



DB-1206

**Automated RNA Isolation Kit
for Agilent Bravo**

Uživatelská příručka

Verze: DB-1206-006-200814

Revize: 2.6 CZE

Poslední aktualizace: 31.8.2020

REF DB-1206-10x96rxns



Obsah

1 Úvod	3
1.1 Účel a použití soupravy	3
1.2 Kontroly pro použití se soupravou	3
1.3 Obecné upozornění	3
1.4 Bezpečnostní upozornění	4
2 Seznam materiálu	5
2.1 Požadované laboratorní vybavení	5
2.2 Požadovaný materiál, který není součástí soupravy	5
2.3 Materiál, který je součástí soupravy	6
2.4 Stabilita jednotlivých složek soupravy	6
3 Příprava reagensí pro RNA izolaci	7
3.1 Obecné postupy	7
3.2 Shromáždění potřebných reagensí pro RNA izolaci	7
3.3 Označení krabiček se špičkami	7
3.4 Příprava Lysis Buffer Concentrate	8
3.5 Příprava REAGENT plate and BEAD plate	8
3.6 Příprava vzorku	8
3.7 Příprava lyzačního pufru	8
3.8 Přidání vzorků do LYSIS&SAMPLE plate	10
3.9 Kontroly pro použití se soupravou	11
4 Protokol pro automatizovanou izolaci RNA	12
4.1 Obecné informace	12
4.2 Spuštění RNA izolačního protokolu	12
5 Protokol pro přípravu RT-PCR destičky	15
5.1 Obecné informace	15
5.2 Příprava RT-PCR Master Mix rezervoáru	15
5.3 Spuštění protokolu na přípravu RT-PCR destičky	16
6 Právní upozornění	19
7 Seznam kompatibilních souprav	19
8 Použité grafické symboly	20
9 Příloha	21
9.1 Označení kvadrantů v 384 jamkové destičce	21
9.2 Úklid pipetovací stanice Agilent Bravo v případě, že se RT-PCR destička nebude připravovat	21
Souhrnný protokol	22



1 Úvod

1.1 Účel a použití soupravy

Automated RNA Isolation Kit for Agilent Bravo slouží k izolaci celkové RNA z biologických vzorků za použití pipetovací stanice Agilent Bravo. Tato souprava je také vhodná k izolaci RNA viru SARS-CoV-2 (COVID-19) z klinických vzorků, kdy získaná RNA je následně analyzována pomocí RT-PCR za cílem detekovat sekvence RNA viru SARS-CoV-2. Pro tento účel je v kombinaci s použitím této soupravy doporučen *COVID-19 Multiplex RT-PCR Kit* (kat.č. DB-1211).

Souprava je vhodná k izolaci celkové RNA z Copan Universal Transport Media (virové transportní medium, VTM) nebo z fosfátového pufru (PBS), a to i s přidavkem ředěných slin (až 50 %), sputa (až 50 %), či plné krve, séra nebo plazmy (až 10 %). Souprava byla testována i na kultivovaném SARS-CoV-2 viru. Validována byla i pro izolaci SARS-CoV-2 RNA z lidských klinických vzorků: (i) nosohltanového stěru vytřepaného do virového transportního media nebo PBS a (ii) slin. Je však vždy nutné, aby uživatel soupravu validoval pro konkrétní typ vzorku a konkrétní použití za použití pozitivních a negativních kontrol.

Jedna souprava obsahuje veškeré reagenty 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 96-jamkovém formátu). Souprava navíc obsahuje plastik pro přípravu RT-PCR destičky pro analýzu izolované RNA na real-time PCR přístroji pomocí protokolu „DIANA RT-PCR destička“ (popsáno v kapitole 5). Oba protokoly jsou součástí *Agilent Bravo installation package for Automated RNA Isolation kit* (kat.č. DB-1214).



Tato souprava pokrývá pouze laboratorní metodu izolace RNA z biologických vzorků a nemá tak sama o sobě žádný přímý diagnostický výstup. V případě využití v *in vitro* diagnostice (IVD) společně s CE IVD certifikovanými RT-PCR soupravami připadá zodpovědnost validovat proces izolace RNA uživateli.

1.2 Kontroly pro použití se soupravou

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



1.3 Obecné upozornění

Pro zabránění kontaminace jednotlivých vzorků je nutné dodržovat správnou laboratorní praxi, a to včetně používání jednorázových 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. Nepipetujte roztoky přímo ze zásobních lahví, potřebný objem si předem odlijte do vhodného rezervoáru a roztoky nikdy nevracejte zpět do lahví.



1.4 Bezpečnostní upozornění

Tato souprava je určena pouze pro profesionální použití. Dodržujte proto obecné zásady chemické bezpečnosti. Používejte ochranné pomůcky (rukavice, brýle), zamezte přímému kontaktu s chemikáliemi a vyvarujte se jídlu nebo pití v laboratořích.



Lysis Buffer Concentrate a REAGENT plate obsahují guanidium isothiokyanát, který je toxický. K roztokům ani odpadním lahvám obsahujícím tyto roztoky nesmí být přidáno SAVO nebo jiné kyseliny! Důsledkem by byla tvorba toxického plynu. **BEAD plate a REAGENT plate obsahují roztoky s nejvýše 0,05 % azidu sodného, který je toxický** a při styku s kyselinami může produkovat toxický plyn. **REAGENT plate obsahuje roztoky s nejvýše 80% etanolem, které jsou hořlavé.** Příslušné bezpečnostní listy Vám budou zaslány na vyžádání.



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



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



2 Seznam materiálu

2.1 Požadované laboratorní vybavení

- Kalibrované jednonálové / multikanálové pipety
- Stolní centrifuga pro standardní SBS destičky (minimální rychlost otáček 200x g)
- Stolní centrifuga na 1,5 a 2 ml zkumavky
- Třepačka na zkumavky/vortex
- Rukavice a jiné ochranné prostředky
- Doporučené: Automatická stanice pro zalepení destiček (termální sealer)

2.1.1 Pipetovací stanice Agilent Bravo

Tato souprava je vyrobena k použití na pipetovací stanici Agilent Bravo s pipetovací hlavou 96ST, s 6 základními a 3 přesnými pozicemi (alignment stations), na které jsou instalovány protokoly „DIANA RNA izolace“ a „DIANA RT-PCR destička“, které jsou součástí *Agilent Bravo installation package for Automated RNA Isolation kit* (kat.č. DB-1214).

Tento manuál je určen pro uživatele, kteří disponují základními znalostmi tohoto přístroje a umí ho ovládat. Doporučujeme všem uživatelům pipetovací stanice Agilent Bravo, aby se před jejím užíváním seznámili alespoň se základní uživatelskou příručkou k pipetovací stanici Agilent Bravo (Quick Guide Manual, G5409-90020A_EN).

