) a se vzorky pracujte pouze ve vyhrazených biohazard boxech nebo ve vyhrazených pracovních prostorech. S infekčními vzorky pracujte pouze v laboratořích kategorie BSL2+ nebo BSL3. Potenciálně infekční odpad i neinfekční materiál zlikvidujte v souladu s platnými právními předpisy, interními postupy laboratoře a bezpečnostními listy soupravy.

⚠ Průběžně kontrolujte, zda v pracovním prostoru nejsou roztoky nebo biologické vzorky rozlité. V případě rozlití pracovní plochu okamžitě dekontaminujte. Pokud dojde ke kontaktu reagencií s pokožkou nebo k zasažení očí, okamžitě postižené místo opláchněte tekoucí vodou po dobu minimálně 15 minut.

1.5.1 H věty a P věty

H226 Hořlavá kapalina a páry.

H302+ H312 + H332 Zdraví škodlivý při požití, při styku s kůží nebo při vdechování.

H314 Způsobuje těžké poleptání kůže a poškození očí.

H412 Škodlivý pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky.

EUH031 Uvolňuje toxický plyn při styku s kyselinami.

EUH071 Způsobuje poleptání dýchacích cest.

P210 Chraňte před teplem, horkými povrchy, jiskrami, otevřeným ohněm a jinými zdroji zapálení. Zákaz kouření.

P260 Nevdechujte prach ani mlhu.

P262 Zabraňte styku s očima, kůží nebo oděvem.

P280 Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.

P301/330/331 PŘI POŽITÍ: Vypláchněte ústa. NEVYVOLÁVEJTE zvracení.

P303/361/353 PŘI STYKU S KŮŽÍ (nebo vlasy): Veškeré kontaminované části oděvu okamžitě svlékněte. Opláchněte kůži vodou (nebo osprchujte).

P305/351/338 PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování.

P310 Okamžitě volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO/lékaře.

P370/378 V případě požáru: K uhašení použijte vodu/pěnu/prášek/CO2.

P501 Odstraňte obsah/obal v souladu s místními, regionálními, národními a mezinárodními předpisy.

1.6 Charakteristiky testu

Výtěžek izolace a použití různých matric

Výtěžek izolace RNA byl stanoven pro izolaci RNA z různých biologických matric.

Citlivost

Souprava byla validována ve spojení s RT-PCR soupravou *COVID-19 Multiplex RT-PCR Kit* (kat.č. DB-1211) pro detekci viru COVID-19 z nasopharyngeálních stěrů. Tato souprava DB-1206 ve spojení s DB-1211 dosáhla při porovnání s alternativním způsobem izolace RNA na 77 vzorcích, z nichž bylo 18 SARS-CoV-2 pozitivních, 100% citlivosti. Analytická citlivost byla validována také v porovnání s referenční CE-IVD RT-PCR soupravou DB-1219 DBdirect™ COVID-19 Multiplex RT-PCR, která detekuje virovou RNA přímo ve vzorku bez nutnosti izolace RNA a slouží jako vhodný benchmark metody s vysokou účinností detekce virové RNA na celkem 263 klinických vzorcích nasopharyngeálních stěrů a 180 klinických vzorcích slin. Ve stěrech bylo po izolaci RNA detekováno 91 vzorků SARS-CoV-2 pozitivních (o různých virových náložích odpovídajících rozložení v populaci) a detekce viru v izolované RNA dosáhla v porovnání s přímou metodu 100% citlivosti. Ve slinách bylo po izolaci RNA detekováno 66 SARS-CoV-2 pozitivních vzorků (o různých virových náložích odpovídajících rozložení v populaci) a detekce viru v izolované RNA dosáhla v porovnání s přímou metodou 87% citlivosti pro všechny vzorky, avšak 100% citlivosti pro vzorky s Ct nižší než 35 cyklů v přímé detekci.

Výsledky validačních studií ukazují, že detekce ve stěrech je velmi spolehlivá a že detekce respiračních virů ve slinách pomocí izolace RNA může vést ke snížené citlivosti okolo 90 % - to je dáno tím, že ve slinách je u části jedinců velmi nízká koncentrace viru, a navíc je pro izolaci ze slin kvůli jejich konzistenci používán 3x menší objem než pro izolaci ze stěrů, přímá metoda se tak pro sliny jeví vhodnější. Tato souprava byla validována také pro použití se soupravami DB-1250, DB-1252 a DB-1254. Pro diagnostiku COVID-19 a jiných virů lze použít i jiné CE-IVD RT-PCR soupravy, avšak v tom případě připadá zodpovědnost validovat kompatibilitu RT-PCR soupravy s touto soupravou uživateli, stejně jako při použití této soupravy k detekci jiných virů mimo SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B a RSV, pro které byla již souprava validována výrobcem.

Reprodukovatelnost

Intraassay variabilita (porovnání nezávislých izolací RNA na stejné destičce) a interassay variabilita (porovnání nezávislých izolací na různých destičkách) ve spojení s RT-PCR detekcí SARS-CoV-2 soupravou DB-1211 byla změřena opakovaně s použitím ředící řady virové kultury a s 18 pozitivními klinickými vzorky. Intraassay variabilita byla opakovaně < 0.20 cyklu pro Ct < 35 cyklus. Interassay variabilita byla pro stejné vzorky opakovaně < 0.30 cyklu. Rozptyl cyklů závisí i na použitém cykleru a procesu odečtu hodnot.

2 Seznam materiálu

2.1 Požadované laboratorní vybavení

- Kalibrované jednokanálové / multikanálové pipety
- Stolní centrifuga pro standardní SBS destičky (minimální přetížení 200× g)
- Centrifuga na 1,5 a 2 ml zkumavky
- Třepačka na zkumavky/vortex
- Rukavice a další ochranné prostředky

2.1.1 Pipetovací stanice

Tato souprava je optimalizována pro použití s pipetovací stanici Agilent Bravo s pipetovací hlavou 96ST, s 6 základními a 3 přesnými pozicemi (alignment stations). Na pipetovací stanici musí být zároveň proškoleným personálem nainstalován protokol „DIANA RNA izolace“, který je součástí *Agilent Bravo installation package for Automated RNA Isolation kit* (kat.č. DB-1214).

Tato uživatelská příručka je určena pro uživatele, kteří disponují základními znalostmi o pipetovací stanici Agilent Bravo a kteří ji umějí ji ovládat. Doporučujeme všem uživatelům pipetovací stanice Agilent Bravo, aby se před jejím užíváním seznámili alespoň v základu s její uživatelskou příručkou (Quick Guide Manual, G5409-90020A_EN).

V případě použití jiné pipetovací stanice je nutné, aby byla použita stanice, která umožňuje provést RNA izolaci tak, jak je popsáno v kapitole 6. V případě použití jiné pipetovací stanice postupujte podle informací uvedených v návodu k obsluze přístroje.

2.2 Požadovaný materiál, který není součástí soupravy

- 100% Isopropanol
- Jednorázové pipetovací špičky (doporučujeme špičky s filtrem)

- Prázdná originální Agilent Bravo krabička od špiček používaných v této soupravě – je součástí *Installation package for Automated RNA Isolation* (kat.č. DB-1214)
- Doporučené: pro následnou RT-PCR analýzu testovaných vzorků je nutná 96-jamková PCR destička[1] (*Assay plate*) kompatibilní s Vámi používaným real-time PCR přístrojem a vhodná optická folie k jejímu zalepení.

[1] Protokol pro pipetovací stanice Agilent Bravo na přípravu *Assay plate* a smíchání izolované RNA s RT-PCR Master Mixem je validován pro destičku 4ti-0951 (4ti-tude, Roche type) a je použitelný pro jakoukoliv destičku, která má stejnou geometrii jamek (typicky dvousložkové destičky Framestar od 4ti-tude určené pro jiné PCR cyklery). V případě, že se geometrie Vaší PCR destičky liší, je nutné pro ni protokol validovat a případně upravit (v tomto případě nás kontaktuje).

2.3 Materiál, který je součástí soupravy

Tabulka 1: Složky soupravy DB-1206

Složky soupravy	REF kód[9]	Množství[10]	Podmínky skladování	Číslo boxu[7]	Barva víčka
Lysis Buffer Concentrate [1,2]	RF04883	1× 90 ml	18-30 °C	1	
REAGENT plate [1,2]	RF04900	10 kusů	18-30 °C	1 [8]	
WASTE plate [3]	RF00863	10 kusů	18-30 °C	1 [8]	
LYSIS&SAMPLE plate [3]	RF06220	10 kusů	18-30 °C	1 [8]	
Master Mix Tip box	RF01473	1 kus	18-30 °C	1	
RT-PCR Master Mix reservoir s víčkem [3]	RF07912	1 kus	18-30 °C	1	
50 ml zkumavka pro lyzační pufr [3]	RF05996	10 kusů	18-30 °C	1 [8]	
25 ml rezervoár pro lyzační pufr [3]	RF02191	10 kusů	18-30 °C	1 [8]	
Agilent Bravo 70 µl špičky (384)	RF01654	10 balení	18-30 °C	1	
Labels for non-labeled consumables [2,4]	RF08223	1 balení	18-30 °C	1	
General Adhesive Seal (adhezivní folie)	RF06632	20 kusů	18-30 °C	1	
Pre-pierced Seal (předděrované folie)	RF01405	10 kusů	18-30 °C	1	
Aluminum Seal (mrazu odolné folie)	RF05015	10 kusů	18-30 °C	1	
BEAD plate (destička s magnetickými kuličkami) [2]	RF01653	10 kusů	2-8 °C [5]	2	
Lysis Enhancer (lyzační aditivum)	RF01276	2× 550 µl	-20 - -80 °C [6]	3	
RNA Carrier (RNA nosič)	RF05326	2× 550 µl	-20 - -80 °C [6]	3	
DTT Concentrate (DTT koncentrát)	RF03691	2× 550 µl	-20 - -80 °C [6]	3	

