



DB-1206

**Automated RNA Isolation Kit
for Agilent Bravo**

Uživatelská příručka

Verze: DB-1206-007-201124

Revize: 1.2 CZE

Poslední aktualizace: 20.12.2020



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 Charakteristiky testu	4
1.5 Bezpečnostní upozornění	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 složek soupravy	7
3 Příprava reagensí pro RNA izolaci	8
3.1 Obecné postupy	8
3.2 Příprava reagensí a plastu pro RNA izolaci	8
3.3 Příprava krabiček se špičkami	8
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 Protokol pro automatizovanou izolaci RNA	13
4.1 Obecné informace	13
4.2 Spuštění RNA izolačního protokolu	13
5 Postup pro izolaci RNA ze slin	17
5.1 Příprava lyzačního pufru	17
5.2 Přidání vzorků do LYSIS&SAMPLE plate	18
6 Postup pro manuální izolaci RNA	18
7 Právní upozornění	19
8 Seznam kompatibilních souprav	19
9 Použité grafické symboly	20
10 Příloha	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	25
10.5 Označení kvadrantů v 384 jamkové destičce	26
Souhrnný protokol	27



1 Úvod

1.1 Účel a použití soupravy

Automated RNA Isolation Kit for Agilent Bravo slouží 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 7.

Tato souprava byla validována pro izolaci RNA viru COVID-19 z klinických vzorků, kdy je získaná RNA následně analyzována pomocí RT-PCR s cílem detekovat sekvence RNA viru COVID-19. Pro tento účel je v kombinaci s použitím této soupravy doporučen *COVID-19 Multiplex RT-PCR Kit* (kat.č. DB-1211).

Souprava byla vyvinuta k izolaci celkové RNA z následujících matric: (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) či semenné plazmy a (iii) až 50% podílem slin nebo sputa. Souprava byla testována i na kultivovaném COVID-19 viru. Validována byla pro izolaci COVID-19 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 reagentie 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). Protokol je součástí *Agilent Bravo installation package for Automated RNA Isolation kit* (kat.č. DB-1214).



Tato souprava byla validována pro diagnostiku COVID-19 spolu s CE IVD RT-PCR soupravou *COVID-19 Multiplex RT-PCR Kit* (kat.č. DB-1211). Pro diagnostiku COVID-19 lze použít i jiné CE-IVD RT-PCR soupravy, avšak v tom případě připadá zodpovědnost validovat proces izolace RNA uživateli, stejně jako při použití této soupravy k detekci jiných respiračních virových onemocnění.

1.2 Kontroly pro použití se soupravou

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



1.3 Obecné upozornění

Pro zamezení kontaminace jednotlivých vzorků je nutné dodržovat správnou laboratorní praxi, a to zejména 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. Také nepipetujte roztoky přímo ze zásobních lahví, potřebný objem si předem odlijte do vhodného rezervoáru a roztoky nikdy nevracejte zpět do lahví.



1.4 Charakteristiky testu

Výtěžek izolace a použití různých matric

Výtěžek izolace RNA byl stanoven pro izolaci RNA z různých biologických matric. Za tímto účelem byla přidána virová kultura přímo do matrice anebo byla přidána virová RNA do lyzačního pufru. Porovnáním množství virové RNA/viru vstupující do izolace s množstvím izolované RNA byl výtěžek opakovaně stanoven na 50% a více u následujících matric: (i) fosfátový pufr (PBS) nebo copan universal transport media (VTM), (ii) PBS či VTM s 10% podílem plné krve (EDTA), krevního séra, krevní plazmy (EDTA nebo citrátové) či semenné plazmy a (iii) PBS či VTM s až 50% podílem slin nebo sputa. Jiné matrice nebyly prozatím testovány.

Citlivost a specifita

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. Celkem bylo analyzováno 18 pozitivních a 59 negativních vzorků, a výsledky byly porovnány s již validovanými CE IVD soupravami, které vykazovaly stejnou pozitivitu. Tato souprava DB-1206 ve spojení s DB-1211 tudíž dosáhla 100% citlivosti a 100% specifity.

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 COVID-19 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 $C_t < 35$ cyklus. Interassay variabilita byla pro stejné vzorky opakovaně < 0.30 cyklu.