2.2 Požadovaný materiál, který není součástí soupravy

- 100% Isopropanol
- Jednorázové pipetovací špičky (doporučujeme špičky s filtrem)
- Prázdňá originální Agilent Bravo krabička od špiček používaných v této soupravě – je součástí *Installation package for Automated RNA Isolation* (kat.č. DB-1214)
- Doporučené: folie k utěsnění ELUTION plate v případě jejího dlouhodobého skladování
- 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 cykly). 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

Složky soupravy	Množství	Podmínky skladování	Číslo boxu ^[7]	Barva víčka
Lysis Buffer Concentrate ^[1,2]	1x 110 mL	18-30 °C	1	
REAGENT plate ^[1,2]	10 kusů	18-30 °C	1 ^[8]	
ELUTION plate ^[3]	10 kusů	18-30 °C	1 ^[8]	
WASTE plate ^[3]	10 kusů	18-30 °C	1 ^[8]	
LYSIS&SAMPLE plate ^[3]	10 kusů	18-30 °C	1 ^[8]	
RT-PCR Master Mix reservoir s víčkem ^[3]	1 kus	18-30 °C	1	
50 mL zkumavka pro lyzační pufr ^[3]	10 kusů	18-30 °C	1 ^[8]	
25 mL rezervoár pro lyzační pufr ^[3]	10 kusů	18-30 °C	1 ^[8]	
Agilent Bravo 30 µL špičky (384)	10 balení	18-30 °C	1	
Agilent Bravo 70 µL špičky (384)	10 balení	18-30 °C	1	
Labels for non-labeled consumables ^[2,4]	1 balení	18-30 °C	1	
General adhesive seal (adhezivní folie)	20 kusů	18-30 °C	1	
Pre-pierced seal (předděrované folie)	10 kusů	18-30 °C	1	
BEAD plate ^[2]	10 kusů	2-8 °C ^[5]	2	
Lysis Enhancer	2x 650 µL	-20 °C ^[6]	3	
RNA Carrier	2x 650 µL	-20 °C ^[6]	3	
DTT Concentrate	2x 650 µL	-20 °C ^[6]	3	



[1] – Uchovávejte na temném místě

[2] – Před použitím si přečtěte kapitulu 3 (Příprava reagensí)

[3] – Prázdný spotřební materiál, který je součástí soupravy

[4] – Polepky (labels) pro označení krabiček se špičkami (30 µL, 70 µL, prázdná krabička – EMPTY tip box) a pro označení PCR destičky (Assay plate)

[5] – Nikdy nemrazit! Zmrazené magnetické kuličky 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 po jednu izolaci

2.4. Stabilita jednotlivých složek soupravy

2.4.1 Lyzační pufr

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

2.4.2 DTT Concentrate, Lysis Enhancer a RNA Carrier

Minimalizujte počet opakovaného mrazení a rozmrazování a minimalizujte dobu, po kterou jsou roztoky rozmrazené. Nikdy nepřekračujte čtyři cykly přemrazování, v případě vícenásobného použití je rozdělte do menších jednorázových alikvotů.

2.4.3 BEAD plate

Stočený BEAD plate je stabilní po dobu 8 hodin při laboratorní teplotě.



3 Příprava reagensií pro RNA izolaci

3.1 Obecné postupy

- Nepoužívejte součásti soupravy, které jsou při přijetí poškozené nebo rozmrazené. Ušchovejte je pro případnou reklamaci a kontaktujte výrobce.
- 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.
- Nemíchejte složky z různých šarží souprav (číslo šarže je uvedeno na obalu).
- Jakékoliv zamražené roztoky před použitím nechte kompletně rozmraznout, poté je stočte, promíchejte (krátkým vortexováním) a znovu stočte, až poté je možné je otevřít a použít.
- Vždy strhávejte folie z destiček opatrně tak, aby v nich předpřipravená kapalina zůstala na dně jamek, zamezte jakékoliv prudké pohyby a klepnutí s destičkou o stůl atp.

3.2. Shromáždění potřebných reagensií pro RNA izolaci

1. Z mrazáku vyndejte jednu zkumavku **Lysis Enhancer** (fialové víčko ●), **RNA Carrier** (modré víčko ●) a **DTT Concentrate** (žluté víčko ●). Zkumavky nechte rozmraznout. DTT Concentrate ponechte na pokojové teplotě (při umístění na led roztok znovu ztuhne) zatímco Lysis Enhancer a RNA Carrier umístěte na led.
2. Z lednice vyndejte jeden **BEAD** plate.
3. Vyndejte jedno balení izolačního kitu, která obsahuje většinu reagensií skladovaných při pokojové teplotě nutných k provedení jedné RNA izolace, jmenovitě: **REAGENT** plate, **ELUTION** plate, **WASTE** plate, **LYSIS&SAMPLE** plate, 50 mL zkumavku, 25 mL rezervoár
4. Připravte si RNA izolační kontrolu a případně také pozitivní kontrolu. V případě, že používáte soupravu COVID-19 Multiplex RT-PCR Kit (kat.č. DB-1211) z mrazáku vyndejte zkumavku RNA Isolation control (červené víčko ● s číslem 5) a Positive control (žluté víčko ● s číslem 4). Obě zkumavky nechte rozmraznout a poté umístěte na led.

3.3 Označení krabiček se špičkami

V soupravě jsou přiloženy štítky, které použijte pro označení špiček. Špičky jsou dodávány v originálním balení od výrobce.

1. Na krabičku s 30 µL špičkami označenou modrým kolečkem nalepte štítek „tip30 tip box“.
2. Na krabičku s 70 µL špičkami označenou zeleným kolečkem nalepte štítek „tip70 tip box“.

Pozn. Doporučujeme při rozbalení soupravy nalepit přiložené popisky na všechny krabičky se špičkami.

3. Na prázdnou krabičku od špiček nalepte popisek „EMPTY tip box“. Při opakovaném použití soupravy si vytvoříte EMPTY tip box na konci každého protokolu DIANA RT-PCR destička (popsáno v sekci 5.3.4).



3.4 Příprava Lysis Buffer Concentrate



V Lysis Buffer Concentrate se může během transportu nebo skladování v teplotách pod 18 °C objevit precipitát. 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 REAGENT plate and BEAD plate

1. Před použitím stočte **REAGENT plate** 200x g po dobu 1 min.
2. Před použitím stočte **BEAD plate** 200x g po dobu 1 min.

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

3.6 Příprava vzorku

Před přidáním vzorků do lyzačního pufru považujte veškerý materiál za potenciálně infekční. Dbejte bezpečnosti práce s infekčním biologickým materiálem, používejte odpovídající ochranné pomůcky a se vzorky pracujte pouze v k tomu určených prostorech.