[1] – Uchovávejte na temném místě
[2] – Před použitím si přečtěte kapitolu 3 (Příprava reagencií)
[3] – Prázdný spotřební materiál, který je součástí soupravy
[4] – Polepky (labels) pro označení krabiček se špičkami (70 µl, prázdná krabička – EMPTY tip box)
[5] – Nikdy nemrazit! Zmrazené magnetické částice již nelze použít

[6] – Minimalizujte počet opakovaného mrazení a rozmrazování a minimalizujte dobu, po kterou jsou roztoky rozmrazené. Nikdy nepřekračujte čtyři cykly rozmrazování, v případě vícenásobného použití je rozdělte do menších jednorázových alikvotů
[7] – Kvůli různým podmínkám skladování je souprava zasílána ve třech baleních
[8] – Tyto složky jsou baleny spolu v jedné krabičce po jednom kusu pro jednu izolaci
[9] – REF kódy a čísla šarží (LOT) soupravy i jednotlivých složek jsou uvedeny na obalu, obal proto pro referenci zachovejte, dokud nespotřebujete celou soupravu
[10] Do zkumavek je plněn objem o 10 až 20 % vyšší, než je uveden v **Tabulce 1**
Na obalu soupravy i jednotlivých složek soupravy jsou uvedeny čárové kódy se základními informacemi

2.4. Stabilita jednotlivých připravených složek soupravy

2.4.1 Lyzační pufr

Lyzační pufr připravený dle pokynů v oddílu 3.7 je stabilní při laboratorní teplotě 8 hodin.

2.4.2 DTT Concentrate, Lysis Enhancer a RNA Carrier

Minimalizujte počet opakovaného mrazení a rozmrazování. Nikdy nepřekračujte čtyři cykly rozmrazování, v případě vícenásobného použití roztoky rozdělte do menších jednorázových alikvotů.

2.4.3 BEAD plate

Stočený BEAD plate je stabilní při laboratorní teplotě po dobu 24 hodin.

3 Příprava reagencií pro RNA izolaci

3.1 Obecné postupy

- Nepoužívejte součásti soupravy, které jsou při přijetí poškozené nebo rozmrazené. Uschovejte je pro případnou reklamaci a kontaktujte výrobce.
- Nemíchejte složky z různých šarží souprav (číslo šarže je uvedeno na obalu).
- Jakékoliv zamražené roztoky před použitím nechte zcela rozmrznout, poté je stočte, promíchejte krátkým vortexováním a znovu stočte, až poté je možné je otevřít a použít.
- Vždy strhávejte fólie z destiček opatrně tak, aby v nich obsažená kapalina zůstala na dně jamek. Během manipulace s destičkou se vyvarujte prudkých pohybů jako například klepnutí s destičkou o stůl atp. To by vedlo k nechtěnému vylití kapaliny z destičky.

3.2. Příprava reagencií a plastu pro RNA izolaci

1. Z mrazáku vyndejte jednu zkumavku **Lysis Enhancer** (fialové víčko ●), **RNA Carrier** (modré víčko ●) a **DTT Concentrate** (žluté víčko ●). Během přípravy lyzačního pufru ponechte zkumavky na pokojové teplotě. Pokud zkumavky budete ještě daný den používat, ponechte je v lednici, v opačném případě je znovu zamrazte.
2. Z lednice vyndejte jednu destičku označenou **BEAD** plate.
3. Vyndejte jedno balení izolačního kitu, které obsahuje většinu plastu a destiček s reagenciemi skladovaných při pokojové teplotě a nutných k provedení jedné RNA izolace, jmenovitě: **REAGENT** plate, **WASTE** plate, **LYSIS&SAMPLE** plate, 50 ml zkumavku a 25 ml rezervoár.
4. Připravte si RNA izolační kontrolu a případně také pozitivní kontrolu. V případě, že používáte soupravy výrobce DIANA Biotechnologies z mrazáku vyndejte zkumavku RNA Isolation control

(víčko s číslem 5) a Positive control (víčko s číslem 4). Zároveň si do PCR boxu vyndejte RT-PCR Master Mix, aby Vám rozmrznul.

3.3 Příprava krabiček se špičkami

Špičky jsou dodávány od třetí strany v originálním balení, jedná se o 70 µl špičky a mají na sobě buď zelené kolečko nebo jiné podobné označení zelené barvy (může se lišit podle typu výrobce). Součástí kitu je také jedna další krabička se 70 µl špičkami s názvem „Master Mix tip box“, která má na straně velkou bílou polepku s čísly 1 až 10 a slouží jako zdrojová i odpadní krabička pro špičky, kterými se rozplňuje PCR master mix do PCR destičky.

1. Na krabičku s 70 µl špičkami (zelené kolečko) nalepte štítek „tip70 tip box“.
2. Na prázdnou krabičku od špiček nalepte popisek „EMPTY tip box“. Při použití soupravy si vytvoříte nový EMPTY tip box na konci každého protokolu (popsáno v sekci 5.2.5).

3.4 Příprava Lysis Buffer Concentrate

V *Lysis Buffer Concentrate* se může během transportu nebo skladování v teplotách pod 18 °C objevit precipitát ve formě krystalů. Před každým použitím lahvičku promíchejte a zkontrolujte, zda nedošlo k jeho vytvoření, v takovém případě je nutné před použitím precipitát rozpustit. Pro rozpuštění precipitátu umístěte lahvičku do termálního inkubátoru nastaveného na 37 °C, kde ji ponechte 1 hodinu. Poté roztok promíchejte několika obraty lahvičky dnem vzhůru a zpět, precipitát by se měl rozpustit. Skladujete-li roztok při pokojové teplotě, neměl by se precipitát znovu objevit.

3.5 Příprava destiček REAGENT plate a BEAD plate

1. Před použitím stočte **REAGENT plate** 200× g minimálně po dobu 15 sekund.
2. Před použitím stočte **BEAD plate** 200× g po minimálně dobu 15 sekund.

Pozn. Při centrifugaci destiček použijte vhodné vyvažovací destičky. BEAD plate a REAGENT plate mají jinou hmotnost, a proto nemohou být stáčeny naproti sobě! Vhodné balanční destičky jsou součástí Agilent Bravo installation package for Automated RNA Isolation kit (kat.č. DB-1214).

3.6 Příprava vzorků

Před přidáním vzorků do lyzačního pufru považujte veškerý materiál za potenciálně infekční. **Dbejte bezpečnosti práce s infekčním biologickým materiálem**.

3.6.1 Nasopharyngeální stěry

Pro izolaci RNA z nasopharyngeálního stěru v mediu nebo pufru, zvortexujte odběrovou zkumavku s odběrovou tyčinkou, mediem nebo pufrem po dobu 1 minuty a krátce stočte.

3.6.2 Sliny

Pro izolaci RNA ze slin nejdříve odběrovou zkumavku se slinami zvortexujte a poté ji krátce stočte (např. 200× g po dobu 1 minuty). Pro odběr slin doporučujeme využít odběrové sady na sliny DIANA Biotechnologies.

3.6.3 Jiné druhy biologických matric

Pro izolaci RNA z jiných biologických matric použijte standardní postup přípravy vzorků pro danou biologickou matrici.

Volitelné: *Pro snížení infekčnosti lze vzorek před přidáním do lyzačního pufru tepelně inaktivovat při 65 °C po dobu 10 až 30 minut. Pro každý typ analyzované RNA a biologické matrice je však nutné vyzkoušet vliv na výtěžnost izolace. Pro COVID-19 detekci z nasopharyngeálního výtěru ve VTM byl pozorován pokles signálu o 1 až 3 cykly.*

3.7 Příprava lyzačního pufru

Tabulka 2: Seznam chemikálií pro přípravu lyzačního pufru

Pořadí přidání	Složka	Objem vzorku [µl]	Barva víčka
		1 destička (96 vzorků)	
1	Lysis Buffer Concentrate	9 000	
2	Lysis Enhancer	110	
3	RNA Carrier	110	
4	DTT concentrate	110	
5	100% Isopropanol [1]	5 700	
Uzavřete a několikrát obraťte dnem vzhůru a zpět pro **důkladné promíchání**			
6	RNA izolační kontrola [1,2]	126	5[3]
Uzavřete a několikrát obraťte dnem vzhůru a zpět pro **důkladné promíchání** [2]			

[1] – Není součástí soupravy
[2] – Pokud nepoužíváte RNA izolační kontrolu, tak tento krok vynechte
[3] – Číslo na víčku je platné pouze v případě použití souprav výrobce DIANA Biotechnologies. Pokud používáte izolační kontrolu z jiné RT-PCR soupravy, připravte ji podle pokynů výrobce a dořeďte na výsledný objem 126 µl ultra čistou vodou.

Pozn.: Uvedené objemy pro přípravu lyzačního pufru již zahrnují mrtvý objem kapaliny (ve skutečnosti jsou udané objemy dostatečné pro analýzu 126 vzorků), není tedy třeba objem navyšovat. Zde popsaný návod je platný pro přípravu lyzačního pufru pro izolaci RNA z 96 vzorků za použití jednoho LYSIS&SAMPLE plate. V případě jiného množství vzorků příslušně upravte objemy jednotlivých složek.