Vhodné přístroje

Souprava i protokol byly optimalizovány pro pipetovací stanici Agilent Bravo vybavenou 96ST pipetovací hlavou.



1.5 Bezpečnostní upozornění

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



Lysis Buffer Concentrate a roztoky v REAGENT plate obsahují guanidium isothiokyanát, který je toxický. K roztokům ani odpadním lahvám obsahujícím tyto roztoky nesmí být přidáno SAVO (či látky obsahující chlornan sodný) 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 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 zlikvidujte v souladu s platnými právními předpisy.



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



2 Seznam materiálu

2.1 Požadované laboratorní vybavení

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

2.1.1 Pipetovací stanice Agilent Bravo

Tato souprava je určena k použití na 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).

Tento manuál je určen 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).

2.2 Požadovaný materiál, který není součástí soupravy

- 100% Isopropanol
- Jednorázové pipetovací špičky (doporučujeme špičky s filtrem)
- Prázdna 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 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]	
WASTE plate ^[3]	10 kusů	18-30 °C	1 ^[8]	
LYSIS&SAMPLE plate ^[3]	10 kusů	18-30 °C	1 ^[8]	
Master Mix Tip box	1 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 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	
Aluminum seal (mrazu odolné 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 kapitolu 3 (Příprava reagensí)

[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

2.4. Stabilita jednotlivých 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 reagensií pro RNA izolaci

3.1 Obecné postupy

- Nepoužívejte součásti soupravy, které jsou při přijetí poškozené nebo rozmrazené. Uchovejte 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 zcela rozmraznout, 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 reagensií 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 jedenu destičku označenou **BEAD** plate.
3. Vyndejte jedno balení izolačního kitu, které obsahuje většinu plastu a destiček s reagensiemi 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 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). Zároveň si do PCR boxu vyndejte RT-PCR Master Mix, aby Vám rozmrzнул.

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 připravuje PCR destička.

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 4.2.5).



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** 200x g minimálně po dobu 15 sekund.
2. Před použitím stočte **BEAD plate** 200x g po minimálně dobu 15 sekund.

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 vzorků

Před přidáním vzorků do lyzačního pufu 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 Nasopharyngeální stěry

Pro izolaci RNA z nasopharyngeálního stěru v mediu nebo pufu, 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. 200x g po dobu 1 minuty).

3.6.3 Jiné druhy biologických matric

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

Volitelné: Pro snížení infekčnosti lze vzorek před přidáním do lyzačního pufu 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




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 vialka 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 rozmznout 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 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 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. 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 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] – Barva víčka a číslo na něm je platné pouze v případě použití soupravy *COVID-19 Multiplex RT-PCR Kit* (kat.č. DB-1211). 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.

- 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.

- 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

- 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.

- Postupně takto napipetujte všechny vzorky do LYSIS&SAMPLE plate.
- Po napipetování všech vzorků přidejte negativní kontrolu, a až poté pozitivní kontrolu.
- 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 puffrem 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 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 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 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 reagentie 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.

Positivní 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 reagentii může dojít k jejich kontaminaci nejen virovou RNA (testováno v negativní kontrole popsané výše), ale i RNA izolační kontrolou přidávanou do lyzačního puffru 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

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. Na pipetovací stanici Agilent Bravo musí být také předem instalován zde popsaný protokol poskytovaný firmou 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.

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 destičky 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.

4.2 Spuštění RNA izolačního protokolu

4.2.1 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 4.2.4).

DB-1206 RNA isolation RNA izolace (verze 4)



Schéma pozic destiček a špiček

1 tip70 tip box krabička se špičkami	2 BEAD plate v magnetic adapter destička s kapalinou	3 Master Mix tip box krabička se špičkami
4 WASTE plate prázdna destička	5 Prázdna pozice	6 REAGENT plate destička s kapalinou
7 EMPTY tip box prázdna krabička	8 LYSIS & SAMPLE plate destička s kapalinou	9 PCR destička v 96w PCR adapteru prázdna destička

Experiment ID
Jméno operátora
BEAD plate ID

Počet použití Master Mix tip box (pozice 3)
Číslo sloupce v RT-PCR Master Mix reservoir (pozice 5)

Progress Elapsed Time: 00:00:00

Obrázek 1: Screenshot vyplněného 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 (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 prázdnu **PCR destičku** na **pozici 9**, do již přítomného **96w PCR adapter**.
9. Vložte prázdnu 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 reagentů vzorky.




