CE IVD
Prodotto in Germania

25°
18°

R 36/37/38-42,
S 22-24-26-37/39

Kit di estrazione del DNA oCheck®

Istruzioni per l'uso

Preparazione con colonnina singola (N. cat. 515 040)
Preparazione con 8 colonnine (N. cat. 515 050)

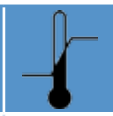
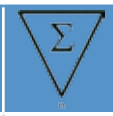
Per uso diagnostico in-vitro unicamente
da parte di personale di laboratorio qualificato

Revisione 00/Febbraio 2011

Greiner Bio-One GmbH
Maybachstr. 2 • 72636 Frickenhausen • Germania
Tel: +49 (0) 7022 948-0 • Fax +49 (0) 7022 948-514
info@de.gbo.com • www.gbo.com/bioscience

greiner bio-one

GLOSSARIO DEI SIMBOLI

											
en	Do not reuse	Use by	Consult Instructions for Use	Catalog Number	Manufacturer	In Vitro Diagnostic Medical Device	Temperature limitation	Contents sufficient for <n> tests	Irritant	Batch code	Important Note
de	Nicht wiederverwenden	Mindestens haltbar bis	Vor Gebrauch Anweisung lesen	Katalognummer	Hersteller	In-vitro-Diagnostikum	Temperaturbegrenzung	Inhalt ausreichend für <n> Tests	Reizend	Chargenbezeichnung	Wichtiger Hinweis
fr	Ne pas réutiliser	Date limite de conservation jusqu'au	Lire les instructions avant utilisation	Numéro de référence	Fabricant	Produit médical de diagnostic in-vitro	Limite de température	Contenu suffisant pour <n> tests	irritant	N° de lot	Note importante
es	No utilizar más	A utilizar preferiblemente antes de	Antes de usar, lea las instrucciones	Número de catálogo	Fabricante	Producto medicinal de diagnóstica in vitro	Limitación de temperatura	Contenido suficiente para <n> ensayos	irritante	Código de lote	Nota importante
it	Non riutilizzabile	Da utilizzare entro e non oltre	Leggere le istruzioni prima dell'uso	Numero catalogo	Produttore	Dispositivo medico-diagnostico in-vitro	Limiti di temperatura	Contenuto sufficiente per <n> test	Irritante	Codice del lotto	Nota importante
pt	Não utilzar mais	A utilizar preferívelmente antes de	Antes de usar, leia as instruções	Número de catálogo	Fabricante	Producto medicinal de diagnóstica in vitro	Limitação de temperatura	Conteúdo suficiente para <n> ensaios	irritante	Código do lote	Aviso importante
nl	Niet opnieuw gebruiken	Tenminste houdbaar tot	Gebruiksaanwijzing lezen	Catalogusnummer	Fabrikant	In vitro diagnostisch medisch product	Temperatuurbeperking	Voldoende inhoud voor <n> tests	Irriterend	Lot nummer	Belangrijke opmerking
da	Må ikke genbruges	Anvendes senest	Læs brugsanvisningen	Katalognummer	Producent	In vitro meskdicin doagnose-apparat	Temperaturbegrænsær	Indeholder nok til <n> test	Lokalirriterende	Lotnummer	Vigtig henvisning
sv	Får ej återanvändas	Sista förbrukningsdag	Läs bruksanvisningen före användning	Katalognummer	Tillverkare	In vitro-medicinsk doagnostisk apparatur	Temperatur-begränsning	Innehållet räcker till <n> tester	irriterande	Lot nummer	Viktigt meddelande
pl	Nie stosować ponownie	Termin zydatności	Przed użyciem przeczytać instrukcję	Numer katalogowy	Producent	Diagnostyka in vitro Produktyw	Ograniczenie temperatury	Zawartość wystarcza na <n> testów	drażniący	Kod partii	Ważne
no	Må ikke brukes flere ganger	holdbar til	Les bruksanvisning før bruk	katalognummer	produsent	in vitro-diagnostisk medisinsk utstyr	temperaturbegrensning	Innhold tilstrekkelig for <n> tester	irriterende	batch nr.	Viktig merknad
el	Προϊόν μίας χρήσης	Χρήση έως	Συμβουλευτείτε τις Οδηγίες χρήσης	Αριθμός καταλόγου	Κατασκευαστής	In Vitro διαγνωστική ιατρική συσκευή	Περιορισμοί θερμοκρασίας	περιέχει επαρκές υλικό για < n > δοκιμασίες	Ερεθιστικό	Κωδικός παρτίδας	Σημαντική σημείωση
tr	Yeniden ullanmayın	Son kullanma tarihi:	Kullanmadan önce talimatı okuyun	Katalog numarası	Üretici firma	In vitro diagnostik tıbbi tanı ürünü	Sıcaklık sınırlaması	İçeriği <n> test için yeterlidir	Tahriş edici	Parti kodu	Önemli Not

INDICE

1. CONTENUTO DEL KIT 5
2. APPARECCHIATURE E MATERIALI DI CONSUMO NECESSARI 6
   - 2.1 Preparazione con colonnina singola (N. cat. 515 040) 6
   - 2.2 Preparazione con 8 colonnine (N. cat. 515 050) 7
3. SPEDIZIONE E CONSERVAZIONE 8
4. ISTRUZIONI DI SICUREZZA 8
5. SMALTIMENTO DEI RIFIUTI 9
6. INTRODUZIONE 10
   - 6.1 Uso previsto 10
   - 6.2 Uso improprio 10
   - 6.3 Campioni 11
   - 6.4 Principio di base della purificazione del DNA 11
7. ISTRUZIONI PER IL FLUSSO DI LAVORO PER IL KIT oCheck® 12
   - 7.1 Istruzioni generali 12
   - 7.2 Separazione dei locali 12
   - 7.3 Avvertenze e precauzioni 13
     - 7.3.1 Prevenzione delle contaminazioni 13
     - 7.3.2 Precauzioni generali 13
     - 7.3.3 Lavorare in sicurezza 14
8. PREPARAZIONE CON COLONNINA SINGOLA (N. cat. 515 040) 15
   - 8.1 Preparazione delle soluzioni di lavoro e condizioni di conservazione 15
   - 8.2 Preparazione dei campioni 16
     - 8.2.1 Preparazione dei campioni per Papill**oCheck**® e Papill**oCheck**® high-risk 16
     - 8.2.2 Preparazione dei campioni per Pelv**oCheck**® CT/NG 16
   - 8.3 Protocollo standard 17
     - 8.3.1 Preparazione 17
     - 8.3.2 Prelisi 17
     - 8.3.3 Lisi 17
     - 8.3.4 Ottimizzazione delle condizioni di legame del DNA 17
     - 8.3.5 Legame del DNA 18
     - 8.3.6 Lavaggio delle colonnine da centrifuga 18
     - 8.3.7 Essiccamento delle colonnine da centrifuga 18
     - 8.3.8 Eluizione del DNA 19

9. GUIDA ALL'INSTALLAZIONE E ALL'USO DEL SET PER VUOTO oCheck® VACSET E DELLA POMPA A VUOTO oCheck® VACPUMP 20
9.1 Contenuto 20
9.1.1 Set per vuoto oCheck® VacSet 20
9.1.2 Pompa a vuoto oCheck® VacPump 21
9.2 Assemblaggio del set per vuoto oCheck® VacSet 22
9.2.1 Disposizione per il legame del DNA e il lavaggio 22
9.2.2 Disposizione per l'eluizione del DNA 23
9.3 Assemblaggio della pompa a vuoto oCheck® VacPump 24
9.4 Impostazione del vuoto 24
9.5 Applicazione del vuoto 24
9.6 Ventilazione del collettore 24
10. PREPARAZIONE CON 8 COLONNINE (N. cat. 515 050) 25
10.1 Preparazione delle soluzioni di lavoro e condizioni di conservazione 25
10.2 Preparazione dei campioni 26
10.2.1 Preparazione dei campioni per Papill**oCheck**® e Papill**oCheck**® high-risk 26
10.3 Protocollo standard 27
10.3.1 Preparazione 27
10.3.2 Prelisi 27
10.3.3 Lisi 27
10.3.4 Ottimizzazione delle condizioni di legame del DNA 27
10.3.5 Legame del DNA 28
10.3.6 Lavaggio delle strip di legame 30
10.3.7 Essiccamento delle strip di legame 31
10.3.8 Eluizione del DNA 31
11. RISOLUZIONE DEI PROBLEMI 33
12. ASSISTENZA TECNICA 34
13. CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI 34
14. PROTOCOLLI BREVI 35
14.1 Protocollo breve per la preparazione con colonnina singola (N. cat. 515 040) 35
14.2 Protocollo breve per la preparazione con 8 colonnine (N. cat. 515 050) 37