Tento postup platí pro všechny biologické matrice vyjma slin. V případě RNA izolace ze vzorků slin, postupujte dle informací uvedených v kapitole 4.

1. Lyzační pufr si připravte v dostatečném množství a vždy čerstvý.

Pozn. Po smíchání všech komponent je lyzační pufr stabilní při 25 °C minimálně 8 hodin, a je tak možné si jej připravit najednou v dostatečném množství na celý den. Je možné si dopředu připravit i celý LYSIS&SAMPLE plate s rozpipetovaným lyzačním pufrem, ale je nutné ho mít do doby použití zalepený adhezivní folií, aby se zabránilo jeho odparu.

2. Lysis Enhancer, RNA Carrier a DTT Concentrate jsou zmrazené a před použitím je nutné je zcela rozpustit. Všechny roztoky můžete nechat během přípravy lyzačního pufru na pokojové teplotě. Pro dosažení homogenity jednotlivé komponenty před použitím vždy stočte ve stolní centrifuze, zvortexujte a znovu stočte.

Pozn1. V případě, že se bude připravovat lyzační pufr vícekrát během jednoho dne, ponechte rozmrazené roztoky v lednici. Každá zkumavka obsahuje roztok na 5 izolací 96 vzorků. Pro lepší přehlednost doporučujeme označit kolikrát byl daný roztok použit.

Pozn2. Roztok RNA Carrier může být po rozmrazení viskózní a hůře pipetovatelný. Proto roztok před použitím ponechte alespoň 30 minut rozmrznout a vytemperovat na pokojové teplotě (nenechávejte jej na ledu). Při přetrvávajících problémech s pipetováním RNA Carrier roztoku ho několik minut zahřejte v dlani nebo v inkubátoru nastaveném na 37 °C.

3. Připravte si RNA izolační kontrolu (není součástí soupravy), která je typicky součástí RT-PCR souprav (postupujte dle návodu k RT-PCR soupravě).
4. Pro izolaci 96 vzorků připravte lyzační pufr následovně (viz **Tabulka 2**):
   a) Do poskytnuté 50 ml zkumavky odpipetujte po stěně zkumavky **9 ml Lysis Buffer Concentrate** (v případě použití pipety o objemu 1000 µL pipetujte reverzně).
   b) Do stejné zkumavky přidejte novou špičkou přímo do roztoku **110 µl Lysis Enhancer** (fialové víčko 🟣) a špičku jednou propláchněte. Odhoďte špičku.
   c) Do stejné zkumavky přidejte novou špičkou přímo do roztoku **110 µl RNA Carrier** (modré víčko 🔵) a špičku jednou propláchněte. Odhoďte špičku.
   d) Do stejné zkumavky přidejte novou špičkou přímo do roztoku **110 µl DTT Concentrate** (žluté víčko 🟡) a špičku jednou propláchněte. Odhoďte špičku.
   e) Do stejné zkumavky přidejte **5,7 ml 100 % isopropanolu**. V případě použití pipety o objemu 1000 µl **NEPOUŽÍVEJTE** techniku reverzního pipetování.
   f) Zavřete zkumavku a několikrát obraťte dnem vzhůru a zpět pro **důkladné promíchání roztoku před přidáním izolační kontroly** v dalším kroku (nebo odebráním alikvotu).
   g) ***Volitelné**: pokud chcete provést negativní kontrolu pro RNA izolační kontrolu (sekce 3.9.2), odeberte 120 µl roztoku do jedné jamky LYSIS&SAMPLE plate (do této jamky již následně nepřidávejte lyzační pufr s izolační kontrolou)*.
   h) Poté do stejné zkumavky přidejte **126 µl RNA izolační kontroly,** kterou předtím dobře promíchejte, a špičku jednou propláchněte. Odhoďte špičku. Pokud RNA izolační kontrolu nepoužíváte, tak tento krok vynechte (pro použití v in vitro diagnostice je použití RNA izolační kontroly povinné).
   i) Zavřete zkumavku a několikrát obraťte dnem vzhůru a zpět pro **důkladné promíchání roztoku**.
5. Nalijte připravený lyzační pufr do plastového rezervoáru (součást soupravy, kapacita 25 ml) a **rozpipetujte 120 µl lyzačního pufru na dno všech jamek do LYSIS&SAMPLE plate** pomocí 200 µl multikanálové pipety.

⚠ ***DŮLEŽITÉ:** Rozpipetování lyzačního pufru do LYSIS&SAMPLE plate musí být provedeno rychle (ideálně během 1-2 minut od nalití do rezervoáru), aby se předešlo případnému odpaření lyzačního pufru z rezervoáru. Případně je možné pro rozpipetování lyzačního pufru použít elektronickou multikanálovou pipetu či jiný vhodný dávkovač, kterým lze kapalinu nabírat přímo z 50 ml zkumavky, ze které se lyzační pufr odpařuje pomaleji než z rezervoáru.*

6. Pokud budete přidávat vzorek do LYSIS&SAMPLE plate do 30 minut od jeho přípravy, přelepte destičku děrovanou fólií, která je součástí soupravy. Pokud budete vzorky přidávat později, přelepte nejdříve LYSIS&SAMPLE plate obyčejnou adhezivní fólií (takto může destička stát až 12 hodin). Před přidáním vzorku tuto fólii strhněte a destičku přelepte děrovanou fólií.

3.8 Přidání vzorků do LYSIS&SAMPLE plate

1. Skrz předděrovanou fólii napipetujte **60 µl vzorku do příslušné jamky v LYSIS&SAMPLE plate**. **Vzorek pipetujte přímo DO lyzačního pufru, ne na stěnu destičky, vzorek není nutné promíchat (stroj promíchá vzorek na začátku izolace)**.

Pozn. Vyhněte se opakovanému či prudkému pipetování, které může způsobit vznik bublin v roztoku.

2. Postupně takto napipetujte všechny vzorky do LYSIS&SAMPLE plate.
3. Po napipetování všech vzorků přidejte negativní kontrolu, a až poté pozitivní kontrolu.
4. Nakonec LYSIS&SAMPLE plate zalepte novou adhezivní fólií, která je součástí soupravy.

5. Celková doba práce s LYSIS&SAMPLE plate, který je přelepený pouze předděrovanou fólií **nesmí překročit 2 hodiny**.
6. Lyzační pufr vzorky inaktivuje, avšak je potřeba k nim stále přistupovat jako k potenciálně infekčním (zejména po dobu, než jsou řádně promíchány s lyzačním pufrem během RNA izolačního protokolu). Navíc může na stěnách destičky zůstat kontaminace původními infekčními vzorky. Destičku proto po zalepení adhezivní fólií otřete isopropanolem nebo ethanolem, dbejte přitom, aby kapalina zůstala na dně jamek (destičku nijak nenaklánějte a neotáčejte).
7. Takto připravenou a zalepenou destičku stočte 200× g po dobu 1 minuty.

Pozn. Při centrifugaci použijte vhodnou vyvažovací destičku. Vyvažovací destička pro LYSIS&SAMPLE plate je součástí Agilent Bravo installation package for Automated RNA Isolation kit (kat.č. DB-1214).

3.9 Kontroly pro použití se soupravou

3.9.1 Povinné kontroly pro užití v *in vitro* diagnostice

Kontrola účinnosti izolace (RNA izolační kontrola): ke každému vzorku musí být před izolací RNA přidána externí RNA kontrola, která je detekována v následném RT-PCR. Pomocí této kontroly je stanovena účinnost izolace RNA a jsou vyloučeny i další nežádoucí jevy, zejména případná inhibice RT-PCR. Tato kontrola je běžně součástí RT-PCR kitů. Přesný postup použití RNA izolační kontroly je popsán v sekci 3.7 a v **Tabulce 2**. Návod k interpretaci výsledků při použití RNA izolační kontroly je popsán v návodu k použití k dané RT-PCR soupravě. K této RNA izolační soupravě doporučujeme použít RNA izolační kontrolu od výrobce souprav DIANA Biotechnologies. Izolační kontrola v RT-PCR soupravách DB-1211, DB-1250, DB-1252 a DB-1254 výrobce DIANA Biotechnologies je ekvivalentní a lze ji použít záměně. Pokud tedy izolovanou RNA napoprvé analyzujete například soupravou DB-1211, tak pro přeměření této RNA můžete použít například soupravu DB-1254 a budete mít kontrolu amplifikace v reakci.

Negativní kontrola izolace: pro ověření, že během manipulace nedošlo ke kontaminaci žádné reagencie cílovou RNA či DNA, přidejte do jedné izolace místo testovaného vzorku buď známý negativní vzorek, čisté medium nebo PCR vodu. Tato kontrola by měla být namíchána až po manipulaci se všemi testovanými vzorky během dané izolace.

Pozitivní kontrola izolace: pro kontrolu správné izolace a amplifikace cílové RNA přidejte do jedné izolace místo vzorku buď známý pozitivní vzorek anebo cílovou RNA, pokud je k dispozici nebo je součástí RT-PCR kitu (například pro soupravy výrobce DIANA Biotechnologies Positive control). Tato kontrola může být nahrazena RT-PCR kontrolou – v takovém případě přidejte cílovou RNA přímo do RT-PCR mixu, jako kdyby se jednalo o vzorek.