3.6.1 Nosohltanové výtěry

Pro izolaci RNA z nosohltanového výtěru v mediu nebo pufru, zvortexujte odběrovou zkumavku s mediem nebo puftrem a odběrovou tyčinkou uvnitř po dobu 1 minuty a krátce stočte.

3.6.2 Jiné druhy biologických matic

Pro izolaci RNA z jiných biologických matic použijte standardní postup pro přípravu vzorků.

Volitelné: Pro snížení infekčnosti lze vzorek před přidáním do lyzačního pufru tepelně inaktivovat při 65 °C po dobu 10 až 30 minut. Je však nutné pro každý typ analyzované RNA a biologické matrice vyzkoušet vliv na výtěžnost izolace. Pro SARS-Cov-2 detekci z nosohltanového výtěru ve VTM jsme pozorovali pokles signálu o 1 až 3 cykly.

3.7 Příprava lyzačního pufru




1. Připravte si lyzační pufr vždy čerstvý přímo před použitím a v dostatečném množství

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




2. Lysis Enhancer, RNA Carrier a DTT Concentrate jsou zmražené a před použitím je nutné je zcela rozpustit. RNA Carrier a Lysis Enhancer vždy rozmrazujte a při práci ponechte na ledu, zatímco DTT Concentrate na pokojové teplotě. Pro dosažení homogenity před použitím jednotlivé komponenty vždy stočte ve stolní centrifuzě, zvortexujte a znovu stočte.



Pozn. V případě, že se bude připravovat lyzační pufr vícekrát během jednoho dne, tak rozmrazené Lysis Enhancer, RNA Carrier ponechte na ledu a DTT Concentrate na pokojové teplotě. Každá vialka obsahuje roztok na 5 izolací 96 vzorků. Pro lepší přehlednost doporučujeme si označovat kolikrát byl daný roztok použit. Po použití umístěte roztoky zpět do -20 °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 také tabulka 1):
 - 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. Odhodte špičku.
 - c) Do stejné zkumavky přidejte novou špičkou přímo do roztoku **110 µL RNA Carrier** (modré víčko ) a špičku jednou propláchněte. Odhodte špičku.
 - d) Do stejné zkumavky přidejte novou špičkou přímo do roztoku **110 µL DTT Concentrate** (žluté víčko ) a špičku jednou propláchněte. Odhodte špičku.
 - e) Do stejné zkumavky odpipetujte **8,2 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 alikvoty).
 - g) **Volitelné:** pokud chcete provést negativní kontrolu pro RNA izolační kontrolu (sekce 3.9.2), odeberte 140 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. Odhodte 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.

Tabulka 1: Seznam chemikálií pro přípravu lyzačního pufu

Pořadí přidání	Složka	Objem vzorku [µl]	Barva víčka
		1 destička (96 vzorků)	
1	Lysis Buffer Concentrate	9 000	
2	Lysis Enhancer ^[1]	110	
3	RNA Carrier ^[1]	110	
4	DTT concentrate	110	
5	100 % Isopropanol ^[2]	8 200	
několikrát obraťte dnem vzhůru a zpět pro důkladné promíchání			
6	RNA izolační kontrola ^[1,2,3]	126	
několikrát obraťte dnem vzhůru a zpět pro důkladné promíchání			

[1] – Po rozmrnutí uchovávejte na ledu

[2] – Není součástí soupravy

[3] – Pokud nepoužíváte RNA izolační kontrolu, tak tento krok vynechte



*Pozn. 1: V případě, že používáte izolační kontrolu ze soupravy COVID-19 Multiplex RT-PCR Kit (kat.č. DB-1211), tak jako RNA izolační kontrolu použijte neřaděný roztok z vialky **Isolation control** (červené víčko ● označené číslem 5). Pokud používáte jinou izolační kontrolu, připravte ji podle pokynů výrobce a dořeďte na výsledný objem 126 μ L ultra čistou vodou.*

Pozn. 2: Uvedené objemy již zahrnují mrtvý objem kapaliny (ve skutečnosti jsou udané objemy dostatečné pro analýzu 126 vzorků), není tedy třeba objem zvyšovat. Zde popsáný návod je 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.

5. Nalijte připravený lyzační pufr do plastového rezervoáru (součást soupravy, kapacita 25 mL) a **rozpipetujte 140 μ L lyzačního pufru na dno všech jamek do LYSIS&SAMPLE plate** pomocí 200 μ L multikanálové pipety.



DŮLEŽITÉ: Rozpipetování 140 μ L 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.

6. Pokud budete přidávat vzorek do LYSIS&SAMPLE plate do 30 minut od jeho přípravy, tak destičku přelepte předděřovanou folií. Pokud by se vzorky přidávaly později, tak nejdříve přelepte LYSIS&SAMPLE plate obyčejnou adhezivní folií (takto může destička stát až 8 hodin). Poté před přidáním vzorku tuto folii strhněte a destičku přelepte předděřovanou folií.

3.8 Přidání vzorků do LYSIS&SAMPLE plate

1. Skrze předděřovanou folii napipetujte **60 μ L vzorku do příslušné jamky v LYSIS&SAMPLE plate. Vzorek pipetujte přímo DO lyzačního pufru, ne na stěnu destičky.**

Pozn. Vyhněte se opakovanému či prudkému pipetování, které může způsobit vznik bublin v roztoku. Vzorek není nutné s lyzačním pufrem promíchat, jelikož toto promíchání proběhne během izolačního protokolu v pipetovací stanici Agilent Bravo.

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 folií, která je součástí soupravy.
5. Celková doba práce s LYSIS&SAMPLE plate, který je přelepený pouze předděřovanou folií **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 folií otřete isopropanolem nebo ethanolem, dbejte přitom aby kapalina zůstala na dně jamek (destičku nijak nenaklánějte a neotáčejte).
7. Takto připravenou a zalepenou destičku stočte 200x 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 sledována účinnost izolace RNA a 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 1. Návod k interpretaci výsledků při použití RNA izolační kontroly je popsán v manuálu k dané RT-PCR soupravě. K této RNA izolační soupravě doporučujeme použít RNA izolační kontrolu (červené víčko ● označené číslem 5) ze soupravy *COVID-19 Multiplex RT-PCR Kit* (kat.č. DB-1211).