1. CONTENUTO DEL KIT

Kit di estrazione del DNA oCheck®	Nome	Preparazione con colonnina singola (N. cat. 515 040)	Preparazione con 8 colonnine (N. cat. 515 050)
BUF L1	Tampone L1	20 ml	20 ml
BUF L2	Tampone L2	12 ml	24 ml
REAG L3	Reagente L3	3 ml	6 ml
BUF W1	Tampone W1	30 ml	75 ml
BUF W2	Tampone W2 (concentrato)	14 ml	50 ml
BUF E	Tampone E	15 ml	50 ml
Proteinase K	Proteinasi K (liofilizzata)	30 mg	75 mg
Proteinase BUF PKB	Tampone per proteinasi PKB	1,8 ml	3,6 ml
Carrier RNA	RNA carrier (liofilizzato)	0,3 mg	0,3 mg
Spin Columns	Colonnine da centrifuga	50	-
Collection Tubes	Tubi di raccolta	250	-
Binding Strips	Strip di legame	-	12
Paper Sheet	Foglio di carta	-	10
BUF L4	Etichetta per tampone L4	1	1
	Istruzioni per scaricare il Manuale	1	1

2. APPARECCHIATURE E MATERIALI DI CONSUMO NECESSARI

2.1 Preparazione con colonnina singola (N. cat. 515 040)

Materiali di consumo	N. cat. Greiner Bio-One	Quantità (pz)
Kit di estrazione del DNA oCheck® – Preparazione con colonnina singola	515 040	50 prep.
Puntali sterili DNasi-free con filtro per micropipetta		
Puntali con filtro da 0,5-10 µl	765 288	96
Puntali con filtro da 0,5-20 µl	774 288	96
Puntali con filtro da 10-100 µl	772 288	96
Puntali con filtro da 10-200 µl	739 288	96
Puntali con filtro da 100-1000 µl	750 288	60
Altri materiali di consumo necessari		
• Tubi di reazione da 1,5 o 2,0 ml con chiusura di sicurezza o tappo a vite per la fase di lisi • Etanolo p.a. ≥ 99,8 % • Guanti monouso		
Altre apparecchiature necessarie		
• Microcentrifuga per tubi di reazione da 1,5 o 2,0 ml in grado di raggiungere 11.000 g • Agitatore vortex • Blocco riscaldante, bagno termostatico o thermomixer per tubi di reazione da 1,5 o 2,0 ml per incubazioni a 70 °C e 56 °C • Micropipette a volume variabile 1-1000 µl • Contenitore di rifiuti • Timer		

2.2 Preparazione con 8 colonnine (N. cat. 515 050)

Materiali di consumo	N. cat. Greiner Bio-One	Quantità (pz)
Kit di estrazione del DNA oCheck® – Preparazione con 8 colonnine	515 050	12 x 8 prep.
Puntali sterili DNasi-free con filtro per micropipetta		
Puntali con filtro da 0,5-10 µl	765 288	96
Puntali con filtro da 0,5-20 µl	774 288	96
Puntali con filtro da 10-100 µl	772 288	96
Puntali con filtro da 10-200 µl	739 288	96
Puntali con filtro da 100-1000 µl	750 288	60
Strip da 8 provette per PCR senza tappo	673 210	125
Strip di tappi per strip da 8 provette	373 270	125
Provette singole per PCR	671 201	500
Apparecchiature	**N. cat. Greiner Bio-One**	**Quantità (pz)**
Set per vuoto oCheck® VacSet	863 080	1
Pompa a vuoto oCheck® VacPump	863 070	1

Altri materiali di consumo necessari

- Tubi di reazione da 1,5 o 2,0 ml con chiusura di sicurezza o tappo a vite per la fase di lisi
- Vaschetta per pipetta multicanale (vaschetta usa e getta per reagenti), volumi: 25 e 100 ml
- Puntali (per volumi di 1200 µl) per pipetta a 8 canali
- Etanolo p.a. ≥ 99,8 %
- Guanti monouso

Altre apparecchiature necessarie

- Microcentrifuga per tubi di reazione da 1,5 o 2,0 ml in grado di raggiungere 11.000 g
- Agitatore vortex
- Blocco riscaldante, bagno termostatico o thermomixer per tubi di reazione da 1,5 o 2,0 ml per incubazioni a 70 °C e 56 °C
- Micropipette a volume variabile 1-1000 µl
- Pipetta multicanale a 8 canali per volumi grandi (da 50 a 1200 µl)
- Contenitore di rifiuti
- Timer
- Rack per PCR

3. SPEDIZIONE E CONSERVAZIONE

Il Kit di estrazione del DNA oCheck® deve essere spedito e conservato a temperatura ambiente. Per la conservazione delle soluzioni di lavoro preparate vedere le sezioni 8.1 e 10.1.

4. ISTRUZIONI DI SICUREZZA

I seguenti componenti del Kit di estrazione del DNA oCheck® contengono sostanze pericolose.

Indossare guanti e occhiali di protezione e seguire le istruzioni di sicurezza fornite in questa sezione.

Componente	Sostanza pericolosa	Simbolo di pericolo	Frasi di rischio	Frasi di rischio	Frasi di sicurezza
Tampone L2	Guanidina cloridrato	*	Nocivo per ingestione, Irritante per gli occhi e la pelle	R 22-36/38	
Tampone W1	Guanidina cloridrato + isopropanolo < 25 %	*	Infiammabile, Nocivo per ingestione, Irritante per gli occhi e la pelle	R 10-22-36/38	S7-16-25
Proteinasi K	Proteinasi K, liofilizzata	*	Irritante per gli occhi, le vie respiratorie e la pelle, Può provocare sensibilizzazione per inalazione	R 36/37/38-42	S 22-24-26-36/37

* L'etichettatura delle sostanze pericolose non è necessaria se la quantità per flacone è inferiore a 125 g o ml (ai sensi delle direttive 67/548/CEE Art. 25, 1999/45/CE Art. 12 e delle GefStoffV § 20 (3) e TRGS 200 7.1 tedesche). Per ulteriori informazioni consultare la scheda di dati di sicurezza.

Frasi di rischio

R10	Infiammabile
R22	Nocivo per ingestione
R 36/37/38	Irritante per gli occhi, le vie respiratorie e la pelle
R 36/38	Irritante per gli occhi e la pelle
R 42	Può provocare sensibilizzazione per inalazione

Frasi di sicurezza

S7	Conservare il recipiente ben chiuso
S16	Conservare lontano da fiamme e scintille - Non fumare.
S 22	Non respirare le polveri
S 24	Evitare il contatto con la pelle
S 25	Evitare il contatto con gli occhi
S 26	In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare un medico
S 36/37	Usare indumenti protettivi e guanti adatti

La versione aggiornata della scheda di dati di sicurezza di questo prodotto può essere scaricata dal sito web di Greiner Bio-One: **www.gbo.com/bioscience/biochips_download**

5. SMALTIMENTO DEI RIFIUTI

Se combinata con candeggina, la guanidina cloridrato presente nei tamponi L2 e W1 può formare composti altamente reattivi. Evitare di aggiungere direttamente candeggina o soluzioni acide ai residui derivanti dalla preparazione dei campioni.

La contaminazione dei residui liquidi con materiale infettivo è altamente improbabile, ma non può essere completamente esclusa. Pertanto, i residui liquidi devono essere considerati come materiale infettivo e trattati e smaltiti in conformità con le normative locali di sicurezza. Osservare scrupolosamente le linee guida locali e statali sullo smaltimento dei rifiuti.

6. INTRODUZIONE

6.1 Uso previsto

Il Kit di estrazione del DNA oCheck® (Greiner Bio-One; n. cat. 515 040 o n. cat. 515 050) è un kit per uso diagnostico in vitro indicato per la preparazione di DNA da campioni di origine umana da analizzare mediante saggi della linea di prodotti oCheck®.

La metodica di isolamento di acido nucleico in uso nelle varianti del Kit di estrazione del DNA oCheck® produce DNA idoneo per la successiva analisi diretta con i seguenti kit:

Kit di estrazione del DNA oCheck® - Preparazione con colonnina singola (N. cat. 515 040)
- Papill**oCheck**® (Greiner Bio-One; N. cat. 465 060)
- Papill**oCheck**® high-risk (Greiner Bio-One; N. cat. 505 060)
- Pelv**oCheck**® CT/NG (Greiner Bio-One; N. cat. 504 002)

Kit di estrazione del DNA oCheck® - Preparazione con 8 colonnine (N. cat. 515 050)
- Papill**oCheck**® (Greiner Bio-One; N. cat. 465 060)
- Papill**oCheck**® high-risk (Greiner Bio-One; N. cat. 505 060)

L'uso del Kit di estrazione del DNA oCheck® - Preparazione con 8 colonnine per l'isolamento del DNA per la successiva analisi con il saggio Pelv**oCheck**® CT/NG (Greiner Bio-One; N. cat. 504 002) è sconsigliato finché non verranno completate le procedure di validazione.

Il Kit di estrazione del DNA oCheck® deve essere utilizzato soltanto in combinazione con saggi della linea di prodotti oCheck® (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germania) nelle cui istruzioni per l'uso sia specificato l'impiego del Kit di estrazione del DNA oCheck®.