3.9.2 Doporučená kontrola (nepovinná)

Negativní kontrola RNA izolační kontroly: během manipulace s reagenciemi může dojít k jejich kontaminaci nejen virovou RNA (testováno v negativní kontrole popsané výše), ale i RNA izolační kontrolou přidávanou do lyzačního pufru pro kontrolu účinnosti izolace RNA. Proto doporučujeme přidat jednu izolační kontrolu s negativním vzorkem nebo čistým mediem, do které tato externí RNA kontrola není přidána (je nutné pro tuto jednu izolaci připravit lyzační pufr bez přidané RNA kontroly, nebo odebrat alikvot před jejím přidáním, viz sekce 3.7). Při přípravě RT-PCR Master Mixu poté tuto izolační kontrolu také nepřidávejte (použijte stejný Master mix jako pro všechny vzorky a ostatní kontroly) a v RT-PCR se pak při negativním výsledku prokáže, že nedošlo ke kontaminaci.

4 Postup pro izolaci RNA ze slin

Postup pro izolaci RNA ze slin je stejný jako pro izolaci RNA z nasopharyngeálních stěrů popsaný výše, **pouze se liší příprava lyzačního pufru a objem vzorku**.

4.1 Příprava lyzačního pufru

1. Postupujte analogicky jako v sekci 3.7 při přípravě lyzačního pufru pro nasopharyngeální stěry, avšak upravte objemy dle následující **Tabulky 3**.

Tabulka 3: Seznam chemikálií pro přípravu lyzačního pufru pro izolaci RNA ze slin

Pořadí přidání	Složka	Objem vzorku [µL]	Barva víčka
		1 destička (96 vzorků)	
1	Lysis Buffer Concentrate	9 000	
2	Lysis Enhancer	110	
3	RNA Carrier	110	
4	DTT concentrate	110	
5	100 % Isopropanol [1]	5 700	
6	ultračistá voda nebo PBS [1]	5 000	
Zavřete a několikrát obraťte dnem vzhůru a zpět pro důkladné **promíchání**			
7	RNA izolační kontrola [1,2]	126	5[3]
Zavřete a několikrát obraťte dnem vzhůru a zpět pro důkladné **promíchání** [2]			

[1] – Není součástí soupravy
[2] – Pokud nepoužíváte RNA izolační kontrolu, tak tento krok vynechte
[3] – Číslo na víčku je platné pouze v případě použití souprav výrobce DIANA Biotechnologies. Pokud používáte izolační kontrolu z jiné RT-PCR soupravy, připravte ji podle pokynů výrobce a dořeďte na výsledný objem 126 µL ultra čistou vodou.

2. Následně nalijte připravený lyzační pufr do plastového rezervoáru (součást soupravy, kapacita 25 mL) a **rozpipetujte 160 µL lyzačního pufru na dno všech jamek do LYSIS&SAMPLE plate** pomocí multikanálové pipety.

⚠ ***DŮLEŽITÉ:*** *Rozpipetování lyzačního pufru musí být provedeno rychle (ideálně během 1-2 minut od nalití do rezervoáru), aby se předešlo případnému odpaření lyzačního pufru z rezervoáru. Případně je možné pro rozpipetování lyzačního pufru použít elektronickou multikanálovou pipetu či jiný vhodný dávkovač, kterým lze kapalinu nabírat přímo z 50 ml zkumavky, ze které se lyzační pufr odpařuje pomaleji než z rezervoáru.*

4.2 Přidání vzorků do LYSIS&SAMPLE plate

Při přípravě vzorků slin postupujte dle sekce 3.6.2. Pro přidávání vzorků do LYSIS&SAMPLE plate platí stejné pokyny jako v sekci 3.8, s rozdílem, že objem vzorku je pouze 20 µL:

Skrze předděrovanou fólii napipetujte **20 µL vzorku slin do příslušné jamky v LYSIS&SAMPLE plate**. **Vzorek pipetujte přímo DO lyzačního pufru, ne na stěnu destičky**.

5 Protokol pro automatizovanou izolaci RNA

5.1 Obecné informace

Pro zajištění správného fungování protokolu je nutné, aby pipetovací stanice Agilent Bravo měla nainstalovánu 96ST hlavu a tři přesné pozice (alignment stations) umístěné v pozicích 1, 2 a 3 a byla řádně nainstalována a otestována, což by mělo být provedeno autorizovaným zástupcem prodejce přístroje. Na pipetovací stanici Agilent Bravo musí být také předem instalován zde popsaný protokol poskytovaný firmou DIANA Biotechnologies v rámci instalačního balíčku *Agilent Bravo installation package for Automated RNA Isolation kit* (kat.č. DB-1214). Součástí tohoto balíčku je také dodání magnetického adaptéru, který musí být umístěn na pozici 2.

Pro dlouhodobé spolehlivé fungování je nutná pravidelná údržba a testování pipetovací stanice Agilent Bravo, které zajišťuje autorizovaný servis prodejce přístroje. Izolace RNA by měla být prováděna při pokojové teplotě (18-25 °C).

Níže popsané kroky umožní RNA izolaci z 96 vzorků najednou. Výsledkem protokolu je PCR destička připravená k vložení do qPCR cykleru, kde je v každé jamce smícháno 4,5 µl izolované RNA s 13,5 µl RT-PCR Master Mixu. Během celého protokolu izolace RNA zůstávají zachovány pozice vzorků v BEAD plate a PCR destičce identicky jako v původním LYSIS&SAMPLE plate. Zbytek roztoku izolované RNA zůstává na magnetických kuličkách v BEAD plate (kvadrant 3) a může být použit na jednu další RT-PCR analýzu (celá destička se dá pipetovat doplňkovým protokolem pomocí pipetovací stanice Bravo (viz sekce 10.4) nebo se mohou jednotlivé izoláty pipetovat ručně). V případě ručního odpipetování ho doporučujeme provádět na magnetickém stojánku, aby se zamezilo nabrání magnetických kuliček do RT-PCR reakce.

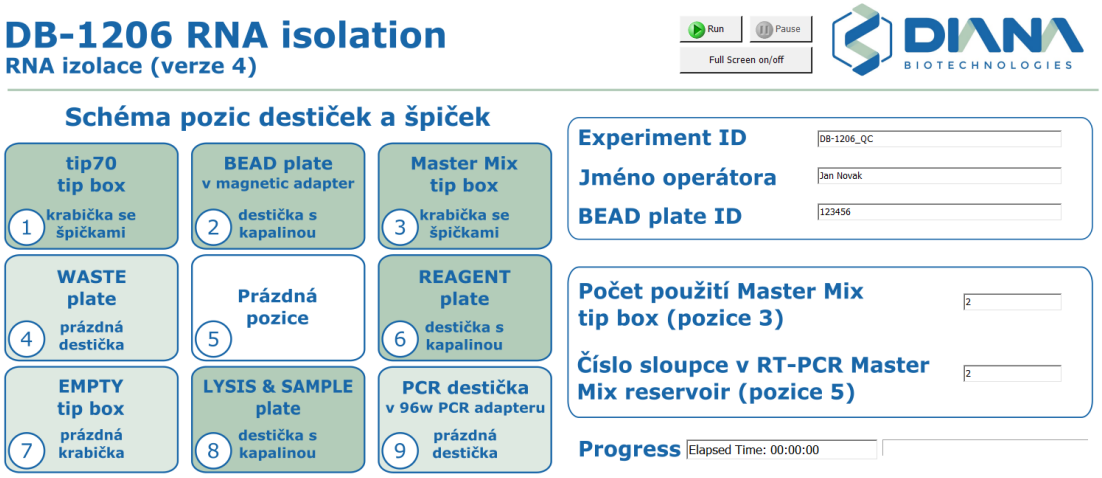
5.2 Spuštění RNA izolačního protokolu

5.2.1 Příprava pipetovací stanice Agilent Bravo

Po zapnutí pipetovací stanice je nutné provést kroky 1-6. Tyto kroky již není nutné provádět při opakování RNA izolace na již zapnuté a inicializované pipetovací stanici.

1. Zapněte pipetovací stanici Agilent Bravo.
2. Otevřete soubor **DIANA_RNA_Izolace** na ploše počítače.
3. Po objevení okna, ve kterém se Vás program ptá, zda inicializovat pipetovací stanici, klikněte na „**Yes**“.
4. Přihlaste se do programu VWorks, stisknutím tlačítka „OK“ (pole „User name“ a „Password“ nechte prázdná).
5. Po objevení okna, ve kterém se Vás program ptá, zda není v gripperu (robotická ruka na pipetovací hlavě) umístěna destička, klikněte na tlačítko „**Ignore and continue ...**“.
6. Po objevení okna, ve kterém se Vás program ptá, zda nejsou na pipetovací hlavě nasazené špičky s kapalinou, klikněte na tlačítko „**Retry**“.
7. Poté se automaticky objeví ovládací okno RNA izolačního protokolu (viz **Obrázek 1**).
8. Vyplňte pole “**Experiment ID**” a “**Jméno operátora**”.
9. Vyplňte pole “**BEAD plate ID**”. BEAD plate ID je unikátní číslo natištěné na krátké straně BEAD plate a slouží k jeho identifikaci pro případ potřeby uchování izolátů.
10. Vyplňte pole „**Počet použití Master Mix tip box (pozice 3)**“. Do pole vyplňte číslo v rozmezí 1-10 podle toho, po kolikáté používáte Master Mix tip box k přípravě PCR destičky (návod ke správnému určení čísla najdete v sekci 10.1).