Negativní kontrola izolace: pro ověření, že během manipulace nedošlo ke kontaminaci žádné reagensie cílovou RNA či DNA přidejte do jedné izolace místo testovaného vzorku buď známý negativní vzorek nebo čisté medium. 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 Positive control (žluté víčko ● s číslem 4), která je součástí *COVID-19 Multiplex RT-PCR Kit*, kat.č. DB-1211). 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 reagensii 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 medium, 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 Protokol pro automatizovanou izolaci RNA

4.1 Obecné informace

1. Pro zajištění správného fungování protokolu je nutné, aby pipetovací stanice Agilent Bravo měla nainstalovány 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.
2. Na pipetovací stanici Agilent Bravo musí být také předem instalovány zde popsané protokoly, což zajišťuje DIANA Biotechnologies s.r.o. 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.
3. Pro dlouhodobě spolehlivé fungování je nutná pravidelná údržba a testování pipetovací stanice Agilent Bravo, které zajišťuje autorizovaný servis prodejce přístroje.
4. Izolace RNA by měla být prováděna při pokojové teplotě (přibližně 18-25 °C)
5. Níže popsané kroky provedou RNA izolaci z 96 vzorků najednou. Výsledkem protokolu je 18 µL izolované RNA v každé jamce ELUTION plate. Během celého protokolu izolace RNA zůstávají zachovány pozice vzorků jako v původním LYSIS&SAMPLE plate.

4.2 Spuštění RNA izolačního protokolu

4.2.1 Příprava pipetovací stanice Agilent Bravo

1. Zapněte pipetovací stanici Agilent Bravo.
2. Otevřete soubor **DIANA_RNA_Izolace** na ploše počítače

Pozn. Při instalaci RNA izolačního protokolu vám bude vytvořena ikona s výše uvedeným názvem na ploše počítače ovládající pipetovací stanici. Pokud tuto ikonu nenaleznete, tak můžete správný soubor najít v adresáři C:\DIANA Biotech\Bravo files\Protocol Files. Zde otevřete soubor s názvem DIANA_RNA_isol_DB-1206_v2.x (pokud máte k dispozici více protokolů se stejným názvem, vždy použijte nejaktuálnější dostupnou verzi protokolu).

3. Inicializujte pipetovací stanici a přihlaste se do programu VWorks.

Pozn. Pokud se stanice inicializuje poprvé od jejího zapnutí, objeví se postupně dvě zprávy, které je potřeba odkliknout. V prvním okně (otázka zda není v gripperu umístěna destička) klikněte na „Ignore and continue...“ a v druhém okně (otázka zda jsou na pipetovací hlavě nasazeny špičky s kapalinou) klikněte na „Retry“.

4. Automaticky se objeví ovládací okno RNA izolačního protokolu (viz. obrázek 1).
5. Vyplňte pole “Experiment ID”, “Operator Name” a “Elution plate ID” (Elution plate ID je unikátní číslo natištěné na krátké straně každého ELUTION plate a slouží k jeho identifikaci).



DIANA RNA izolace



Schéma pozic destiček a špiček v pipetovací stanici Bravo

tip70 tip box (krabička se špičkami) 1	BEAD plate v magnetic adapter (destička s kapalinou) 2	tip30 tip box (krabička se špičkami) 3	Experiment ID	QC-DB-1206
WASTE plate (prázdna destička) 4	Prázdna pozice 5	REAGENT plate (destička s kapalinou) 6	Jméno operátora	Jan Novak
empty tip box (prázdna krabička od špiček) 7	LYSIS & SAMPLE plate (destička s kapalinou) 8	ELUTION plate (prázdna destička) 9	Elution plate ID	1234
			Progress	Elapsed Time: 00:00:00

Obrázek 1: Screenshot ovládacího okna protokolu pro RNA izolaci

4.2.2 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 (nejdéle do 10 minut). S následujícími 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 “Labware Position Layout”, které se vám zobrazí v ovládacím okně protokolu, viz. Obrázek 1.
2. Vložte čisté špičky **tip70 tip box** do **pozice 1** a čisté špičky **tips30 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. Opatrně odstraňte folii z **ELUTION plate** a vložte jej na **pozici 9**.
9. Vložte prázdnu krabičku špiček **EMPTY tip box** na **pozici 7** a odeberte z ní víčko.
10. Opatrně strhněte folii z **LYSIS&SAMPLE plate** a až poté jej vložte do **pozice 8**. Odstranění případné folie z LYSIS&SAMPLE plate musí být provedeno tak, aby se zabránilo možné kontaminaci jak okolního prostředí, tak sousedních vzorků na destičce. Folii 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 folií a víček. Takto se minimalizuje riziko kontaminace reagentů vzorky.

4.2.3 Provedení RNA izolačního protokolu

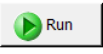


Před spuštěním protokolu ještě jednou pečlivě zkontrolujte, že:

- 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 folii,
- 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. vzorek a lyzační pufr jsou promíchány v LYSIS&SAMPLE plate a následně přeneseny k magnetickým kuličkám do BEAD plate,
 - ii. po inkubaci vzorku s kuličkami, během kterého dochází k vazbě RNA na kuličky, je vzorek od kuliček odebrán do WASTE plate,
 - iii. magnetické kuličky jsou následně třikrát promyty roztoky z REAGENT plate,
 - iv. kuličky se nechají schnout, aby se zbavily zbytkového promývacího roztoku,
 - v. eluční roztok je přidán ke kuličkám a po inkubaci je tento roztok, který obsahuje vyzolovanou RNA, přenesen do ELUTION plate.
6. **DŮLEŽITÉ: Osobně sledujte začátek protokolu (přibližně 1 minutu), abyste se ujistili, že přístroj Bravo pracuje správně. Stanice Bravo by měla provést následující kroky:**
 - i. Nabrání 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.
7. RNA izolační protokol trvá přibližně 40 minut a nevyžaduje přítomnost operátora.
8. Poté co protokol skončí a objeví se okno „Protocol complete“ klikněte „OK“.
9. Klikněte na tlačítko „Export PDF report“. Toto tlačítko vygeneruje PDF soubor, ve kterém bude zaznamenán název izolačního protokolu, aktuální čas a informace vyplněné do polí “Experiment ID”, “Operator Name” a “Elution plate ID”.
10. Výsledkem protokolu je 18 µL izolované RNA v každé jamce ELUTION plate.



Pozn. Na RT-PCR analýzu se spotřebuje 4,5 µL izolované RNA (při použití Bravo protokolu na přípravu RT-PCR destičky). RNA proto vystačí na tři nezávislé RT-PCR analýzy. Pro dlouhodobé skladování zalepte destičku mrazu odolnou folií a uložte do -80 °C.

4.2.4 Úklid destiček a špiček po RNA izolačním protokolu

Následující postup popisuje úklid destiček v případě následného využití pipetovací stanice na přípravu RT-PCR destičky. Pokud po RNA izolačním protokolu nebudete RT-PCR destičku připravovat, postupujte podle protokolu uvedeném v příloze (sekce 9.2).