Il Kit di estrazione del DNA oCheck® soddisfa i requisiti indicati nella direttiva relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro (98/79/CE) e pertanto è provvisto del marchio di conformità CE.
Il prodotto deve essere utilizzato UNICAMENTE da operatori qualificati, come tecnici e medici con formazione specifica nelle tecniche di biologia molecolare.

6.2 Uso improprio

Il Kit di estrazione del DNA oCheck® **NON** è indicato per l'uso con i kit Carn**oCheck**® (Greiner Bio-One), Par**oCheck**® (Greiner-Bio-One), né con qualsiasi altro prodotto non appartenente alla linea oCheck®.

6.3 Campioni

Per la successiva applicazione dei kit Papill**oCheck**® (Greiner Bio-One; N. cat. 465 060) e Papill**oCheck**® high-risk (Greiner Bio-One; N. cat. 505 060), il Kit di estrazione del DNA oCheck® è stato progettato e testato per l'estrazione **di DNA genomico virale e umano** da **strisci cervicali umani** raccolti con uno dei sistemi di raccolta dei campioni indicati di seguito:

- Papill**oCheck**® Collection Kit (Greiner Bio-One; N. cat. 465 070)
- PreservCyt® (Hologic, Bedford, MA, USA)
- Surepath™ (BD, Franklin Lakes, NJ, USA)
- STM™ (Qiagen, Hilden, Germania)

Per la successiva applicazione del saggio Pelv**oCheck**® CT/NG (Greiner Bio-One; N. cat. 504 002), il Kit di estrazione del DNA oCheck® è stato validato per l'estrazione di **DNA genomico batterico e umano** da **campioni di urina umana** utilizzando i sistemi di raccolta elencati di seguito:

- Pelv**oCheck**® Collection Kit SAFE (Greiner Bio-One; N. cat. 453 100)
- Pelv**oCheck**® Collection Kit STRAW (Greiner Bio-One; N. cat. 453 101)

Altri sistemi di raccolta dei campioni non sono stati validati e non vanno utilizzati con il Kit di estrazione del DNA oCheck®.

6.4 Principio di base della purificazione del DNA

Il Kit di estrazione del DNA oCheck® è stato progettato per la purificazione di DNA genomico virale, batterico e umano da campioni di origine umana. I campioni vengono lisati in maniera rapida ed efficiente mediante l'aggiunta di proteinasi K e tampone L1. Il tampone di lisi e l'etanolo creano le condizioni appropriate per il legame degli acidi nucleici alla membrana di silice delle colonnine di legame. L'RNA carrier favorisce il legame e il recupero di DNA virale, batterico e genomico a bassa concentrazione. Le sostanze contaminanti (potenziali inibitori della PCR) come sali, metaboliti e componenti cellulari macromolecolari solubili vengono rimossi durante le fasi di lavaggio con tamponi di lavaggio a base di etanolo. Infine, il DNA genomico batterico, virale e umano puro viene eluito in condizioni di bassa forza ionica in un tampone di eluizione leggermente alcalino. Dopo la purificazione, il DNA si trova in una soluzione adatta per l'analisi diretta mediante saggi della linea di prodotti oCheck®.

7. ISTRUZIONI PER IL FLUSSO DI LAVORO PER IL KIT oCheck®

7.1 Istruzioni generali

Le istruzioni riportate di seguito sono basate sull'esperienza di laboratorio con l'implementazione di tecniche avanzate attualmente in uso in biologia molecolare e sono finalizzate a garantire la massima sicurezza per i metodi basati su PCR. Durante l'uso del Kit di estrazione del DNA oCheck® in combinazione con ulteriori procedure di analisi del DNA purificato eseguite con saggi della linea di prodotti oCheck®, occorre adottare precauzioni ragionevoli:

In generale, le procedure di biologia molecolare quali estrazione, amplificazione e rilevazione del DNA devono essere eseguite da personale adeguatamente qualificato. Inoltre, è necessario un flusso di lavoro pulito e ben strutturato per evitare risultati errati dovuti alla degradazione dell'acido nucleico presente nei campioni o alla sua contaminazione con prodotti di amplificazione. A tal fine, occorre separare l'area di estrazione da quella di amplificazione.

Non introdurre per nessun motivo un prodotto di amplificazione nell'area destinata soltanto all'estrazione. Le due aree devono essere equipaggiate con apparecchiature, materiali di consumo, camici da laboratorio e guanti distinti. Non trasferire per nessun motivo camici da laboratorio, guanti o apparecchiature dall'area destinata all'estrazione a quella destinata all'amplificazione.

7.2 Separazione dei locali

Nella **Figura 1** è mostrato un esempio della possibile suddivisione di un laboratorio in 3 sezioni distinte. Una è utilizzata unicamente per l'estrazione del DNA, un'altra è destinata alla preparazione e all'esecuzione delle reazioni di PCR e l'ultima viene impiegata per l'ibridazione e l'analisi. Per evitare la contaminazione dei campioni, ciascun locale deve essere impiegato esclusivamente per l'applicazione o la tecnica indicata. Potrebbe essere utile utilizzare colori differenti per evitare lo scambio accidentale di apparecchiature e materiali di consumo tra le diverse aree.

! Le apparecchiature e i materiali di consumo non devono essere scambiati tra locali o spazi diversi del laboratorio. Pertanto, la presenza di apparecchiature e materiali di consumo in doppio è una necessità e deve essere attentamente considerata.

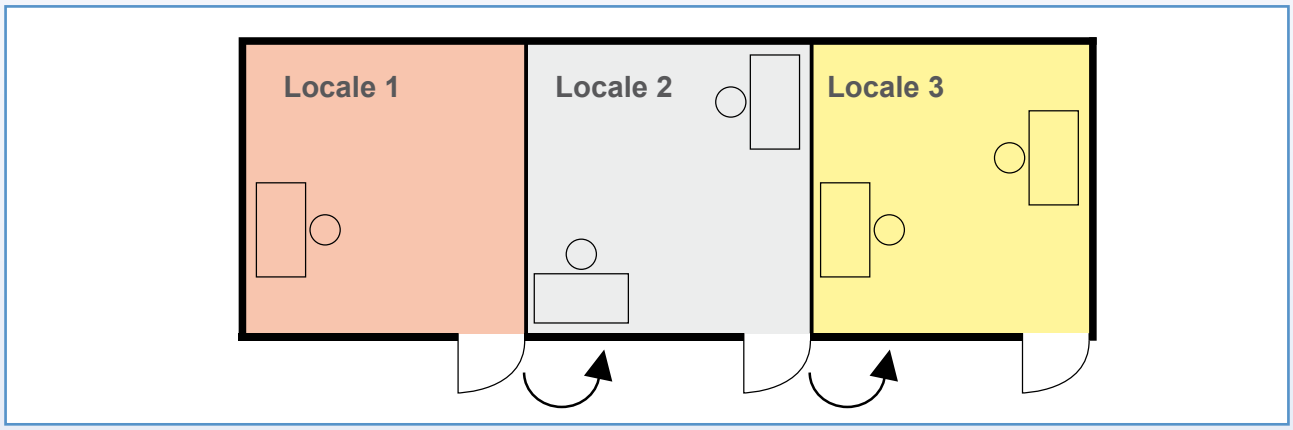


Figura 1: Separazione dei locali nel flusso di lavoro per il kit oCheck®
Locale 1: estrazione del DNA, locale 2: preparazione della reazione di PCR e suddivisione della miscela di reazione su un bancone pulito; spazio distinto per l'aggiunta del templato di DNA; locale 3: ibridazione e analisi

L'intera procedura di estrazione del DNA con il Kit di estrazione del DNA oCheck® deve essere eseguita nel locale 1, quello destinato all'estrazione del DNA. Dopo aver lasciato questo locale, occorre cambiarsi il camice da laboratorio. Nel flusso di lavoro per il kit oCheck®, l'estrazione del DNA è la procedura più sensibile alla contaminazione e quindi è essenziale osservare scrupolosamente le istruzioni contenute nel presente documento. Inoltre, occorre seguire le indicazioni per la prevenzione delle contaminazioni riportate nel paragrafo 7.3.1.

Nel locale 2, su un bancone pulito, va preparata e suddivisa la miscela di reazione per la PCR. L'aggiunta del DNA estratto nel locale 1 deve essere eseguita in uno spazio distinto all'interno del locale 2. Dopo aver lasciato questo locale, occorre cambiarsi il camice da laboratorio.

La reazione di ibridazione e le fasi di lavaggio dovranno avere luogo nel terzo locale del laboratorio. Nel locale 3 deve anche essere installato il dispositivo CheckScanner™ insieme con il software CheckReport™Software per l'analisi finale dei saggi della linea di prodotti oCheck®.