4.2.3 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 4.2.4).

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. Klikněte na tlačítko „Export PDF report“. Toto tlačítko vygeneruje PDF soubor, ve kterém bude zaznamenán název izolačního protokolu, aktuální čas a všechny informace vyplněné do polí ovládacího okna RNA izolačního protokolu.
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 fólií a uložte do -80 °C.

4.2.4 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.1 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.



Pozn.2 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, pak 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 na ledu až několik hodin, 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.

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.

4.2.5 Úklid destiček a špiček po skončení RNA izolačního protokolu

1. Vyjměte PCR destičku, pečlivě ji přelepte optickou PCR fólií, vložte do qPCR cyklieru a spusťte analýzu. Po spuštění analýzy uklidte zbytek destiček v pipetovací stanici.
2. Zavíčkujte a vyhodte do odpadu **EMPTY tip box** z **pozice 7**.
3. Opatrně vyjměte a vyhodte do odpadu **LYSIS&SAMPLE plate** z **pozice 8**.
4. 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 fólií 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 vyhodte 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 fólií a skladujte při -20 °C (nanejvýš po dobu 30 dnů) nebo při -80 °C pro dlouhodobé skladování. Pokud BEAD plate nechcete skladovat, zlikvidujte 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 přeškrtněte 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.

5 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**.

5.1 Příprava lyzačního pufru

1. Postupujte analogicky jako v sekci 3.7 při přípravě lyzačního pufru pro nasopharyngeální stěry, avšak upravte objemy dle následující tabulky 2.

Tabulka 2: 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] – Barva víčka a číslo na něm je platné pouze v případě použití soupravy *COVID-19 Multiplex RT-PCR Kit* (kat.č. DB-1211). 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.

5.2 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.

6 Postup pro manuální izolaci RNA

Níže je popsán podrobný postup pro izolaci RNA z nasopharyngeálních stěrů, 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 60 vteřin).
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, 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 jinými než *COVID-19 Multiplex RT-PCR Kit* (kat.č. DB-1211) připadá odpovědnost validovat proces 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.

8 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)
- REF** DB-1214 Agilent Bravo installation package for Automated RNA Isolation kit



9 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



10 Příloha

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 spuštění 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 použitím)



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



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



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



10.2 Test nabrání špiček před RNA izolací

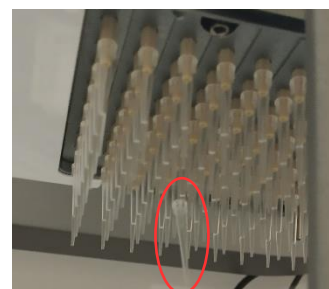
Špičky jsou dodávány třetí stranou, proto je potřeba provést test jejich kvality před samotným spuštěním protokolu RNA izolace. Může se stát, že jsou z výroby některé špičky v sousedních kvadrantech navzájem spojeny kouskem plastu, což by mělo zásadní vliv na samotný protokol. Test zahrnuje následující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

1. Nabrání špiček z krabičky tip70 tip box z kvadrantu 4.
2. Vizuelní 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 zarovnané. Správnost nabrání špiček potvrďte stisknutím tlačítka "Continue".
3. Vrácení špiček a nabrání nových špiček z krabičky tip70 tip box z kvadrantu 1.
4. Vizuelní 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 zarovnané. Správnost nabrání špiček potvrďte stisknutím tlačítka "Continue".

Řešení problému při testu špiček

Pokud stroj zvedne i špičky z jiného kvadrantu (viz. obrázek vpravo), 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.