1. Zavičkejte a vyhodte do odpadu **EMPTY tip box** z **pozice 7**.



DŮLEŽITÉ: Pokud se špičky z pozice 7 nevyhodí, tak při spuštění následného protokolu na přípravu RT-PCR destičky může dojít k vážnému poškození přístroje!

2. Opatrně vyjměte a vyhodte do odpadu **LYSIS&SAMPLE plate** z **pozice 8**.
3. Opatrně vyjměte a vyhodte 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.

4. Zavřete program VWorks (pokud se program zeptá, tak **neukládejte** VWForms soubor).
5. Pokračujte v přípravě RT-PCR destičky dle protokolu popsaného v kapitole 5.

5 Protokol pro přípravu RT-PCR destičky

Toto je doporučený protokol, který navazuje na protokol izolace RNA (viz kapitola 4). Protokol rozpipetuje 13,5 μL RT-PCR master mixu do 96-jamkové RT-PCR destičky a následně do této destičky přenesse 4,5 μL vyizolované RNA z ELUTION PLATE a promíchá. Výstupem protokolu je připravená RT-PCR destička, kterou následně operátor zalepí transparentní optickou folií a přenesse na měření v real-time PCR cyklu.

Pozn. Použitý RT-PCR master mix musí být připraven pro namíchání reakce v poměru 15 μL master mixu a 5 μL vzorku. V protokolu použitý celkový objem RT-PCR reakce je pouze 18 μL , zbylých 10 % objemu mixu je spotřebováno jako mrtvý objem pro automatické rozpipetování. Díky tomu je zachována možnost použít jakoukoliv soupravu, která obsahuje reagentie pro 100 reakcí v objemu alespoň 20 μL .

5.1 Obecné informace

1. Pro zajištění správného fungování protokolu je nutné, aby pipetovací stanice Agilent Bravo měla nainstalovanou 96ST hlavu a tři přesné pozice (alignment stations) umístěné v pozicích číslo 1, 2 a 3 a byla řádně nainstalována a otestována, což by mělo být provedeno autorizovaným zástupcem prodejce přístroje. Pro tento protokol je navíc nutný 96-jamkový PCR adaptér (cat.no G5498B#G013) pro správné usazení RT-PCR destičky.
2. Na pipetovací stanici Agilent Bravo musí být také předem instalovány zde popsané protokoly, což zajišťuje DIANA Biotechnologies s.r.o. v rámci instalačního balíčku *Agilent Bravo installation package for Automated RNA Isolation kit* (kat.č. DB-1214).
3. Pro dlouhodobě spolehlivé fungování je nutná pravidelná údržba a testování pipetovací stanice Agilent Bravo, které zajišťuje autorizovaný servis prodejce přístroje.

5.2 Příprava RT-PCR Master Mix rezervoáru

1. 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.
2. Připravte RT-PCR master mix podle pokynů výrobce tak, aby se výsledná reakce míchala v poměru 5 μL vzorku s 15 μL master mixu. Připravte 1,6 mL takového RT-PCR master mixu (v tomto objemu 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).



COVID-19 Multiplex RT-PCR Kit (kat.č. DB-1211) je doporučená souprava v kombinaci s výše popsaným RNA izolačním protokolem. Pokud použijete velikost soupravy DB-1211-100rxns, tak smíchejte celé objemy složek 1, 2 a 3. V každé zkumavce je 550 μL , celkem tak získáte až 1650 μL master mixu. Pokud použijete velikost soupravy DB-1211-1000rxns, tak v čisté zkumavce smíchejte 533 μL každé ze složek 1, 2 a 3 tak, abyste získali 1600 μL master mixu. Je také možné smíchat celý objem všech komponent (5,5 mL každá) a rozpipetovat po 1600 μL .



Hotový RT-PCR master mix je stabilní až několik hodin na ledu, je možné jej skladovat až 1 měsíc v -80°C (musí být co nejdříve po namíchání uložen do -80°C). Více podrobností ke stabilitě RT-PCR mixu a jednotlivých složek RT-PCR soupravy naleznete v návodu COVID-19 Multiplex RT-PCR Kit.

3. Strhněte folii z jednoho sloupce jamek (8 jamek) v RT-PCR Master Mix reservoir.
4. 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.
5. Zkontrolujte, že na dně jamek v RT-PCR Master Mix reservoir nejsou žádné bubliny.
6. Pokud přenášíte RT-PCR Master Mix reservoir k pipetovací stanici na delší vzdálenost, zakryjte RT-PCR Master Mix reservoir víčkem.

5.3 Spuštění protokolu na přípravu RT-PCR destičky

5.3.1 Příprava pipetovací stanice Agilent Bravo

1. Zde popsaný protokol bezprostředně navazuje na předchozí protokol RNA izolace a využívá krabičky špiček a ELUTION plate, které zůstávají v přístroji po izolaci RNA.
2. Otevřete soubor **DIANA_RT-PCR_desticka**

Pozn. Při instalaci RNA izolačního protokolu vám bude vytvořena ikona s výše uvedeným názvem na ploše počítače ovládající pipetovací stanici. Pokud tuto ikonu nenaleznete, tak můžete správný soubor najít v adresáři `C:\DIANA Biotech\Bravo files\Protocol Files`. Zde otevřete soubor s názvem `DIANA_Assay_plate_prep_DB-1206_v2.x` (pokud máte k dispozici více protokolů se stejným názvem, vždy použijte nejaktuálnější dostupnou verzi protokolu).

3. Inicializujte pipetovací stanici a přihlaste se do programu VWorks.
4. Automaticky se objeví ovládací okno protokolu (viz. obrázek 2).



Obrázek 2: Screenshot ovládacího okna protokolu pro přípravu RT-PCR destičky (toto schéma předpokládá, že před protokolem na přípravu RT-PCR destičky byl proveden protokol na RNA izolaci a destičky a špičky z něj byly uklizeny podle postupu popsaném v kapitole 4.2.4)



5. Vyplňte pole „Column in RT-PCR Master Mix reservoir (pos 5)“ v pravém horním rohu obrazovky. Hodnota v tomto poli musí být číslo mezi 1-12, které odpovídá číslu sloupce v RT-PCR Master Mix reservoir, do kterého byl napipetován RT-PCR master mix (sloupec 1 je ten nejvíce vlevo a sloupec 12 ten nejvíce vpravo). **Zadání správného sloupce (na kterém nesmí být folie) je klíčové pro správnou funkci protokolu.**



6. Vyplňte pole “Experiment ID”, “Operator Name” a “Elution plate ID” (Elution plate ID je unikátní číslo natištěné na krátké straně každého ELUTION plate a slouží k jeho identifikaci)