7.3 Avvertenze e precauzioni

7.3.1 Prevenzione delle contaminazioni

- **Il camice da laboratorio** deve essere indossato durante l'intero corso delle procedure e sono necessari set di camici differenti per ciascun locale del laboratorio.
- **I guanti** devono essere indossati durante tutte le fasi dell'analisi e vanno cambiati per ogni diversa fase.
- **Pulizia del laboratorio:** l'ambiente di lavoro deve essere decontaminato prima e dopo le procedure con una soluzione detergente appropriata.
- **Tubi di reazione:** non toccare per nessun motivo la superficie interna del tappo dei tubi di reazione. Per evitare contaminazioni crociate, aprire un solo tubo per volta. Per evitare contaminazioni, utilizzare tubi di reazione con chiusura di sicurezza o tappo a vite per la fase di lisi.
- Devono essere utilizzati **puntali con filtro per micropipetta** (sterili, privi di DNasi, di RNasi e di DNA umano). Occorre cambiare il puntale per ogni trasferimento di liquido.

7.3.2 Precauzioni generali

- All'arrivo, controllare che i componenti del Kit di estrazione del DNA oCheck® non siano danneggiati. Se uno dei componenti appare danneggiato (ad es., flaconi di tampone), contattare il distributore Greiner Bio-One locale. L'uso di componenti danneggiati potrebbe compromettere le prestazioni del kit.
- Non utilizzare reagenti scaduti.
- Non utilizzare il Kit di estrazione del DNA oCheck® dopo la data di scadenza.
- Non mescolare reagenti provenienti da lotti diversi.
- Utilizzare unicamente reagenti/apparecchiature forniti con il kit o consigliati dal produttore.
- Le pipette, il bagno termostatico e il blocco riscaldante devono essere sottoposti a calibrazione/controlli periodici.
- Il pipettaggio di piccole quantità di liquido dell'ordine dei microlitri non è facile. Pertanto, è importante adoperare le micropipette con la massima precisione possibile.
- Tutte le procedure di centrifugazione devono essere eseguite a **temperatura ambiente (18-25 °C).**
- I reagenti inutilizzati e i materiali di rifiuto devono essere smaltiti in conformità con le disposizioni locali e statali.

7.3.3 Lavorare in sicurezza

- Questo kit è esclusivamente per uso diagnostico in vitro e deve essere utilizzato unicamente da personale con formazione specifica nelle procedure di laboratorio di diagnostica in vitro.
- Non pipettare mai soluzioni con la bocca.
- Non mangiare, bere, fumare o applicare prodotti cosmetici negli ambienti di lavoro.
- Fare attenzione quando si maneggiano campioni biologici contenenti materiale umano potenzialmente infettivo. Per ridurre al minimo il rischio di infezione associato a materiale potenzialmente infettivo, si consiglia di lavorare sotto una cappa a flusso laminare fino alla lisi dei campioni. Tutti i campioni biologici devono essere maneggiati e smaltiti come se potessero trasmettere agenti infettivi. Evitare il contatto diretto con i campioni biologici e cercare di non provocare schizzi o spruzzi.
- Lavarsi accuratamente le mani dopo aver maneggiato campioni e reagenti.
- Quando si lavora con campioni umani, indossare sempre camice da laboratorio, guanti e occhiali protettivi. La versione aggiornata della scheda di dati di sicurezza di questo prodotto può essere scaricata dal sito web di Greiner Bio-One: **www.gbo.com/bioscience/biochips_download**

8. PREPARAZIONE CON COLONNINA SINGOLA (N. cat. 515 040)

8.1 Preparazione delle soluzioni di lavoro e condizioni di conservazione

Tutti i componenti del kit devono essere conservati a **temperatura ambiente (18-25 °C)** e sono stabili per **due anni** dalla data di fabbricazione.

Prima di iniziare il protocollo del Kit di estrazione del DNA oCheck®, preparare le seguenti soluzioni:

1. Soluzione di **proteinasi K**: prima di utilizzare il kit per la prima volta, aggiungere **1,35 ml di tampone per proteinasi (PKB)** per disciogliere la **proteinasi K** liofilizzata. Suddividere la soluzione in aliquote e conservarle a -20 °C per un massimo di 6 mesi. Non ricongelarle.

2. **Tampone W2:** aggiungere **56 ml** di **etanolo** (p.a. ≥ 99,8%) al **tampone W2** concentrato. Segnare la data corrente sull'etichetta del flacone. Il **tampone W2** è stabile a **temperatura ambiente (18-25 °C)** fino a un anno.

3. **Tampone L4:** trasferire tutto il **tampone L2** nel **reagente L3** e mescolare bene. Etichettare il flacone con l'etichetta **L4** fornita nel kit. Segnare la data corrente sull'etichetta del flacone. Il **tampone L4** ottenuto è stabile fino a un anno a **temperatura ambiente (18-25 °C)**.

4. Soluzione di **RNA carrier**: aggiungere **900 µl di tampone L1** per disciogliere l'**RNA carrier** liofilizzato. Suddividere in aliquote l'**RNA carrier** disciolto, ad es. in aliquote di **35 µl** per 12 estrazioni. Conservare la **soluzione di RNA carrier** disciolto a **-20 ºC**. Non ricongelarla! Dopo essere state scongelate, le provette usate vanno gettate vie.

A seguito della conservazione, specialmente se avvenuta a basse temperature, si può formare un precipitato bianco nei **tamponi L1, L2 o L4**. Tali precipitati possono essere facilmente disciolti incubando il flacone a **50-70 °C** prima dell'uso.

8.2 Preparazione dei campioni

8.2.1 Preparazione dei campioni per i kit Papill**oCheck**® e Papill**oCheck**® **high-risk**

I campioni di strisci cervicali umani raccolti in
- Papill**oCheck**® Collection Kit (Greiner Bio-One; N. cat. 465 070)
- mezzo di raccolta **PreservCyt**® (Hologic, Bedford, MA, USA)

possono essere trattati direttamente.

I campioni di strisci cervicali raccolti in
- mezzo di raccolta **Surepath™** (BD, Franklin Lakes, NJ USA) devono essere sottoposti a lavaggio prima dell'uso: centrifugare **250 µl** del campione per **5 minuti** a **11.000 g** e risospendere il pellet in **250 µl** di acqua distillata.

I campioni di strisci cervicali raccolti in
- mezzo di raccolta **STM™** (Qiagen, Hilden, Germania) devono essere diluiti in acqua distillata: **100 µl** di campione + **150 µl** di acqua distillata

!

In generale, se il campione di striscio cervicale è molto concentrato e già aggregato, deve essere diluito e omogeneizzato prima di iniziare l'estrazione!

I campioni di strisci cervicali molto diluiti che non presentano cellule visibili devono essere concentrati per ottenere una maggiore quantità di cellule per l'estrazione. Centrifugare fino a **1000 µl** di campione per **5 minuti** a **11.000 g** e risospendere il pellet in **250 µl** di acqua distillata.

Questa procedura di concentrazione può essere eseguita unicamente sui campioni di strisci cervicali raccolti con il Papill**oCheck**® Collection Kit, il mezzo di raccolta **PreservCyt**® o il mezzo di raccolta **Surepath™**. In caso di uso del mezzo di raccolta **STM™**, non è possibile concentrare il campione mediante centrifugazione.

➠ Pipettare **250 µl** della soluzione del campione in un tubo di reazione da 1,5 ml o 2 ml. Per evitare contaminazioni, utilizzare tubi di reazione con chiusura di sicurezza o tappo a vite per la fase di lisi. Si consiglia di validare l'intera procedura di isolamento del DNA di ogni ciclo di estrazione del DNA utilizzando un **controllo negativo**.

8.2.2 Preparazione dei campioni per il kit Pelv**oCheck**® **CT/NG**

I campioni di urina umana raccolti in:
- Pelv**oCheck**® Collection Kit SAFE (Greiner Bio-One; N. cat. 453 100)
- Pelv**oCheck**® Collection Kit STRAW (Greiner Bio-One; N. cat. 453 101)

possono essere trattati direttamente.

➠ Pipettare **250 µl** del campione di urina in un tubo di reazione da 1,5 ml o 2 ml. Si consiglia di utilizzare tubi di reazione con chiusura di sicurezza o tappo a vite per la fase di lisi. Per validare l'estrazione del DNA, utilizzare un **controllo negativo** per ciascun ciclo di estrazione.

8.3 Protocollo standard

8.3.1 Preparazione

- Verificare che la centrifuga sia impostata a **temperatura ambiente (18-25 °C)**.
- Preparare i campioni come indicato nel capitolo 8.2.
- Impostare i blocchi riscaldanti o i bagni termostatici a **56 ºC** e **70 ºC**, rispettivamente.
- Prima dell'eluizione, incubare il **tampone E** di eluizione a **70 ºC**.
- Accertarsi che le soluzioni di lavoro siano state preparate come indicato nel capitolo 8.1.

8.3.2 Prelisi

- Aggiungere **80 µl** di **tampone L1**.
- Aggiungere **2,4 µl** della soluzione di **RNA carrier** preparata.
- Aggiungere **20 µl** di soluzione di **proteinasi K**.
- Chiudere il tappo e mescolare brevemente passando al vortex a impulsi.
- Incubare a **56 ºC** per almeno **30 minuti**. Agitare i campioni utilizzando un thermomixer a **650 rpm**. Se si utilizza un blocco riscaldante o un bagno termostatico, durante il periodo di incubazione passare di tanto in tanto i campioni al vortex.