11. Vyplňte pole „**Číslo sloupce v RT-PCR Master Mix reservoir (pozice 5)**“. Do pole vyplňte číslo v rozmezí 1-12 podle toho, do kterého sloupce RT-PCR Master Mix reservoir budete pipetovat RT-PCR mix pro přípravu PCR destičky (viz sekce 5.2.4).



Obrázek 1: Screenshot vyplněného ovládacího okna protokolu pro RNA izolaci

5.2.2 Umístění destiček a špiček do pipetovací stanice Agilent Bravo

Nejdříve vkládejte destičky a špičky do zadních pozic (pozice 1, 2 a 3) pipetovací stanice a postupujte směrem dopředu. Vyhněte se pohybu nad otevřenými destičkami nebo špičkami.

Následující kroky provádějte v nových čistých rukavicích (především ne v rukavicích, které byly použity při přípravě LYSIS&SAMPLE plate), abyste zamezili případným kontaminacím. Je nutné spustit RNA izolační protokol co nejdříve po odtrhnutí folie z REAGENT plate (nejpozději do 10 minut). Následující kroky začněte až poté, co si připravíte LYSIS&SAMPLE plate a přidáte do něj všechny vzorky a kontroly (viz sekce 3.7, 3.8 a 3.9).

1. Postupujte podle schématu “Schéma pozic destiček a špiček”, které se vám zobrazí v ovládacím okně protokolu (viz **Obrázek 1**).
2. Vložte čisté špičky **tip70 tip box do pozice 1** a **Master Mix tip box do pozice 3**. Odeberte víčka z obou špiček.
3. Opatrně strhněte folii z **BEAD plate** (dbejte na to, aby roztok zůstal na dně jamek).
4. Vložte **BEAD plate** na **pozici 2**, do již přítomného **Magnetic Adapter**.
5. Opatrně strhněte folii z **WASTE plate** a vložte jej na **pozici 4**.
6. Opatrně odstraňte folii z **REAGENT plate** (dbejte na to, aby roztok zůstal na dně jamek).
7. Vložte **REAGENT plate** na **pozici 6**.
8. Vložte prázdnou **PCR destičku** na **pozici 9**, do již přítomného **96w PCR adapter**.
9. Vložte prázdnou krabičku špiček **EMPTY tip box** na **pozici 7** a odeberte z ní víčko.
10. Jako poslední krok opatrně strhněte folii z **LYSIS&SAMPLE plate** a vložte jej na **pozici 8**. Odstranění fólie z LYSIS&SAMPLE plate musí být provedeno tak, aby se zabránilo možné kontaminaci jak okolního prostředí, tak sousedních vzorků na destičce. Fólii z LYSIS&SAMPLE plate strhněte a destičku uložte do pipetovací stanice vždy jako poslední destičku až ve chvíli, kdy všechny ostatní destičky a krabičky jsou na svých pozicích a bez fólií a víček. Takto se minimalizuje riziko kontaminace reagencií vzorky.

5.2.3 Spuštění RNA izolačního protokolu

Před spuštěním protokolu ještě jednou pečlivě zkontrolujte, že:

- všechny destičky, špičky a magnetický adapter jsou orientovány tak, že jejich popisky směřují na operátora,
- všechny destičky, špičky a magnetický adapter jsou na správných pozicích, tzn. čísla na jejich popiscích odpovídají pozicím, na kterých jsou uloženy,
- žádné destičky nebo špičky na sobě nemají víčko nebo fólii,
- destičky, špičky a magnetický adapter jsou správně usazeny ve svých pozicích,
- **při nedodržení těchto pokynů neproběhne izolace RNA správně**, navíc může dojít ke kolizi pipetovací hlavy potenciálně vedoucí k poškození stroje.

1. Zmáčkněte "Run" tlačítko

.
2. Po zmáčknutí "Run" tlačítka, se objeví nové okno. V pravém dolním rohu tohoto okna zmáčkněte tlačítko „Finish".
3. Objeví se nové okno, které rekapituluje rozložení destiček a špiček v pipetovací stanici.
4. Pokud jste již zkontrolovali, že jsou všechny destičky a špičky na správných místech, jsou správně usazené a že na sobě nemají folii nebo víčko, tak zmáčkněte tlačítko „Continue".
5. Tímto se spustí RNA izolační protokol, který zahrnuje následující kroky:
   i. test špiček z krabičky v pozici 1. Test trvá přibližně 20 sekund a **VYŽADUJE** přítomnost operátora (bližší popis procesu je uveden v příloze v sekci 10.2),
   ii. vzorek a lyzační pufr jsou promíchány v LYSIS&SAMPLE plate a následně přeneseny k magnetickým částicím do BEAD plate,
   iii. po inkubaci vzorku s částicemi, během kterého dochází k vazbě RNA na částice, je vzorek od částic odebrán do WASTE plate,
   iv. magnetické částice jsou následně promyty roztoky z REAGENT plate,
   v. izolovaná RNA je z částic eluována pomocí elučního roztoku,
   vi. v tento moment se do stroje vloží rezervoár s RT-PCR Master Mixem a je připravena PCR destička s rozpipetovaným Master Mixem.
   vii. izolovaná RNA v elučním roztoku je přenesena do PCR destičky.

6. **DŮLEŽITÉ: Osobně sledujte začátek protokolu (přibližně 1 minutu), abyste se ujistili, že Agilent Bravo pracuje správně. Stanice Bravo by měla provést následující kroky:**
   i. nabrání a test špiček z tip70 tip box na pozici 1,
   ii. nasátí kapaliny z BEAD plate na pozici 2,
   iii. vypuštění kapaliny do WASTE plate na pozici 4.

Pozn. Pro maximální časovou efektivitu RNA izolace doporučujeme po zapnutí a kontrole RNA izolačního protokolu na pipetovací stanici Bravo zahájit přípravu RT-PCR Master Mix reservoir (viz sekce 5.2.4).

7. Zhruba po 20 minutách běhu vás stroj vyzve, abyste vložili do pozice 5 RT-PCR Master Mix reservoir. Učiňte tak a pokračujte v protokolu kliknutím na tlačítko „Continue".
8. **DŮLEŽITÉ: Osobně sledujte nabrání špiček strojem z pozice 3. Stroj MUSÍ nabrat jeden sloupec špiček (8 špiček) na pravé straně pipetovací hlavy.** Po kontrole správného nabrání špiček pokračujte v protokolu kliknutím na tlačítko „Continue". Pokud stroj nabere jiné množství špiček, tak chybu napravte podle pokynů uvedených v sekci 10.3 nebo kontaktujte naši technickou podporu (viz zápatí).
9. Celý RNA izolační protokol i s přípravou destičky trvá přibližně 25 minut.
10. Poté co protokol skončí a objeví se okno „Protocol complete" klikněte na tlačítko „OK".
11. Po skončení protokolu se automaticky vygeneruje záznam o provedení protokolu obsahující název, aktuální čas a všechny informace vyplněné do polí ovládacího okna RNA izolačního protokolu. Záznam se propíše do souboru LOG_db1206.csv (Diana Biotech/Bravo Files/Log Files).

12. Výsledkem protokolu je připravená PCR destička.

Pozn. Na RT-PCR analýzu se spotřebuje 4,5 µl izolované RNA. Zbylá izolovaná RNA zůstává v jamkách BEAD plate spolu s magnetickými kuličkami a může být použita na další nezávislou RT-PCR analýzu. Pro dlouhodobé skladování přelepte BEAD plate mrazu odolnou folií a uložte do -80 °C.

5.2.4 Příprava RT-PCR Master Mix reservoir

Následující kroky 2 až 5 proveďte v prostoru odděleném od prostoru, kde pracujete se vzorky nebo s pozitivní kontrolou, a používejte jiné pipety. Takto zamezíte případné kontaminaci.

1. Připravte 1,6 ml RT-PCR Master Mixu podle pokynů výrobce tak, aby se výsledná reakce míchala v poměru 4.5 µl vzorku s 13.5 µl Master Mixu.

Pozn. V celkovém objemu RT-PCR Master Mixu je započítán veškerý potřebný mrtvý objem pro rozpipetování do destičky, tento objem lze připravit z jakékoliv soupravy pro 100 reakcí, která obsahuje alespoň 10% objemovou rezervu. Pokud váš kit tuto rezervu neobsahuje, můžete připravit pouze 1,5 ml Master Mixu, avšak v takovém případě bude rezervní objem pouze 60 µl.

2. Strhněte očíslovanou fólii z jednoho sloupce jamek (8 jamek) v RT-PCR Master Mix reservoir.
3. Napipetujte 180 µl RT-PCR master mixu do každé z osmi čerstvě odkrytých jamek. Pro přesné pipetování použijte výhradně 200 µl pipetu a metodu reverzního pipetování.
4. Zkontrolujte, že na dně jamek v RT-PCR Master Mix reservoir nejsou žádné bubliny.
5. Pokud přenášíte RT-PCR Master Mix reservoir k pipetovací stanici na delší vzdálenost, zakryjte RT-PCR Master Mix reservoir víčkem.
6. Až vás program během RNA izolace vyzve, vložte takto připravený RT-PCR Master Mix reservoir do pipetovací stanice Bravo do pozice 5. Pokud je na něm umístěno víčko, tak ho z rezervoáru po vložení do stroje sundejte.