5.3.2 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 postup předpokládá, že před tímto protokolem byl proveden RNA izolační protokol a destičky a špičky byly uklizeny podle postupu popsáném v kapitole 4.2.4. V takovém případě jsou v pipetovací stanici již přítomny následující destičky a špičky:

- a) **tip70 tip box** na **pozici 1** (krabička obsahuje použité 30 μ L špičky v kvadrantech 1 a 2),
- b) **BEAD plate** na **pozici 2** (nebude použit v tomto protokolu),
- c) **tip30 tip box** na **pozici 3** (krabička obsahuje čisté 30 μ L špičky v kvadrantech 3 a 4),
- d) **REAGENT plate** na **pozici 6** (nebude použit v tomto protokolu),
- e) **ELUTION plate** na **pozici 9**

Pozn. Pokud je tento protokol použit nezávisle na RNA izolačním protokolu, je nejdříve nutné vložit do pipetovací stanice tip70 tip box (musí mít volné pozice pro odpadní špičky v kvadrantech 3 a 4), tip30 tip box (musí obsahovat čisté 30 μ L špičky v kvadrantech 3 a 4) a ELUTION plate (nesmí mít na sobě víčko nebo folii) na jejich příslušné pozice.

1. Vložte **RT-PCR Master Mix reservoir** na **pozici 5** s master mixem v jednom sloupci.
2. **Důležité:** Pokud je na **RT-PCR Master Mix reservoir** víčko, tak jej sundejte.
3. Vložte čistou **PCR destičku** (Assay plate, není součástí kitu) umístěnou v 96-jamkovém PCR adapteru (cat.no. G5498B#G013) na **pozici 8**.




DŮLEŽITÉ: Před vložením do stroje si viditelně označte přední stranu PCR destičky, aby nedošlo k jejímu nechtěnému otočení. Pro označení destičky lze použít štítek „Assay plate in 96w PCR adapter“, který je součástí soupravy.

5.3.3 Provedení protokolu pro přípravu RT-PCR destičky




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, magnetický adapter a PCR 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 folii (RT-PCR Master Mix reservoir nesmí mít folii na sloupci, ze kterého se bude pipetovat, ostatní mohou být zalepeny),
- všechny destičky, špičky a magnetický adapter jsou správně usazeny ve svých pozicích.
- **při nedodržení těchto pokynů neproběhne protokol 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. Ještě jednou zkontrolujte, že jsou všechny destičky a špičky na správných místech a že na sobě nemají folii nebo víčko a zmáčkněte tlačítko „Continue“.



5. Objeví se ještě jedno okno, která žádá o kontrolu, zda jste zadali správné číslo sloupce, ve kterém je rozpipetován RT-PCR master mix. Zkontrolujte číslo sloupce a zmáčkněte tlačítko „Continue“. **Zadání správného sloupce (na kterém nesmí být folie) je klíčové pro správnou funkci protokolu.**
6. Tímto se spustí protokol na přípravu RT-PCR destičky, který zahrnuje následující kroky:
 - i. Z jednoho sloupce RT-PCR Master Mix reservoir se rozpipetuje 13,5 µL master mixu do celé PCR destičky,
 - ii. Přenese se 4,5 µL izolované RNA z ELUTION plate do PCR destičky a promíchá se s RT-PCR master mixem.
-  **7. DŮLEŽITÉ: Osobně sledujte začátek protokolu (přibližně 1 minutu), abyste se ujistili, že přístroj Bravo pracuje správně. Stanice Bravo by měla provést následující kroky:**
 - i. Nabrání jednoho sloupce (8 kusů) špiček z tip30 tip box na pozici 3,
 - ii. Nasátí kapaliny ze správného sloupce RT-PCR Master Mix reservoir na pozici 5.
8. Protokol trvá přibližně 5 minut a nevyžaduje přítomnost operátora.
9. Poté co protokol skončí a objeví se okno „Protocol complete“ klikněte „OK“.
10. Klikněte na tlačítko „Export PDF report“. Tím vygenerujete PDF soubor, ve kterém bude uložen název protokolu, aktuální čas a informace vyplněné do polí „Column in RT-PCR Master Mix reservoir (pos 5)“, „Experiment ID“, „Operator Name“ a „Elution plate ID“.
11. Po skončení protokolu vyjměte **RT-PCR destičku** z pipetovací stanice z **pozice 8** a zalepte ji transparentní optickou folií kompatibilní s RT-PCR analýzou. RT-PCR destička je nyní připravená na měření v real-time PCR cyklu.

5.3.4 Úklid destiček a špiček po protokolu na přípravu RT-PCR destičky

1. Vyjměte **ELUTION plate** z pipetovací stanice z **pozice 9**. Zalepte jej mrazu odolnou folií a skladujte při -20 °C (nanejvýš po dobu 30 dnů) nebo při -80 °C pro dlouhodobé skladování. Pokud ELUTION plate nechcete skladovat, tak ho zlikvidujte stejně jako BEAD plate.
2. Opatrně vyjměte **RT-PCR Master Mix reservoir** z **pozice 5** a uchovejte ho na další použití (rezervoár může být použit až na 12 příprav RT-PCR destičky).
3. Opatrně vyjměte a vyhoďte do odpadu **REAGENT plate** z **pozice 6**.
4. Zavičkejte a vyhoďte **tip70 tip box** z **pozice 1**.
5. Opatrně vyjměte a vyhoďte do odpadu **BEAD plate** z **pozice 2**.



DŮLEŽITÉ: BEAD plate může obsahovat virovou RNA, a proto musí být zlikvidován způsobem, který bude minimalizovat možnost kontaminace okolí. Pokud je to možné, doporučujeme tuto destičku před vyhozením znovu zalepit folií nebo uzavřít od vodotěsného obalu.

6. Vyjměte a vyhoďte zbylé špičky z **tip30 tip box** z **pozice 3**. 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).
7. Zavřete celý program VWorks (pokud se program zeptá, tak **neukládejte** VWForms soubor).
8. Pokud již nebudete provádět daný den žádnou RNA izolaci nebo přípravu RT-PCR destičky, tak vypněte pipetovací stanici Agilent Bravo.



6 Právní upozornění

V plném rozsahu povoleném zákony vaší jurisdikce, je DIANA Biotechnologies, s.r.o. 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 for Agilent Bravo a s jejím použitím.

V případě využití soupravy *Automated RNA Isolation kit for Agilent Bravo* v *in vitro* diagnostice společně s CE IVD certifikovanými RT-PCR soupravami připadá zodpovědnost validovat proces izolace RNA uživateli.

DIANA Biotechnologies s.r.o. 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 s.r.o. je zakázáno poskytovat tyto protokoly třetím stranám.