! In caso di trattamento di vari campioni, **la proteinasi K, il tampone L1 e l'RNA carrier** devono essere premiscelati subito prima dell'uso. Non miscelare mai il **tampone L1** e **la proteinasi K** più di **10-15 minuti** prima dell'aggiunta nel campione. **La proteinasi K** tende all'autolisi se posta in **tampone L1** senza substrato.

8.3.3 Lisi

- Centrifugare brevemente il tubo di reazione per rimuovere eventuali gocce dall'interno del tappo.
- Aggiungere **250 µl** di **tampone L4**.
- Chiudere il tappo e mescolare passando al vortex a impulsi per **10 secondi**.
- Incubare a **70 ºC** per **15 minuti**.

! Chiudere saldamente i tappi dei tubi di reazione per evitare che si possano aprire accidentalmente.

8.3.4 Ottimizzazione delle condizioni di legame del DNA

- Centrifugare brevemente il tubo di reazione per rimuovere eventuali gocce dall'interno del tappo.
- Aggiungere **300 µl** di **etanolo** (p.a. ≥ 99,8 %) al campione.
- Chiudere immediatamente il tappo e mescolare accuratamente mediante passaggio sul vortex a impulsi per **15 secondi**.
- Centrifugare brevemente il tubo di reazione per rimuovere eventuali gocce dall'interno del tappo.

8.3.5 Legame del DNA

Per evitare contaminazioni: prima di iniziare questa fase, indossare un nuovo paio di guanti!

- Per ciascun campione collocare una **colonnina da centrifuga** in un **tubo di raccolta**.
- Pipettare attentamente **450 µl** dei **lisati** nella **colonnina da centrifuga** e centrifugare a **11.000 g** per **1 minuto** a **temperatura ambiente**. Non gettare via il resto del lisato!
- Gettare via il **tubo di raccolta** con il flow-through.

Per evitare contaminazioni: prima di iniziare questa fase, indossare un nuovo paio di guanti!

- Preparare nuovi **tubi di raccolta** e collocare le **colonnine da centrifuga** al loro interno .
- Pipettare i restanti **450 µl di lisato** nella **colonnina da centrifuga**.
- Centrifugare a **11.000 g** per **1 minuto** a **temperatura ambiente**.

Per evitare contaminazioni: prima di iniziare questa fase, indossare un nuovo paio di guanti!

- Gettare via il **tubo di raccolta** con il flow-through e collocare le **colonnine da centrifuga** in nuovi **tubi di raccolta**.

8.3.6 Lavaggio delle colonnine da centrifuga

- Applicare **500 µl** di **tampone W1** nella **colonnina da centrifuga**.
- Centrifugare a **11.000 g** per **1 minuto** a **temperatura ambiente**.
- Gettare via il **tubo di raccolta** con il flow-through e collocare la **colonnina da centrifuga** in un nuovo **tubo di raccolta**.
- Applicare **600 µl** di **tampone W2** nella **colonnina da centrifuga**.
- Centrifugare a **11.000 g** per **1 minuto** a **temperatura ambiente**.
- Gettare via il **tubo di raccolta** con il flow-through e collocare la **colonnina da centrifuga** in un nuovo **tubo di raccolta**.

8.3.7 Essiccamento delle colonnine da centrifuga

- Centrifugare a **11.000 g** per **1 minuto** per far seccare completamente la membrana.

! Questo passaggio serve per eliminare eventuali tracce di etanolo. L'etanolo presente nel **tampone W2** inibisce le reazioni enzimatiche e deve essere completamente rimosso prima dell'eluizione del DNA.

8.3.8 Eluizione del DNA

Utilizzare **tampone E** preriscaldato **(70 °C)**!

> **!** Per evitare cali di temperatura durante le operazioni di pipettaggio, si consiglia di riempire i tubi di reazione da 1,5 o 2,0 ml con un massimo di **1.300 µl di tampone E** (sufficienti per n = 12 campioni).

Per evitare contaminazioni: prima di iniziare questa fase, indossare un nuovo paio di guanti!

- Collocare la **colonnina da centrifuga** in un tubo di reazione da 1,5 ml pulito.
- Applicare **100 µl** di **tampone E** preriscaldato **(70 °C)** al centro della membrana nella **colonnina da centrifuga**.
- Chiudere il tappo e incubare a temperatura ambiente per **1 minuto**.
- Centrifugare a **11.000 g** per **1 minuto**.

> **!** Per garantire che il DNA isolato offra prestazioni ottimali nelle applicazioni successive, si raccomanda di eseguire l'eluizione con il **tampone E fornito**. Conservare il DNA estratto a **-20 ºC**.
> Per ulteriori analisi con saggi della linea di prodotti oCheck® fare riferimento alle rispettive Istruzioni per l'uso (Papill**oCheck**®, Papill**oCheck**® high-risk e Pelv**oCheck**® CT/NG).

9. GUIDA ALL'INSTALLAZIONE E ALL'USO DEL SET PER VUOTO oCheck® VACSET E DELLA POMPA A VUOTO oCheck® VACPUMP

Il **collettore per vuoto** oCheck® è stato progettato per la rapida purificazione manuale parallela di acidi nucleici utilizzando il Kit di estrazione del DNA oCheck® - Preparazione con 8 colonnine. Questo sistema permette la rapida purificazione simultanea di acidi nucleici di alta qualità. Le lunghe operazioni di centrifugazione e decantazione vengono eliminate grazie all'uso del vuoto. I Kit di estrazione del DNA oCheck® si basano sulla tecnologia di ultrafiltrazione e offrono un sistema di purificazione degli acidi nucleici pratico e veloce.

Quando si utilizza il Kit di estrazione del DNA oCheck® - Preparazione con 8 colonnine sotto vuoto, è consigliabile impiegare il set per vuoto oCheck® VacSet (N. cat. 863 080) e la pompa a vuoto oCheck® VacPump (N. cat. 863 070).