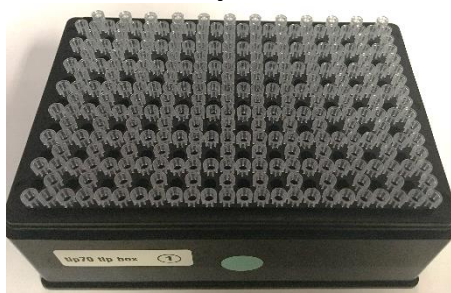


Kontrola krabičky se špičkami po skončení testu špiček

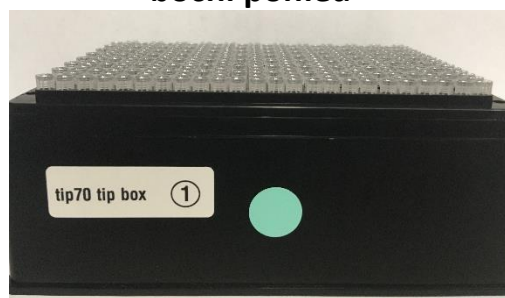
Po skončení testu se stroj zastaví s nabranými špičkami z kvadrantu 1 nad pozicí 2 a vyzve operátora k vizuelní kontrole tip70 tip box krabičky špiček v pozici 1.

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.
2. Zkontrolujte, že žádná ze špiček nevyčnívá (viz. pravý spodní obrázek)
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

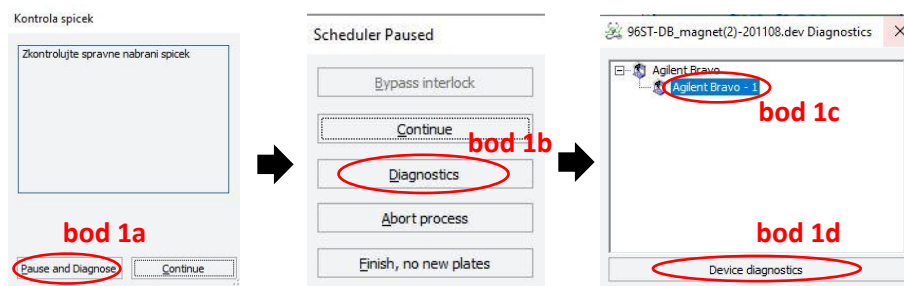


10.3 Návod na opravu špatně zadaného počtu použití Master Mix tip box

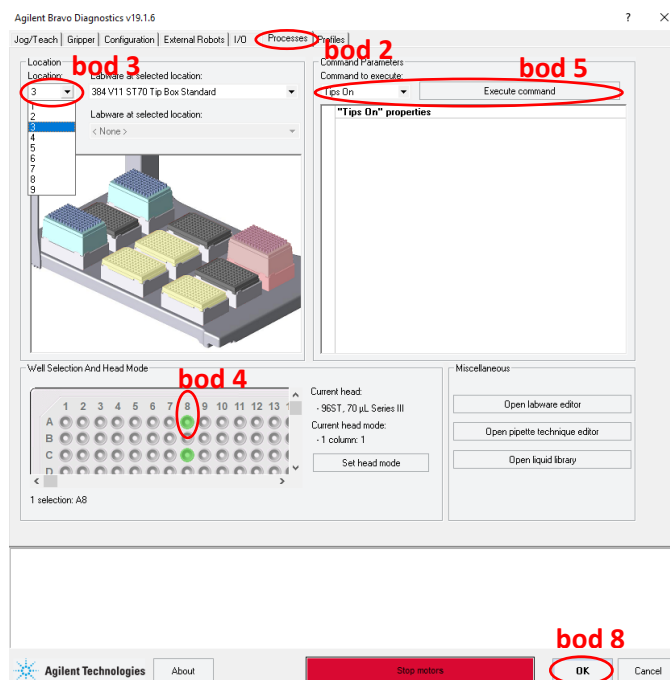
Po vložení RT-PCR Master Mix reservoir destičky do pozice 5 a nabrání špiček z Master Mix tip box se pipetovací stanice zastaví a vyzve uživatele, aby vizuálně zkontroloval správné nabrání špiček. **Stroj musí nabrat POUZE jeden sloupec špiček (8 špiček)**. Níže jsou popsány možnosti špatného náběru špiček s návodem k jejich nápravě. Pokud nebudete schopni podle návodu chybu odstranit kontaktujte nás.