7 Seznam kompatibilních souprav

REF DB-1211-100rxns COVID-19 Multiplex RT-PCR Kit (100 testů)

REF DB-1211-1000rxns COVID-19 Multiplex RT-PCR Kit (1000 testů)



8 Použité grafické symboly

	Manufacturer / Výrobce
	Date of Manufacture / Datum výroby
	Caution / Pozor
	Lot Number / Kód dávky
	Operator's manual, operating instructions / Čtěte návod k použití
	Catalogue Number / Katalogové číslo
	Lower limit of temperature / Dolní mez teploty
	Temperature limit / Limit teploty
	Upper limit of temperature / Horní mez teploty
	Do not use if package is damaged / Nepoužívat, jestliže je balení poškozeno
	Use by date / Použit do data
	Do not reuse / Nepoužívat opětovně
	Keep away from sunlight / Chraňte před slunečním zářením



9 Příloha

9.1 Označení kvadrantů v 384 jamkové destičce

384 jamkové destička může být virtuálně rozdělena do čtyř kvadrantů. Každý kvadrant obsahuje 96 jamek, které mají stejné rozložení jako 96 jamková destička. Pokud není řečeno jinak, tak se kvadranty v 384 jamkové destičce číslují od 1 do 4 a to v pořadí zleva doprava a shora dolů. Obrázek 3 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 3: 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, ..., O21, O24; Kvadrant 3 (Q3) zbarven červeně obsahuje jamky B1, B3, B5, ..., P21, P23 a Kvadrant 4 (Q4) zbarven bíle obsahuje jamky B2, B4, B6, ..., P22, P24.

9.2 Úklid pipetovací stanice Agilent Bravo v případě, že se RT-PCR destička nebude připravovat

1. Opatrně vyjměte **ELUTION plate** s vyizolovanou RNA z **pozice 9**. Pro krátkodobé skladování (<8 hod) destičku zavičkujte nebo zalepte folií a uchovejte na ledu. Pro dlouhodobé skladování destičku zalepte mrazu odolnou folií a uchovejte v -80 °C.
2. Zavičkujte a vyhodte do odpadu **EMPTY tip box** z **pozice 7**.
3. Opatrně vyjměte a vyhodte odpadu **LYSIS&SAMPLE plate** z **pozice 8**.
4. Opatrně vyjměte a vyhodte do odpadu **WASTE plate** z **pozice 4**.
5. Opatrně vyjměte a vyhodte do odpadu **REAGENT plate** z **pozice 6**.
6. Opatrně vyjměte a vyhodte odpadu **BEAD plate** z **pozice 2**.



DŮLEŽITÉ: *LYSIS&SAMPLE plate, WASTE plate a BEAD 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 od vodotěsného obalu.*

7. Opatrně vyjměte a vyklopte do odpadu použité špičky z krabičky **tip70 tip box** z **pozice 1**. Ponechte si prázdnou krabičku, kterou lze použít jako nový EMPTY tip box při další RNA izolaci. Popisek na této krabičce přelepte popiskem „EMPTY tip box“ (součást soupravy).
8. Zavičkujte a **uchovejte si čisté 30 µL špičky** (v kvadrantech 3 a 4) v **tip30 tip box krabičce**. Tyto špičky můžete použít ještě pro jednu RNA izolaci, ale pro další izolaci krabičku **MUSÍTE** otočit o 180° (čisté špičky pro další RNA izolaci musí být přítomné v kvadrantech 1 a 2!)
9. Zavřete celý program VWorks (pokud se program zeptá, tak **neukládejte** VWorks soubor) a pokud již nebudete provádět daný den žádnou RNA izolaci nebo přípravu RT-PCR destičky, tak vypněte pipetovací stanici Agilent Bravo.



Souhrnný protokol

Příprava všech reagensí pro provedení RNA izolace

1. **Reagensie pro přípravu lyzačního pufru:** Lysis Buffer Concentrate a 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 folie, 1 ks předděrované folie (vše kromě isopropanolu je součástí soupravy)
2. **Destičky** (vždy po jednom kusu): BEAD plate, REAGENT plate, ELUTION plate, WASTE plate, LYSIS&SAMPLE plate a minimálně jeden zalepený sloupec v RT-PCR Master Mix reservoir (vše je součástí soupravy), prázdná PCR destička (není součástí soupravy)
3. **Špičky:** 1x 70 µL špičky (zelené ●), 1x 30 µL špičky (modré ●), 1x prázdná krabička

Příprava destiček pro RNA izolaci

1. Promíchejte lahvičku s Lysis Buffer Concentrate a zkontrolujte zda se v ní nevytvořil precipitát. Pokud ano, tak vložte lahvičku na 1 hodinu do 37 °C a poté promíchejte a zkontrolujte, že se precipitát rozpustil.
2. Stočte BEAD plate a REAGENT plate 200x g po dobu 1 min.
3. Všechny roztoky uchovávané v -20°C nechte před použitím rozmraznout, stočte, zvortexujte a znovu stočte.
4. Podle tabulky uvedené níže připravte v 50 mL zkumavce lyzační pufr, jednotlivé složky přidávejte v pořadí indikovaném v tabulce. Před přidáním izolační kontroly a znovu po jejím přidání zkumavku uzavřete a promíchejte několikerým otočením zkumavky.

Pořadí přidání	Složka	Objem vzorku [µl]	Barva víčka
		1 destička (96 vzorků)	
1	Lysis Buffer Concentrate	9 000	
2	Lysis Enhancer ^[1]	110	
3	RNA Carrier ^[1]	110	
4	DTT concentrate	110	
5	100 % Isopropanol	8 200	
několikrát obraťte dnem vzhůru a zpět pro důkladné promíchání			
6	RNA izolační kontrola	126	
několikrát obraťte dnem vzhůru a zpět pro důkladné promíchání			

5. Rozpipetujte 140 µL kompletního lyzačního pufru do LYSIS&SAMPLE plate a destičku zalepte předděrovanou folií (pre-pierced seal), která je součástí soupravy.
6. Připravte si vzorky, které budou analyzovány, včetně odpovídajících kontrol.
7. Skrze předděrovanou folii 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 folií (general adhesive seal), která je součástí soupravy.
8. Celková doba práce s LYSIS&SAMPLE plate, který je přelepený pouze předděrovanou folií, nesmí překročit 2 hodiny. Do celkové doby 8 hodin je možné destičku s rozpipetovaným lyzačním pufrům skladovat, pokud je zalepená adhezivní folií.



Provedení RNA izolace

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, který se zobrazí po spuštění protokolu (viz obrázky). Pokud mají destičky folii, tak ji nejdříve sundejte a až poté vložte destičku do pipetovací stanice. Z krabiček se špičkami sundejte víčko.