9.1 Contenuto

9.1.1 Set per vuoto oCheck® VacSet

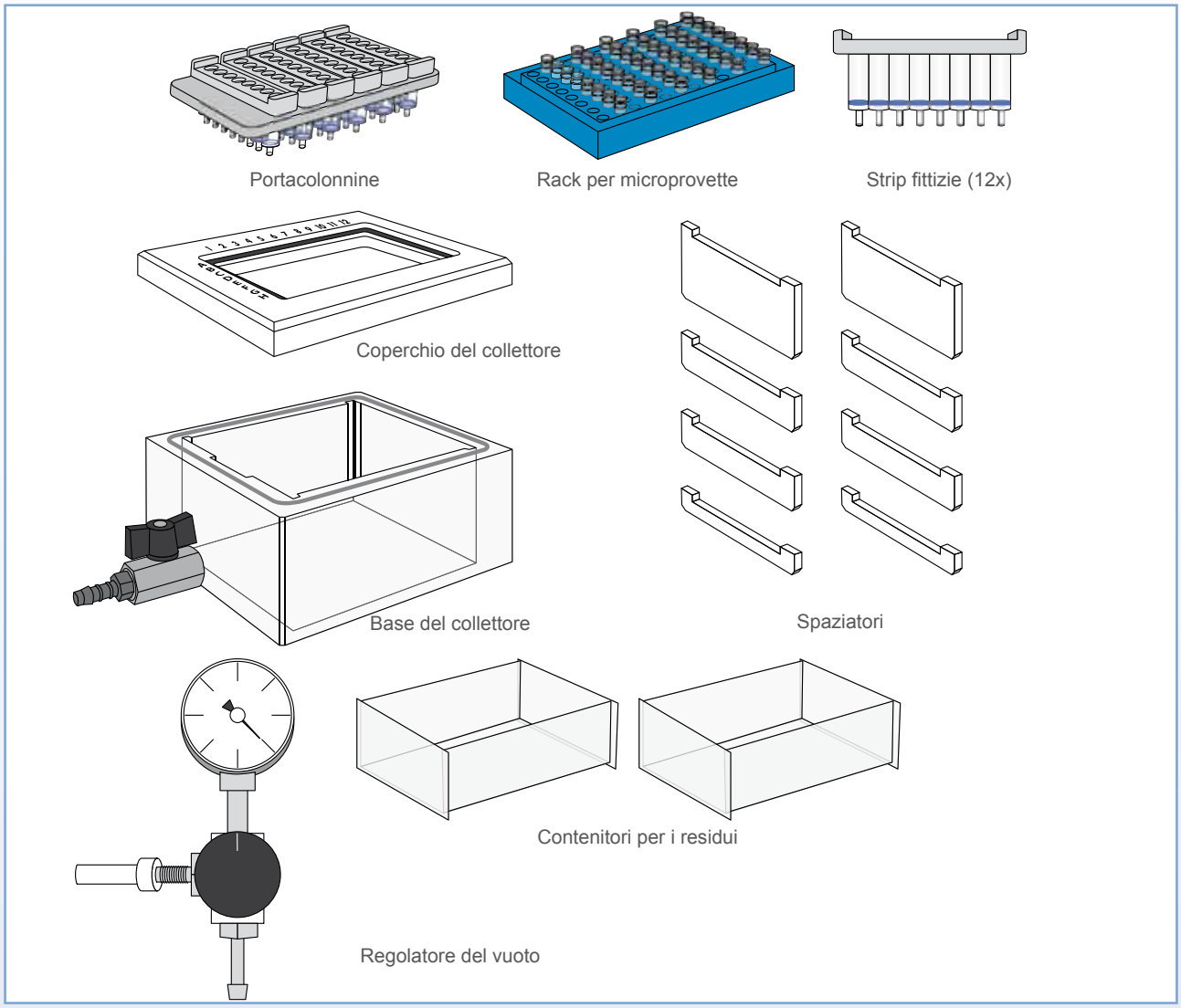


Figura 2: Contenuto del set per vuoto oCheck® VacSet

9.1.2 Pompa a vuoto oCheck® VacPump

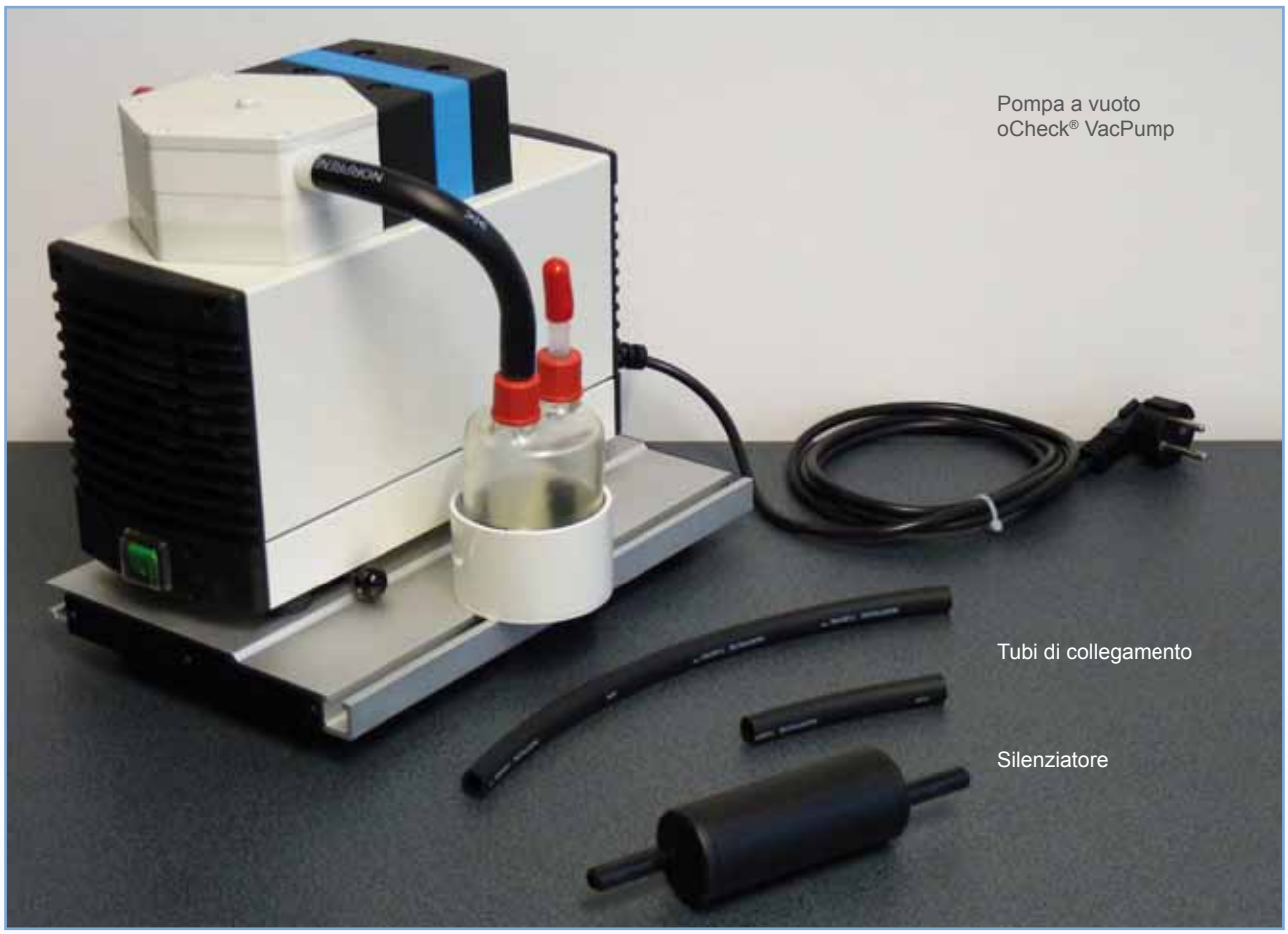


Figura 3: Contenuto della pompa a vuoto oCheck® VacPump

9.2 Assemblaggio del set per vuoto oCheck® VacSet

- Collocare la **base del collettore** su un bancone di laboratorio stabile. Il **collettore per vuoto** deve essere preparato come mostrato nella **figura 4 a+b**.

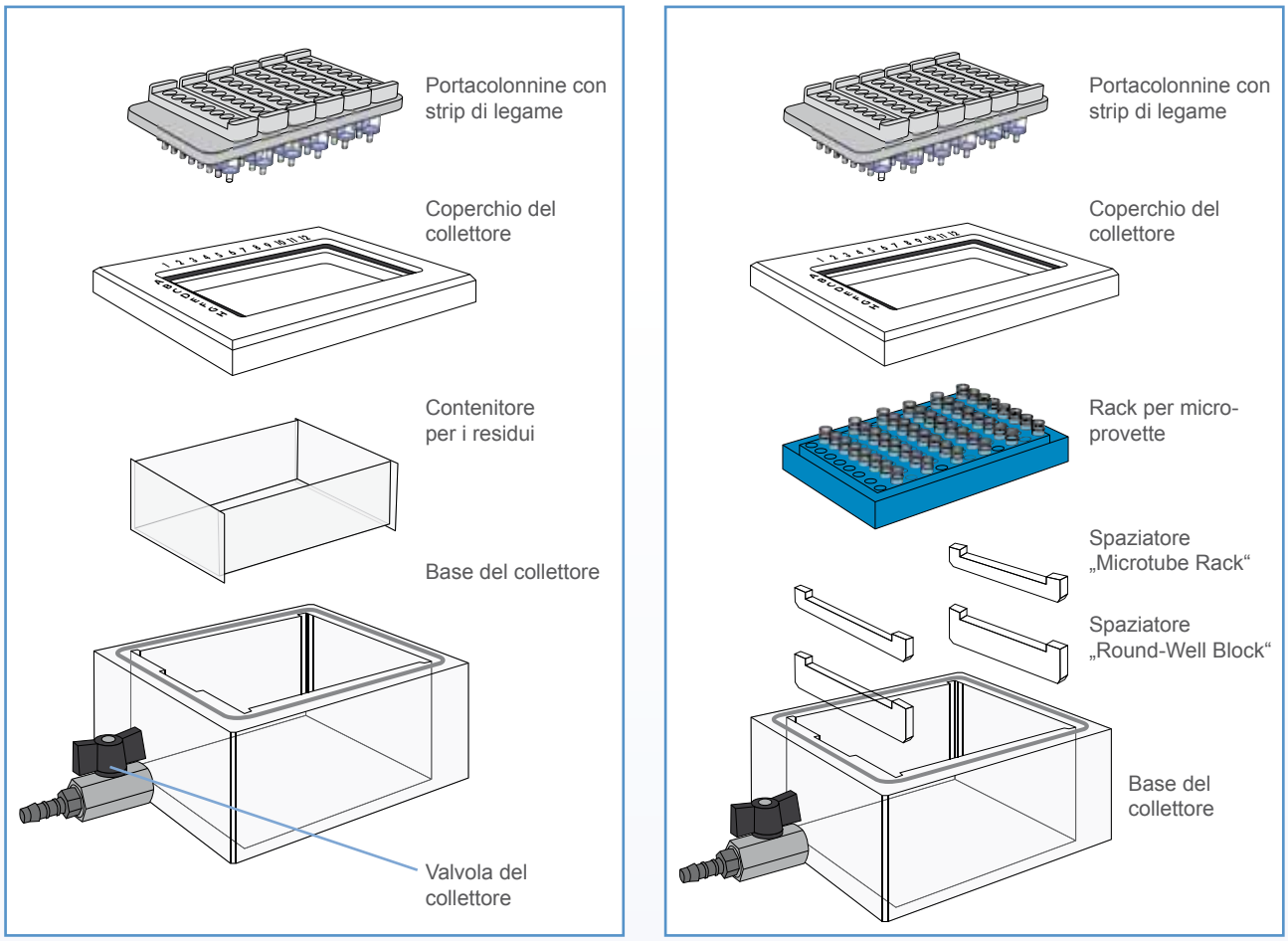


Figura 4: a) Disposizione per il legame del DNA e il lavaggio **b)** Disposizione per l'eluizione del DNA

9.2.1 Disposizione per il legame del DNA e il lavaggio

- Per le procedure di legame del DNA e di lavaggio (punti 10.3.5 - 10.3.7 del protocollo) preparare il **collettore per vuoto** come mostrato nella figura 4a.
- Collocare uno dei due **contenitori per i residui*** all'interno della **base del collettore**.
- Chiudere la **base del collettore** con il **coperchio del collettore**.
- Collocare il **portacolonnine** nella guarnizione in gomma del **coperchio del collettore**.
- Inserire il numero necessario di **strip di legame** nel **portacolonnine**.
- Verificare che le **strip di legame** siano inserite correttamente e che si innestino saldamente nel **portacolonnine** (quando scattano in posizione si udirà distintamente un "clic"). Se vengono trattati contemporaneamente meno di 48 campioni, inserire nel portacolonnine soltanto il numero di **strip di legame** necessario e riempire le posizioni rimanenti del **portacolonnine** con il numero appropriato di **strip fittizie**.