5.2.5 Úklid destiček a špiček po skončení RNA izolačního protokolu

1. Vyjměte PCR destičku, pečlivě ji přelepte optickou PCR folií, vložte do qPCR cykleru a spusťte analýzu. Po spuštění analýzy ukliďte zbytek destiček v pipetovací stanici.
2. Zavíčkujte a vyhoďte do odpadu **EMPTY tip box** z **pozice 7**.
3. Opatrně vyjměte a vyhoďte do odpadu **LYSIS&SAMPLE plate** z **pozice 8**.
4. Opatrně vyjměte a vyhoďte do odpadu **WASTE plate** z **pozice 4**.

***DŮLEŽITÉ**: LYSIS&SAMPLE plate a WASTE plate mohou obsahovat virovou RNA, a proto musí být zlikvidovány způsobem, který bude minimalizovat možnost kontaminace okolí. Pokud je to možné, doporučujeme tyto destičky před vyhozením znovu zalepit folií nebo uzavřít do vodotěsného obalu (např. prázdný plastový sáček od použitého plastu a destiček, které jsou součástí kitu).*

4. Opatrně přikryjte víčkem a vyjměte **RT-PCR Master Mix reservoir** z **pozice 5** a uchovejte ho na další použití (rezervoár může být použit až na přípravu 12 PCR destiček).
5. Opatrně vyjměte a vyhoďte do odpadu **REAGENT plate** z **pozice 6**.
6. Opatrně vyjměte **BEAD plate** z pipetovací stanice z **pozice 2**. V destičce je přítomna izolovaná RNA v jamkách spolu s magnetickými kuličkami (kvadrant 3), která může být použita pro další RT-PCR analýzu. Pro skladování zalepte BEAD plate mrazu odolnou folií a skladujte při -20 °C (nanejvýš po dobu 30 dnů) nebo při -80 °C pro dlouhodobé skladování. Pokud BEAD plate nechcete skladovat, zlikviduje ho stejně jako WASTE plate.
7. Vyjměte **tip70 tip box** z **pozice 1**. Tuto krabičku od špiček nevyhazujte a použijte ji při dalším RNA izolačním protokolu jako EMPTY tip box. Popisek na této krabičce přelepte popiskem „**EMPTY tip box**“ (součást soupravy).

8. Zavíčkujte a vyjměte krabičku **Master Mix tip box** z **pozice 3.** Na přední straně krabičky **správně přeškrtněte číslo použití krabičky** a uchovejte na další použití (krabička může být použita až na 10 PCR destiček)
9. Pokud již daný den nebudete provádět RNA izolaci, zavřete celý program VWorks (aniž byste jej ukládali) a vypněte pipetovací stanici Agilent Bravo a počítač.

6 Obecný postup pro izolaci RNA

Níže je popsán podrobný postup pro izolaci RNA, dle kterého lze postupovat manuálně, či dle něj naprogramovat jiný pipetovací automat než Agilent Bravo.

1. **Smíchejte 120 µl lyzačního pufru** (připravené dle návodu v sekci 3.7) s **60 µl vzorku** a roztok řádně promíchejte.
2. **Ze stočeného a na magnet umístěného BEAD plate odeberte** od magnetických částic **20 µl roztoku**, který částice překrývá a přeneste ho do WASTE plate do kvadrantu 1.
3. **Přeneste 86 µl směsi vzorku a lyzačního pufru** do BEAD plate s magnetickými částicemi umístěný mimo magnetický stojánek.
4. Řádně **promíchejte** tak, aby se všechny magnetické částice dostaly do roztoku.
5. **Inkubujte** roztok s magnetickými částicemi po dobu **4 minut** (optimálně během této doby roztok několikrát promíchejte, abyste zabránili klesnutí magnetických částic na dno zkumavky).
6. **Přeneste BEAD plate na magnetický stojánek** a ponechte ho v něm, dokud všechny magnetické částice neklesnou na dno jamek (přibližně 1 minutu).
7. **Odeberte** z BEAD plate, stále umístěného na magnetickém stojánku, veškerý roztok (avšak bez magnetických částic) a přeneste ho do **WASTE plate do kvadrantu 3**.
8. Přeneste BEAD plate mimo magnetický stojánek a přidejte do něj **50 µl roztoku ze stočeného REAGENT plate z kvadrantu 1.**
9. Promíchejte magnetické částice s roztokem a **inkubujte 10 vteřin**.
10. **Přeneste BEAD plate na magnetický stojánek** a ponechte ho v něm, dokud všechny magnetické částice neklesnou na dno jamek (přibližně 30 vteřin).
11. **Odeberte** z BEAD plate, stále umístěného na magnetickém stojánku, veškerý roztok (avšak bez magnetických částic) a přeneste ho do **WASTE plate do kvadrantu 1**.
12. Přeneste BEAD plate mimo magnetický stojánek a přidejte do něj **50 µl roztoku z REAGENT plate z kvadrantu 2.**
13. Promíchejte magnetické částice s roztokem a **inkubujte 10 vteřin**.
14. **Přeneste BEAD plate na magnetický stojánek** a ponechte ho v něm, dokud všechny magnetické částice neklesnou na dno jamek (přibližně 30 vteřin).
15. **Odeberte** z BEAD plate, stále umístěného na magnetickém stojánku, veškerý roztok (avšak bez magnetických částic) a přeneste ho do **WASTE plate do kvadrantu 2**.
16. Přeneste BEAD plate mimo magnetický stojánek a přidejte do něj **50 µl roztoku z REAGENT plate z kvadrantu 4.**
17. Promíchejte magnetické částice s roztokem a **inkubujte 10 vteřin**.
18. **Přeneste BEAD plate na magnetický stojánek** a ponechte ho v něm, dokud všechny magnetické částice neklesnou na dno jamek (přibližně 30 vteřin).
19. **Odeberte** z BEAD plate, stále umístěného na magnetickém stojánku, veškerý roztok (avšak bez magnetických částic) a přeneste ho do **WASTE plate do kvadrantu 4**.
20. Otevřený **BEAD plate ponechte stát**, aby se odpařil zbytkový etanol (přibližně 8 minut)

21. Na následující kroky vždy použijte čisté špičky.
22. Přeneste BEAD plate mimo magnetický stojánek a přidejte do něj **25 µl roztoku z REAGENT plate z kvadrantu 3.**
23. Řádně promíchejte tak, aby se všechny magnetické částice dostaly do roztoku.
24. **Inkubujte** roztok s magnetickými částicemi po dobu **3 minut** (optimálně během této doby roztok několikrát promíchejte, abyste zabránili klesnutí magnetických částic na dno zkumavky).
25. **Přeneste BEAD plate na magnetický stojánek** a ponechte ho v něm, dokud všechny magnetické částice neklesnou na dno jamek (přibližně 1 minutu).
26. Na následující krok vždy použijte čisté špičky.
27. Opatrně **odeberte** z BEAD plate, stále umístěného na magnetickém stojánku, **4,5 µl roztoku**, který obsahuje izolovanou RNA, a přeneste jej do PCR destičky s napipetovaným master mixem a jednou promíchejte (během tohoto kroku nesmíte nabrat a přenést žádné magnetické částice).

7 Právní upozornění

V plném rozsahu povoleném zákony vaší jurisdikce, je DIANA Biotechnologies, a.s., zbavena odpovědnosti za jakékoli přímé nebo nepřímé škody spojené nebo vzniklé v souvislosti s tímto dokumentem a jeho použitím, jakož i za jakékoli přímé a nepřímé škody spojené nebo vzniklé v souvislosti se soupravou *Automated RNA Isolation Kit* a s jejím použitím.

V případě využití soupravy *Automated RNA Isolation Kit* v *in vitro* diagnostice společně s CE IVD certifikovanými RT-PCR soupravami jinými, než od společnosti DIANA Biotechnologies, a.s., připadá odpovědnost validovat proces uživateli.

DIANA Biotechnologies, a.s., je výlučným vlastníkem všech protokolů pro RNA izolaci a přípravu RT-PCR destiček pomocí pipetovací stanice Agilent Bravo referovaných v této příručce. Bez výslovného souhlasu autorizovaného zástupce DIANA Biotechnologies, a.s., je zakázáno poskytovat tyto protokoly třetím stranám.

8 Seznam kompatibilních souprav

REF DB-1211 COVID-19 Multiplex RT-PCR Kit

REF DB-1214 Agilent Bravo installation package for Automated RNA Isolation kit

REF DB-1225 Saliva Collection Set 1.4IM

REF DB-1230 Saliva Collection Set 1.4IF

REF DB-1250 RT-PCR Respiratory panel 1: SARS-CoV-2/Flu/RSV

REF DB-1252 RT-PCR Respiratory panel 2: SARS-CoV-2/Flu/RSV

REF DB-1254 COVID-19 Multiplex RT-PCR Kit

9 Použité grafické symboly

	Manufacturer / Výrobce
	Caution / Pozor (výstraha)
LOT	Lot Number / Kód dávky
	Operator´s manual, operating instructions / Čtěte návod k použití
REF	Catalogue Number / Katalogové číslo
x °C x °C	Temperature limit / Omezení teploty* (*pro X odpovídající konkrétní teplotě)
	Use by date / Použít do data
Σ n	Amount (No. of reactions) / Obsah postačuje pro <n> testů** (**pro n testů dle varianty kitu)
CE	CE marking / Prostředek označený CE značkou
IVD	Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro
CONT	Package contains/ Balení obsahuje
	Number of package/ Počet balení
VOL	Component volume/ Objem komponenty
Read SDS	Read safety data sheet/ Přečtěte si bezpečnostní listy

10 Příloha k automatizovanému protokolu s využitím pipetovací stanice Agilent Bravo

10.1 Návod na správné zvolení počtu použití Master Mix tip box

Na začátku RNA izolačního protokolu je nutné správně vyplnit pole „Počet použití Master Mix tip box (pozice 3)“.