Pipetovací stanice nenabrala žádné špičky z Master Mix tip box

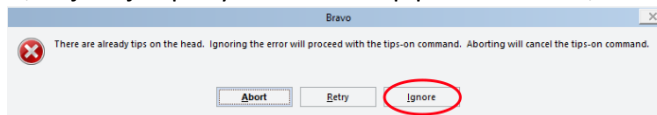
1. Klikněte na tlačítko „Pause and diagnose“ (bod 1a). Otevře se nové okno s názvem „Scheduler Paused“ a zde klikněte na tlačítko „Diagnostics“ (bod 1b) a v dalším novém okně „96ST-DB_magnet(2)...Diagnostics“ vyberte záložku „Agilent Bravo-1“ (bod 1c) a klikněte na tlačítko „Device diagnostics“ (bod 1d).



2. Otevře se vám další okno „Agilent Bravo Diagnostics“, ve kterém otevřete záložku „Processes“ (bod 2, viz. obrázek dole).
3. V záložce „Locations“ vlevo nahoře vyberte pozici „3“ (bod 3).
4. Ve spodním panelu, kde je schéma krabičky špiček, klikněte na odpovídající sloupec špiček, který měl stroj nabrat (výběr bude vždy začínat v prvním řádku, **zde ukázáno pro příklad, kdy správný sloupec je sloupec číslo 8, bod 4**).
5. V pravé části okna vyberte „Tips On“ a potvrďte kliknutím na „Execute command“ (bod 5).



6. Na chybovou hlášku, že jsou již špičky nasazené na pipetovací hlavě, klikněte „Ignore“.



7. Stroj nyní sjede do Master Mix tip box a nabere správný sloupec špiček.
8. V okně „Agilent Bravo Diagnostics“ vpravo dole klikněte na tlačítko „OK“ (bod 8).
9. Zavřete okno „96ST-DB_magnet(2)...Diagnostics“ křížkem v pravé horní části.
10. **DŮLEŽITÉ: Z krabičky Master Mix tip box manuálně vyndejte a vyhoďte VŠECHNY špinavé špičky, které se do této doby v krabičce nashromáždily (tj. vyhoďte celou souvislou řadu špiček v pravé straně krabičky označené nápisem „špinavé špičky“.**
11. V okně „Scheduler Paused“ zvolte možnost „Continue“. Pipetovací stanice bude pokračovat v RNA izolačním protokolu.

Pipetovací stanice nabrala špičky o jednu pozici více vpravo

Pipetovací hlava by měla mít správně nasazený pouze jeden sloupec špiček na pravé straně hlavy. Nechte program bez přerušení doběhnout a posléze v rukavicích čistě špičky (vlevo) posuňte o jednu pozici doprava a špinavé špičky (vpravo) posuňte o jednu pozici doleva (měly by znovu vzniknout souvislé řady špiček na levé i pravé straně krabičky; viz. obrázky níže).



Pipetovací stanice nabrala špičky o dvě a více pozic vpravo

Na pipetovací hlavě stroje je nasazen více než jeden sloupec špiček!!!

1. **Nemačkejte tlačítko „Continue“.**
2. V čistých rukavicích opatrně sundejte všechny přebytečné sloupce špiček z hlavy (postupujte zleva doprava), až na pipetovací hlavě bude pouze jeden sloupec špiček na její pravé straně. Čistě špičky odložte do víčka od krabičky.
3. Klikněte na tlačítko „Continue“ a pokračujte v protokolu.
4. Poté nás telefonicky kontaktujte.



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 umístíte destičky a špičky podle schématu zobrazeném na obrázku pod textem:

DB-1206 Extra Assay plate
Příprava extra PCR destičky (verze 4)