!

Verificare che le **strip di legame** e le **strip fittizie** siano correttamente inserite nel **portacolonnine** prima di applicare il vuoto.
* Non collocare il **contenitore per i residui** in lavastoviglie per pulirlo!

9.2.2 Disposizione per l'eluizione del DNA

Per la fase di eluizione del DNA (punto 10.3.8 del protocollo) il **collettore per vuoto** deve essere modificato come mostrato nella **figura 4b**.

- Rimuovere il **portacolonnine** insieme con le **strip di legame** e collocarlo su un **foglio di carta** pulito (fornito nel kit).
- Rimuovere il **coperchio del collettore** e il **contenitore per i residui** usato.
- Inserire gli **spaziatori per blocco con pozzetti rotondi** e sopra di essi quelli per **rack per microprovette** nei lati corti della **base del collettore** (**figura 4b**).
- Collocare il **rack per microprovette** sugli **spaziatori**.
- Collocare il numero appropriato di provette per PCR etichettate ogni 2 file del **rack per microprovette** iniziando dalla fila N. 2 del **rack**.
- Chiudere il **collettore per vuoto** e collocare le **strip di legame** in cima. Verificare che ogni **strip di legame** sia posizionata direttamente al di sopra di una provetta per PCR per raccogliere il DNA eluito (**figura 4c**). Controllare nuovamente che tutte le **strip di legame** e le **strip fittizie** siano ancora correttamente inserite nel **portacolonnine**.

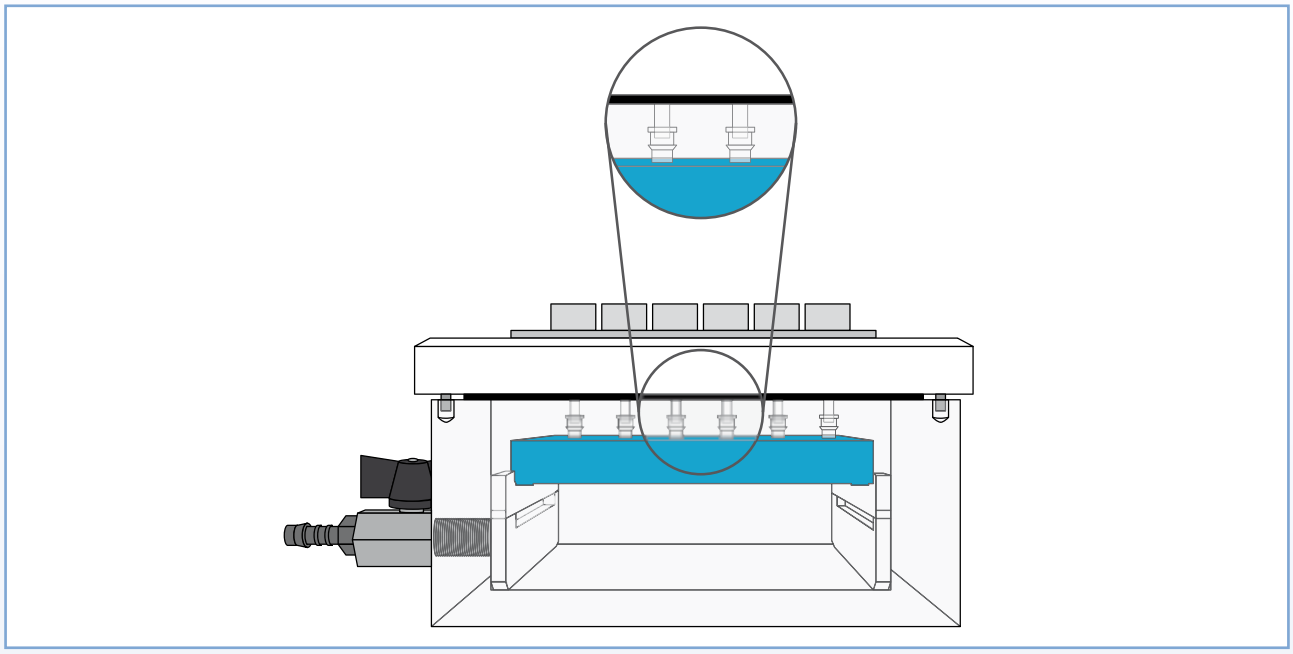


Figura 4c: Ogni colonnina della strip di legame deve essere posizionata direttamente al di sopra di una provetta per PCR della strip per PCR.

9.3 Assemblaggio della pompa a vuoto oCheck® VacPump

Collocare la pompa a vuoto oCheck® VacPump su un bancone di laboratorio stabile. La pompa a vuoto oCheck® VacPump deve essere assemblata come mostrato nella figura 5a. Per collegare la pompa a vuoto oCheck® VacPump al **collettore per vuoto,** utilizzare il più lungo dei due **tubi di collegamento** forniti. Tagliare il **tubo di collegamento** più corto in due parti (di circa 4 e 5 cm). Utilizzare il **tubo di collegamento** di 5 cm per collegare la pompa a vuoto oCheck VacPump al **regolatore del vuoto**. Fissare il **silenziatore** sul lato opposto della pompa a vuoto oCheck® VacPump in corrispondenza dello scarico utilizzando il **tubo di collegamento** di 4 cm.

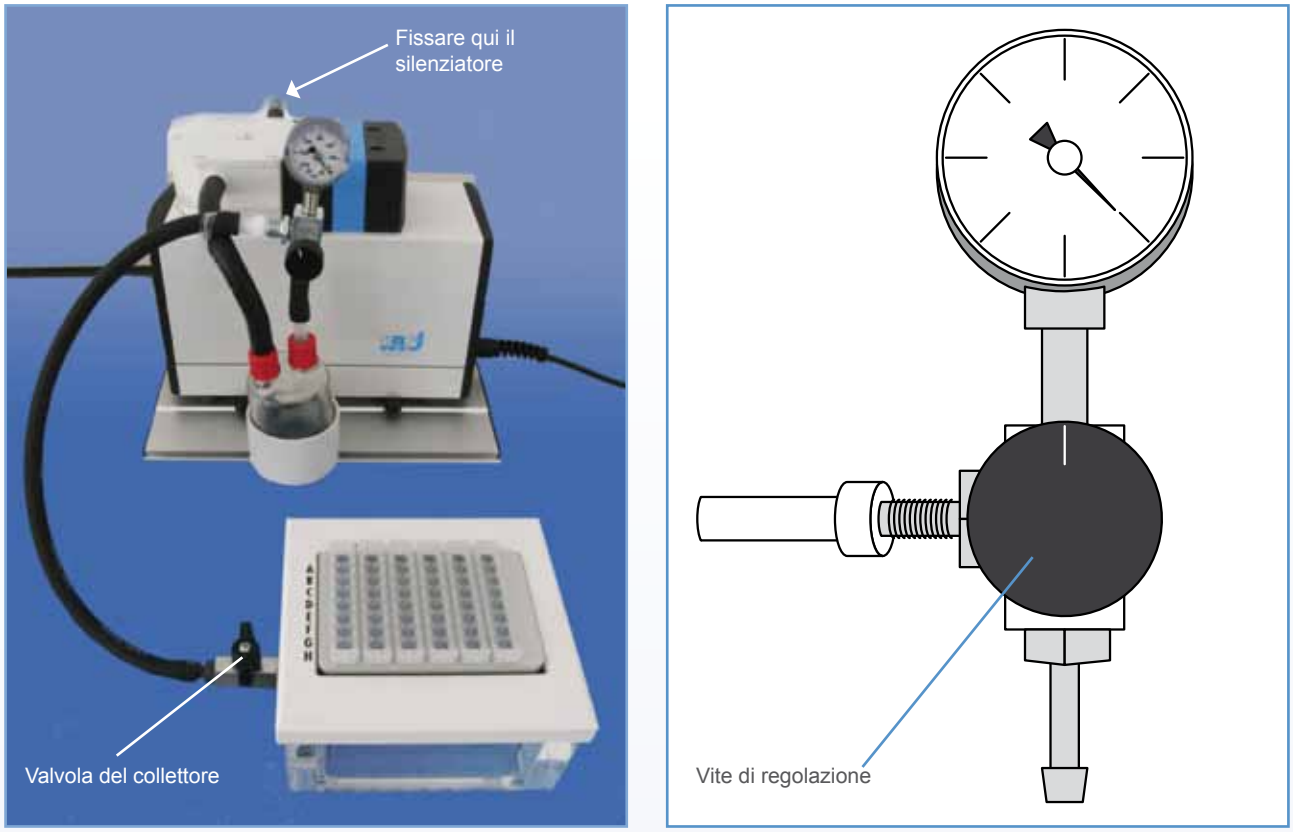


Figura 5: a) Assemblaggio della pompa a vuoto oCheck® VacPump **b)** Regolatore del vuoto