Jak určit správné číslo použití Master Mix tip box?

VŽDY provádějte určení správného počtu použití Master Mix tip box pomocí minimálně dvou různých níže zmíněných způsobů (např. pomocí způsobu 1 a 2).

1. Na přední straně Master Mix tip box jsou očíslované sloupce špiček, která se po každém spuštěním protokolu proškrtávají. Použijte nepřeškrtnuté pole s nejnižším číslem.
2. V levé části krabičky (prvních 10 sloupců) jsou umístěny čisté špičky. Pipetovací stanice z těchto špiček postupně odebírá zleva doprava. Správné číslo počtu použití pomocí počítání ještě nepoužitých čistých špiček je rovno:

   11 - počet čistých špiček (levá část krabičky)

3. Pipetovací stanice postupně odebírá vždy jeden sloupec čistých špiček (8 špiček) zleva doprava. Správné číslo použití tedy lze spočítat z prázdných pozic v řadě čistých špiček, od levého okraje krabičky po první nepoužitou čistou špičku a je rovno:

   počet prázdných jamek (počítáno od levého okraje) +1

Příklady různých možných rozložení špiček v Master Mix tip box

„Počet použití Master Mix tip box“ = 1 (stav před prvním použití)

„Počet použití Master Mix tip box“ = 4 (stav před čtvrtým použití)

„Počet použití Master Mix tip box“ = 6 (stav před šestým použití)

„Počet použití Master Mix tip box“ = 10 (stav před posledním použití)

10.2 Test nabrání špiček před RNA izolací

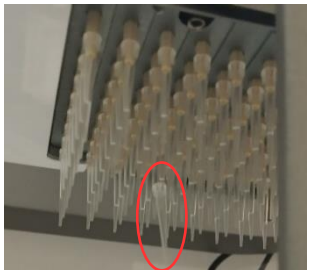
Špičky jsou dodávány třetí stranou, proto je potřeba provést test jejich kvality před samotným spuštěním protokolu RNA izolace. Může se stát, že jsou z výroby některé špičky v sousedních kvadrantech navzájem spojeny kouskem plastu, což by mělo zásadní vliv na samotný protokol. Test zahrnuje následující kroky a trvá přibližně 20 vteřin:

1. Nabrání špiček z krabičky tip70 tip box z kvadrantu 4.
2. Vizuální kontrola uživatelem, že 96 špiček z kvadrantu 4 bylo nabráno správně a že v krabičce tip70 tip box jsou všechny ostatní špičky ve zbývajících kvadrantech správně zarovnány. Správnost nabrání špiček potvrďte stisknutím tlačítka “Continue”.
3. Vrácení špiček a nabrání nových špiček z krabičky tip70 tip box z kvadrantu 1.
4. Vizuální kontrola uživatelem, že 96 špiček z kvadrantu 1 bylo nabráno správně a že v krabičce tip70 tip box jsou všechny ostatní špičky ve zbývajících kvadrantech správně zarovnány. Správnost nabrání špiček potvrďte stisknutím tlačítka “Continue”.

Řešení problému při testu špiček

Pokud stroj zvedne i špičky z jiného kvadrantu (viz **Obrázek 2**), postupujte následovně:

1. V rukavicích špičku pinzetou/rukou sundejte z pipetovací hlavy nebo seberte, pokud spadla. Pokud je na špičce viditelný plastový vlas, tak ho ze špičky odtrhněte. Špičku vraťte zpět do krabičky v pozici 1 na místo odkud ji stroj nabral.
2. Pokračujte v testu (kliknutím na tlačítko „Continue“).
3. Pokud je to nutné opakujte body 1-2 vícekrát.



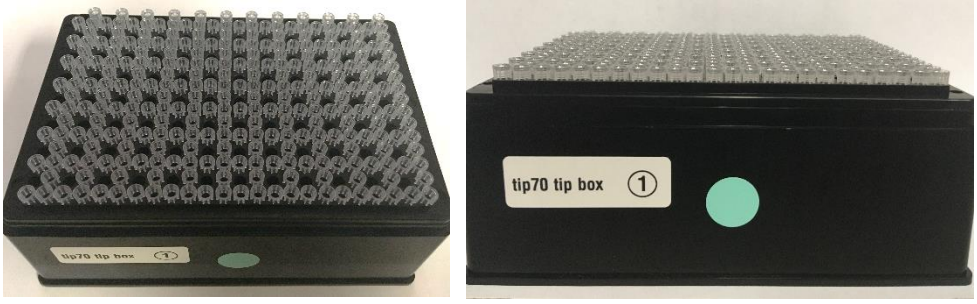
Obrázek 2

Kontrola krabičky se špičkami po skončení testu špiček

Po skončení testu se stroj zastaví s nabranými špičkami z kvadrantu 1 nad pozicí 2 a vyzve operátora k vizuální kontrole tip70 tip box krabičky špiček v pozici 1.

1. Zkontrolujte, že chybí pouze špičky nabrané strojem (tj. špičky z kvadrantu 1). Pokud chybí i jiné špičky, tak je najděte a vraťte zpátky do krabičky tak, aby krabička vypadala přesně jako na levém spodním **Obrázku 3**.
2. Zkontrolujte, že žádná ze špiček nevyčnívá (viz pravý spodní Obrázek 3)
3. **V případě, že rozložení a zarovnání špiček v krabičce v pozici 1 odpovídá obrázkům níže, klikněte na tlačítko “Continue”.**
4. Stroj bude pokračovat v RNA izolačním protokolu.

horní pohled **boční pohled**

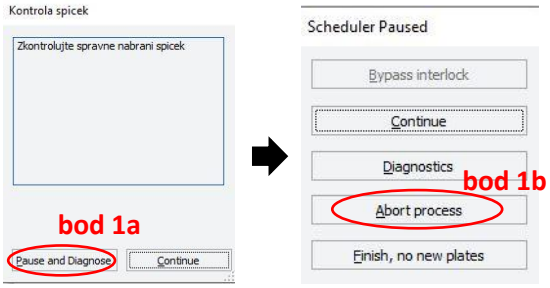


Obrázek 3

10.3 Návod na opravu špatně zadaného počtu použití Master Mix tip box

Po vložení RT-PCR Master Mix reservoir destičky do pozice 5 a nabrání špiček z Master Mix tip box se pipetovací stanice zastaví a vyzve uživatele, aby vizuálně zkontroloval správné nabrání špiček. **Stroj musí nabrat POUZE jeden sloupec špiček (8 špiček)**. V případě, že pipetovací stanice nenabere jiný počet sloupců špiček, tak postupujte podle návodu popsaného níže:

1. Klikněte na tlačítko „Pause and Diagnose“ (bod 1a). Otevře se nové okno s názvem „Scheduler Paused“ a zde klikněte na tlačítko „Abort process“ (bod 1b). Tím se ukončí izolační protokol.

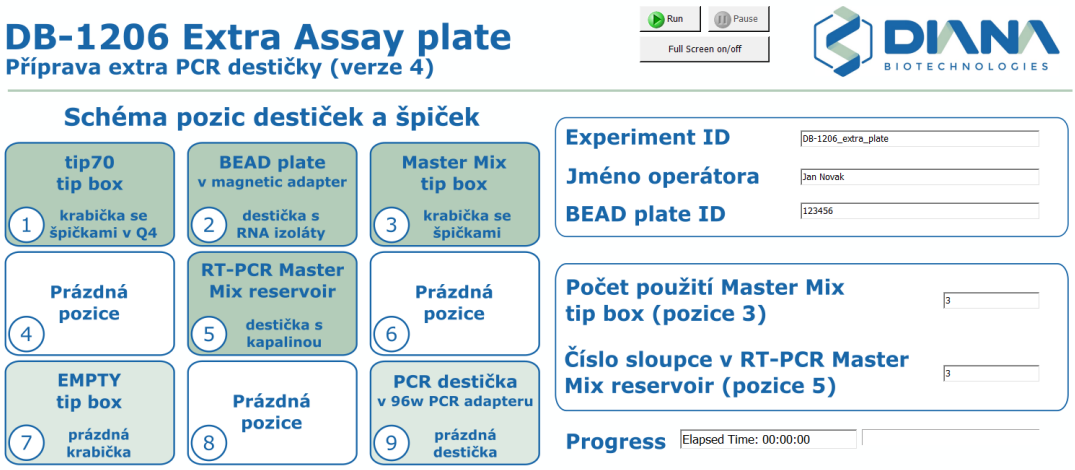


Obrázek 4

2. Celý program s izolačním protokolem DB-1206 zavřete.
3. Pokud jsou na pipetovací hlavě nabrané špičky, tak je v čistých rukavicích postupně za horní okraj špičky sundejte a vraťte zpět do Master Mix tip box na jejich původní místo.
4. Z plochy počítače spusťte protokol na rozpipetování nové PCR destičky DB-1206 „Extra Assay plate“ (viz sekce 10.4).