DIANA RNA izolace



Schéma pozic destiček a špiček v pipetovací stanici Bravo

tip70 tip box (krabička se špičkami) 1	BEAD plate v magnetic adapter (destička s kapalinou) 2	tip30 tip box (krabička se špičkami) 3	Experiment ID QC-DB-1206
WASTE plate (prázdná destička) 4	Prázdná pozice 5	REAGENT plate (destička s kapalinou) 6	Jméno operátora Jan Novak
empty tip box (prázdná krabička od špiček) 7	LYSIS & SAMPLE plate (destička s kapalinou) 8	ELUTION plate (prázdná destička) 9	Elution plate ID 1234
Progress			Elapsed Time: 00:00:00

5. Vyplňte pole “Experiment ID”, “Operator Name” a “Elution plate ID”.
6. Zmáčkněte tlačítko “Run” a následně „Finish“ a poté „Continue“.
7. Protokol RNA izolace se spustí a bude trvat přibližně 40 minut.
8. **Pozorujte začátek protokolu, abyste se ujistili, že pracuje správně. Pipetovací stanice by měla nabrat špičky z tip70 tip box v pozici 1 a přenést kapalinu z BEAD plate v pozici 2 do WASTE plate v pozici 4.**
9. **DŮLEŽITÉ:** Po skončení protokolu vyjměte z pipetovací stanice a vyhoďte zavíčkovaný EMPTY tip box, LYSIS&SAMPLE plate a WASTE plate.
10. **Nevyjmutí EMPTY tip box z pozice 7 může vést k vážnému poškození přístroje.**
11. Tlačítkem „Export PDF report“ si vytvořte záznam provedené izolace a zavřete program VWorks (pokud se program zeptá, tak neukládejte VWForms soubor).



Příprava RT-PCR master mix rezervoáru

1. Připravte 1,5 až 1,6 mL RT-PCR Master Mixu podle pokynů výrobce (pro přípravu reakce v poměru 15 µL master mixu a 5 µL vzorku).
2. Všechny roztoky uchovávané v -20°C nechte před použitím rozmraznout, stočte, zvortexujte a znovu stočte.
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.



COVID-19 Multiplex RT-PCR Kit (kat.č. DB-1211) je doporučena souprava v kombinaci s výše popsaným RNA izolačním protokolem. Pokud použijete velikost soupravy DB-1211-100rxns, tak smíchejte celé objemy složek 1, 2 a 3. V každé zkumavce je 550 µL, celkem tak získáte až 1650 µL master mixu. Při použití soupravy DB-1211-1000rxns, tak v čisté zkumavce smíchejte 533 µL každé ze složek 1, 2 a 3 tak, abyste získali 1600 µL master mixu. Je také možné smíchat celý objem všech komponent (5,5 mL každá) a rozpipetovat po 1600 µL. Hotový RT-PCR master mix je stabilní až několik hodin na ledu, je možné jej skladovat až 1 měsíc v -80°C (musí být co nejdříve po namíchání uložen do -80°C). Více



podrobností ke stabilitě RT-PCR mixu a jednotlivých složek RT-PCR soupravy naleznete v návodu COVID-19 Multiplex RT-PCR Kit.

Příprava RT-PCR destičky (Assay plate)

1. Zde popsany protokol bezprostředně navazuje na předchozí protokol RNA izolace a využívá krabičky špiček a ELUTION plate, které zůstávají v přístroji po izolaci RNA.
2. Otevřete soubor **DIANA_RT-PCR desticka** na ploše počítače.
3. Inicializujte pipetovací stanici a přihlaste se do programu VWorks.
4. Umístěte na pozice v pipetovací stanici příslušné destičky a špičky podle schématu, který se zobrazí po spuštění protokolu (viz obrázek). Umístěte na pozici 5 RT-PCR Master Mix reservoir a odeberte z něj víčko.
5. Na pozici 8 vložte prázdnou PCR destičku (Assay plate) v 96w PCR adapteru. Před vložením do stroje si viditelně označte přední stranu PCR destičky, aby nedošlo k jejímu nechtěnému otočení. Pro označení destičky lze použít štítek „Assay plate in 96w PCR adapter“, který je součástí soupravy.

DIANA RT-PCR desticka



Schéma pozic destiček a špiček v pipetovací stanici Bravo

tip70 tip box (krabička se špičkami v Q1/Q2) 1	BEAD plate v magnetic adapter (destička s kapalinou) 2	tip30 tip box (krabička se špičkami v Q3/Q4) 3	Číslo sloupce v RT-PCR Master Mix reservoir (pozice 5) 8
Prázdná pozice 4	RT-PCR Master Mix reservoir (mix v jednom sloupci) 5	REAGENT plate (destička s kapalinou) 6	Experiment ID QC-08-1206
Prázdná pozice 7	Assay plate v 96w PCR adapter (prázdná PCR destička) 8	ELUTION plate (destička s izolovanou RNA) 9	Jméno operátora Jan Novak
			Elution plate ID 1234
			Progress Elapsed Time: 00:00:00

6. Vyplňte pole “Column in RT-PCR Master Mix reservoir (pos 5)” – to je klíčové pro správnou funkci protokolu, “Experiment ID”, “Operator Name” a “Elution plate ID”.
7. **Před spuštěním protokolu se znovu ujistěte, že pozice 7 je prázdná.**
8. Zmáčkněte “Run” tlačítko a následně tlačítko „Finish“ a poté dvakrát „Continue“.
9. **Pozorujte začátek protokolu, abyste se ujistili, že pracuje správně. Pipetovací stanice by měla nabrat jeden sloupec špiček z tip30 tip box v pozici 3 a poté nasát kapalinu ze správného sloupce RT-PCR Master Mix reservoir v pozici 5.**
10. Po skončení protokolu (přibližně 5 minut) vyjměte z pipetovací stanice RT-PCR destičku (Assay plate) z pozice 8 a zalepte ji optickou folií. Destička je nyní připravená na analýzu v real-time PCR cyklu.
11. Vyjměte z pipetovací stanice ELUTION plate z pozice 9. Pro dlouhodobé skladování ho zalepte mrazu odolnou folií a uchovejte v -80 °C.
12. Opatrně vyjměte, přikryjte víčkem a ponechte si na další použití RT-PCR Master Mix reservoir.
13. Opatrně vyjměte a vyhodte zavíčkovaný tip70 tip box, BEAD plate a REAGENT plate.
14. Opatrně vyjměte a vyhodte špičky z tip30 tip box. Prázdnou krabičku si ponechte a použijte ji jako EMPTY tip box pro další RNA izolaci. Přečtěte správně popisek na krabičce.
15. Tlačítkem „Export PDF report“ si vytvořte záznam provedené izolace a zavřete program VWorks (pokud se program zeptá, tak neukládejte VWForms soubor).