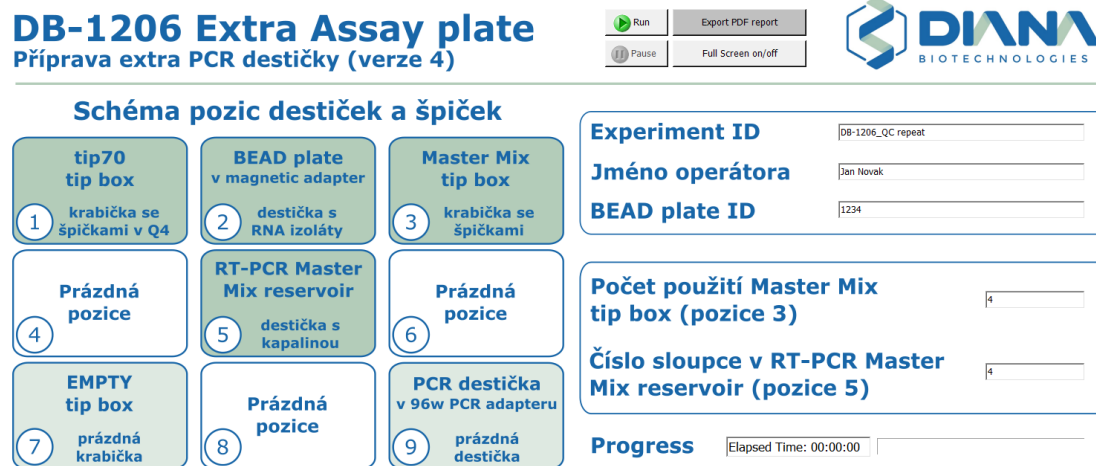


Schéma pozic destiček a špiček

1 tip70 tip box krabička se špičkami v Q4	2 BEAD plate v magnetic adapter destička s RNA izoláty	3 Master Mix tip box krabička se špičkami
4 Prázdná pozice	5 RT-PCR Master Mix reservoir destička s kapalinou	6 Prázdná pozice
7 EMPTY tip box prázdná krabička	8 Prázdná pozice	9 PCR destička v 96w PCR adapteru prázdná destička

Experiment ID DB-1206_QC repeat
Jméno operátora Jan Novak
BEAD plate ID 1234

Počet použití Master Mix tip box (pozice 3) 4
Číslo sloupce v RT-PCR Master Mix reservoir (pozice 5) 4

Progress Elapsed Time: 00:00:00

1. Použijte novou krabičku tip70 tip box a dejte ji do pozice 1.
2. Do pozice 2 umístíte 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 umístíte 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 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 2: 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.



Souhrnný protokol

Příprava všech reagensií pro RNA izolaci

- 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 předděrovaná fólie (vše kromě isopropanolu je součástí soupravy)
- 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)
- Špičky:** 1x 70 µL špičky (zelené ●), 1x Master Mix tip box, 1x prázdná krabička

Příprava destiček pro RNA izolaci

- 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.
- Stočte BEAD plate a REAGENT plate 200x g po dobu 15 sekund.
- Zmražené roztoky nechte před použitím rozmraznout, stočte, zvortexujte a znovu stočte. Pracujte s nimi při pokojové teplotě a po použití je znovu zamrazte.
- 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 ^[1]	110	
3	RNA Carrier ^[1]	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			

- Rozpipetujte 120 µl kompletního lyzačního pufru do LYSIS&SAMPLE plate a destičku zalepte předděrovanou fólií (pre-pierced seal), která je součástí soupravy.
- Připravte si vzorky, které budou analyzovány, včetně odpovídajících kontrol.
- 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

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



DB-1206 RNA isolation RNA izolace (verze 4)



Schéma pozic destiček a špiček



Experiment ID	<input type="text" value="DB-1206_QC"/>
Jméno operátora	<input type="text" value="Jan Novak"/>
BEAD plate ID	<input type="text" value="1234"/>
Počet použití Master Mix tip box (pozice 3)	<input type="text" value="3"/>
Číslo sloupce v RT-PCR Master Mix reservoir (pozice 5)	<input type="text" value="3"/>
Progress	Elapsed Time: 00:00:00

5. Vyplníte 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 pozic 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, přelete ji PCR fólií a proveďte analýzu na PCR cykleru.
12. Poté uklidte všechny pozice na pipetovací stanici Bravo. Vyhodte zavičkovaný EMPTY tip box, LYSIS&SAMPLE plate, WASTE plate a REAGENT plate. Zavičujte RT-PCR Master Mix reservoir a uchovejte pro další izolaci. BEAD plate zalepte mrazu odolnou fólií a uchovejte při -80°C. Tip70 tip box přelete 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. Tlačítkem „Export PDF report“ si můžete vytvořit záznam provedené izolace.
15. 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 rozmraznout, stočte, zvortexujte a znovu stočte.
2. Připravte 1,5 až 1,6 ml RT-PCR Master Mixu podle pokynů výrobce.
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 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.