10.4 Návod na dodatečné napipetování PCR destičky

Pokud vznikne potřeba dodatečně analyzovat znovu celý běh izolace RNA pomocí qPCR, otevřete protokol uložený na ploše pod názvem „Extra Assay plate“. Do pipetovací stanice umístěte destičky a špičky podle schématu zobrazeném na **Obrázku 5**:



Obrázek 5

1. Použijte novou krabičku tip70 tip box a dejte ji do pozice 1.
2. Do pozice 2 umístěte BEAD plate s vyizolovanou RNA.
3. Do pozice 3 vložte Master Mix tip box.
4. Do pozice 5 RT-PCR Master Mix reservoir s napipetovaným Master Mixem v jednom sloupci.
5. Do pozice 7 umístěte prázdnou krabičku.
6. Do pozice vložte 9 PCR destičku v červeném PCR adapteru.
7. Vyplňte správné údaje do polí „Číslo sloupce RT CPR Master Mix reservoir“ a “Počet použití Master Mix tip box“ a stiskněte tlačítko run.
8. Dále postupujte jako v průběhu standartního protokolu.

10.5 Označení kvadrantů v 384 jamkové destičce

384 jamková destička může být virtuálně rozdělena do čtyř kvadrantů. Každý kvadrant obsahuje 96 jamek, které mají stejné rozložení jako 96 jamková destička. Pokud není řečené jinak, tak se kvadranty v 384 jamkové destičce číslují od 1 do 4 a to v pořadí zleva doprava a shora dolů. **Obrázek 6** ilustruje rozvržení čtyř kvadrantů v 384 jamkové destičce:

384wp	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
B	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4
C	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
D	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4
E	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
F	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4
G	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
H	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4
I	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
J	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4
K	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
L	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4
M	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
N	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4
O	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
P	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4

Obrázek 6: Rozvržení kvadrantů v 384 jamkové destičce. *Kvadrant 1 (Q1) zbarven modře obsahuje jamky A1, A3, …, O21, O23; Kvadrant 2 (Q2) zbarven zeleně obsahuje jamky A2, A4, … , O22, O24; Kvadrant 3 (Q3) zbarven červeně obsahuje jamky B1, B3, …, P21, P23 a Kvadrant 4 (Q4) zbarven bíle obsahuje jamky B2, B4, ..., P22, P24.*

Souhrnný zkrácený protokol

Příprava všech reagencií pro RNA izolaci

1. **Reagencie pro přípravu lyzačního pufru**: Lysis Buffer Concentrate a 100% Isopropanol (každého MIN 10 ml); Lysis Enhancer, RNA Carrier a DTT Concentrate (každého MIN 110 µl); 126 µl RNA izolační kontroly, 1 ks 50 ml zkumavka; 1 ks 25 ml rezervoár; 2 ks adhezivní fólie, 1 ks předděrované fólie (vše kromě isopropanolu je součástí soupravy)
2. **Destičky** (vždy po jednom kusu): BEAD plate, REAGENT plate, WASTE plate, LYSIS&SAMPLE plate a minimálně jeden zalepený sloupec v RT-PCR Master Mix reservoir a PCR destička (vše kromě PCR destičky je součástí soupravy)
3. **Špičky**: 1× 70 µL špičky (zelené ●), 1× Master Mix tip box, 1× prázdná krabička

Příprava destiček pro RNA izolaci

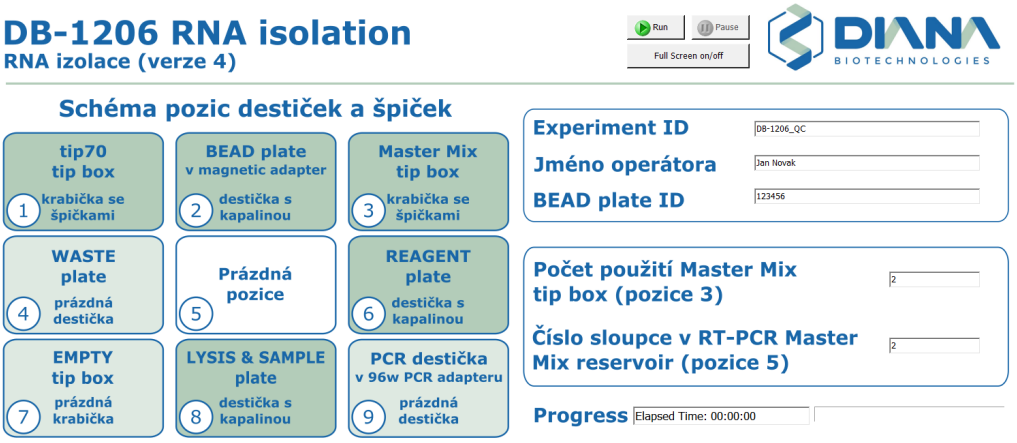
1. Promíchejte lahvičku s Lysis Buffer Concentrate a zkontrolujte, zda se v ní nevytvořil precipitát. Pokud ano, vložte lahvičku na 1 hodinu do 37 °C, poté promíchejte a zkontrolujte, že se precipitát rozpustil.
2. Stočte BEAD plate a REAGENT plate 200× g po dobu 15 sekund.
3. Zmražené roztoky nechte před použitím rozmrznout, stočte, zvortexujte a znovu stočte. Pracujte s nimi při pokojové teplotě a po použití je znovu zamrazte.
4. Podle tabulky uvedené níže připravte v 50 ml zkumavce lyzační pufr, jednotlivé složky přidávejte v určeném pořadí.

Pořadí přidání	Složka	Objem vzorku [µl]	Barva víčka
		1 destička (96 vzorků)	
1	Lysis Buffer Concentrate	9 000	
2	Lysis Enhancer	110	
3	RNA Carrier	110	
4	DTT concentrate	110	
5	100 % Isopropanol	5 700	
několikrát obraťte dnem vzhůru a zpět pro **DŮKLADNÉ PROMÍCHÁNÍ**			
6	RNA izolační kontrola	126	5
několikrát obraťte dnem vzhůru a zpět pro **DŮKLADNÉ PROMÍCHÁNÍ**			

5. Rozpipetujte 120 µl kompletního lyzačního pufru do LYSIS&SAMPLE plate a destičku zalepte předděrovanou fólií (pre-pierced seal), která je součástí soupravy.
6. Připravte si vzorky, které budou analyzovány, včetně odpovídajících kontrol.
7. Skrze předděrovanou fólii do každé jamky přidejte 60 µl vzorku přímo do lyzačního pufru (nepipetujte vzorek po boční stěně jamky). Po přidání posledního vzorku destičku zalepte čistou adhezivní fólií (general adhesive seal), která je součástí soupravy.

Provedení RNA izolace na přístroji Agilent Bravo

1. Zapněte pipetovací stanici Agilent Bravo.
2. Otevřete soubor **DIANA_RNA_Izolace** na ploše počítače.
3. Inicializujte pipetovací stanici a přihlaste se do programu VWorks.
4. Umístěte na pozice v pipetovací stanici destičky a špičky podle schématu (viz obrázek).
   i. Z destiček nejdříve sundejte fólii a až poté je vložte do pipetovací stanice.
   ii. Z krabiček se špičkami sundejte víčko.



5. Vyplňte všechna potřebná pole v ovládacím panelu protokolu.
6. Klikněte na tlačítko “Run” a následně „Finish“ a poté „Continue“.
7. Protokol RNA izolace se spustí a bude trvat přibližně 25 minut.
8. **DŮLEŽITÉ: Pečlivě pozorujte první dva kroky RNA izolačního protokolu:**
   i. Testovací nabrání všech špiček z pozice 1. V případě nesprávného nabrání špiček postupujte podle pokynů popsaných v příloze v sekci 10.2.
   ii. Přenesení kapaliny z BEAD plate v pozici 2 do WASTE plate v pozici 4.
9. Asi po 20 minutách se protokol zastaví a vyzve uživatele k vložení RT-PCR Master Mix reservoir s napipetovaným Master Mixem v jednom sloupci do pozice 5.
10. **DŮLEŽITÉ: Zkontrolujte správné nabrání špiček pro rozpipetování RT-PCR Master Mixu** (v případě nesprávného nabrání špiček postupujte podle pokynů v kapitole 10.3).
11. Po skončení protokolu vyjměte z pipetovací stanice PCR destičku z pozice 9, přelepte ji PCR fólií a proveďte analýzu na PCR cykleru.
12. Poté ukliďte všechny pozice na pipetovací stanici Bravo. Vyhoďte zavíčkovaný EMPTY tip box, LYSIS&SAMPLE plate, WASTE plate a REAGENT plate. Zavíčkujte RT-PCR Master Mix reservoir a uchovejte pro další izolaci. BEAD plate zalepte mrazu odolnou folií a uchovejte při -80°C. Tip70 tip box přelepte nápisem „EMPTY tip box“ a použijte při další RNA izolaci.
13. Odškrtněte použití krabičky Master Mix tip box a ponechte ji ve stanici pro další izolaci.
14. Pokud již nebudete daný den provádět RNA izolaci, vypněte program a pipetovací stanici.

Příprava RT-PCR Master Mix reservoir

1. Všechny roztoky nechte před použitím rozmrznout, stočte, zvortexujte a znovu stočte.
2. Připravte 1,5 až 1,6 ml RT-PCR Master Mixu podle pokynů výrobce v takové koncentraci, aby se PCR reakce míchala v poměru 4.5 µl vzorku s 13.5 µl RT-PCR Master Mixu.
3. Odstraňte jeden proužek (sloupec osmi jamek) folie z RT-PCR Master Mix reservoir a napipetujte do každé jamky tohoto sloupce 180 µl připraveného RT-PCR Master Mixu.