9.4 Impostazione del vuoto

Verificare che il **coperchio del collettore**, il **portacolonnine** e le **strip di legame** siano posizionati correttamente. Chiudere la **valvola del collettore** (**figura 5a**). Avviare la **pompa a vuoto**. Regolare il vuoto come indicato nel protocollo del kit per mezzo del **regolatore del vuoto** (**figura 5b**). Aprire la **vite di regolazione** fino a ottenere il vuoto desiderato.

9.5 Applicazione del vuoto

Caricare i campioni nelle singole **strip di legame**. Aprire la **valvola del collettore** e, se necessario, premere brevemente le **strip di legame** fino all'avvio del flusso.

9.6 Ventilazione del collettore

Quando i campioni sono passati attraverso il filtro delle **strip di legame,** chiudere la **valvola del collettore** e spegnere la **pompa a vuoto**. Attendere circa 30 secondi finché il **portacolonnine** con le **strip di legame** non risulta facile da rimuovere.

10. PREPARAZIONE CON 8 COLONNINE (N. cat. 515 050)

10.1 Preparazione delle soluzioni di lavoro e condizioni di conservazione

Tutti i componenti del kit devono essere conservati a **temperatura ambiente (18-25 °C)** e sono stabili per **due anni** dalla data di fabbricazione.

Prima di iniziare il protocollo del Kit di estrazione del DNA oCheck®, preparare le seguenti soluzioni:

1. Soluzione di **proteinasi K**: prima di utilizzare il kit per la prima volta, aggiungere **3,35 ml** di **tampone per proteinasi (PKB)** per disciogliere la **proteinasi K** liofilizzata. Suddividere la soluzione in aliquote e conservarle a -20 °C per un massimo di 6 mesi. Non ricongelarle.

2. **Tampone W2:** aggiungere **200 ml** di **etanolo** (p.a. ≥ 99,8 %) al **tampone W2** concentrato. Segnare la data corrente sull'etichetta del flacone. Il **tampone W2** è stabile a **temperatura ambiente (18-25 °C)** fino a **un anno**.

3. **Tampone L4:** trasferire tutto il **tampone L2** nel **reagente L3** e mescolare bene. Etichettare il flacone con l'etichetta **L4** fornita nel kit. Segnare la data corrente sull'etichetta del flacone. Il **tampone L4** ottenuto è stabile fino a **un anno** a **temperatura ambiente (18-25 °C)**.

4. Soluzione di **RNA carrier**: aggiungere **900 µl** di **tampone L1** per disciogliere l'**RNA carrier** liofilizzato. Suddividere in aliquote l'**RNA carrier** disciolto, ad es. in aliquote di **50 µl** per 16 estrazioni. Conservare la soluzione di RNA carrier disciolto a **-20° C**. Non ricongelarla! Dopo essere state scongelate, le provette usate vanno gettate vie.

A seguito della conservazione, specialmente se avvenuta a basse temperature, si può formare un precipitato bianco nei **tamponi L1, L2 o L4**. Tali precipitati possono essere facilmente disciolti incubando il flacone a **50-70 °C** prima dell'uso.

10.2 Preparazione dei campioni

10.2.1 Preparazione dei campioni per i kit Papill**oCheck**® e Papill**oCheck**® **high-risk**

I campioni di strisci cervicali umani raccolti in
- Papill**oCheck**® Collection Kit (Greiner Bio-One; N. cat. 465 070)
- mezzo di raccolta **PreservCyt**® (Hologic, Bedford, MA, USA)

possono essere trattati direttamente.

I campioni di strisci cervicali raccolti in
- mezzo di raccolta **Surepath™** (BD, Franklin Lakes, NJ USA) devono essere sottoposti a lavaggio prima dell'uso: centrifugare **250 µl** del campione per **5 minuti** a **11.000 g** e risospendere il pellet in **250 µl** di acqua distillata.

I campioni di strisci cervicali raccolti in
- mezzo di raccolta **STM™** (Qiagen, Hilden, Germania) devono essere diluiti in acqua distillata: **100 µl** di campione + **150 µl** di acqua distillata.

!

In generale, se il campione di striscio cervicale è molto concentrato e già aggregato, deve essere diluito e omogeneizzato prima di iniziare l'estrazione!

I campioni di strisci cervicali molto diluiti che non presentano cellule visibili devono essere concentrati per ottenere una maggiore quantità di cellule per l'estrazione. Centrifugare fino a **1000 µl** di campione per **5 minuti** a **11.000 g** e risospendere il pellet in **250 µl** di acqua distillata.

Questa procedura di concentrazione può essere eseguita unicamente sui campioni di strisci cervicali raccolti con il Papill**oCheck**® Collection Kit, il mezzo di raccolta **PreservCyt**® o il mezzo di raccolta **Surepath™**. In caso di uso del mezzo di raccolta **STM™**, non è possibile concentrare il campione mediante centrifugazione.

➠ Pipettare 250 µl della soluzione del campione in un tubo di reazione da 1,5 ml o 2 ml. Per evitare contaminazioni, utilizzare tubi di reazione con chiusura di sicurezza o tappo a vite per la fase di lisi.

Si consiglia di validare l'intera procedura di isolamento del DNA di ogni ciclo di estrazione del DNA utilizzando un controllo negativo.

10.3 Protocollo standard

Quando si utilizza il Kit di estrazione del DNA oCheck® - Preparazione con 8 colonnine - sotto vuoto, è necessario un sistema di vuoto appropriato. Per le apparecchiature necessarie e per le istruzioni di installazione e d'uso fare riferimento al capitolo 9.

10.3.1 Preparazione

- Verificare che la centrifuga sia impostata a **temperatura ambiente (18-25 °C)**.
- Preparare i campioni come indicato nel capitolo 10.2
- Impostare i blocchi riscaldanti o i bagni termostatici a **56 ºC** e **70 ºC**, rispettivamente.
- Prima dell'eluizione, incubare il **tampone E** di eluizione a **70 ºC**.
- Accertarsi che le soluzioni di lavoro siano state preparate come indicato nel capitolo 10.1.

10.3.2 Prelisi

- Aggiungere **80 µl** di **tampone L1**.
- Aggiungere **2,4 µl** della soluzione di **RNA carrier** preparata.
- Aggiungere **20 µl** di soluzione di **proteinasi K**.
- Chiudere il tappo e mescolare brevemente passando al vortex a impulsi.

> **!** In caso di trattamento di vari campioni, **la proteinasi K, il tampone L1** e **l'RNA carrier** devono essere premiscelati subito prima dell'uso. Non miscelare mai il **tampone L1** e la **proteinasi K** più di 10-15 minuti prima dell'aggiunta nel campione. **La proteinasi K** tende all'autolisi se posta in **tampone L1** senza substrato.

- Incubare a **56 ºC** per almeno **30 minuti**. Agitare i campioni utilizzando un thermomixer a **650 rpm**. Se si utilizza un blocco riscaldante o un bagno termostatico, durante il periodo di incubazione passare di tanto in tanto i campioni al vortex.

10.3.3 Lisi

- Centrifugare brevemente il tubo di reazione per rimuovere eventuali gocce dall'interno del tappo.
- Aggiungere **250 µl** di **tampone L4**.
- Chiudere il tappo e mescolare passando al vortex a impulsi per **10 secondi**.
- Incubare a **70 ºC** per **15 minuti**.
- Chiudere saldamente i tappi dei tubi di reazione per evitare che si possano aprire accidentalmente.

10.3.4 Ottimizzazione delle condizioni di legame del DNA

- Centrifugare brevemente il tubo di reazione per rimuovere eventuali gocce dall'interno del tappo.
- Aggiungere **300 µl** di **etanolo** (p.a. ≥ 99,8 %) al campione.
- Chiudere immediatamente il tappo e mescolare accuratamente mediante passaggio sul vortex a impulsi per **15 secondi**.
- Centrifugare brevemente il tubo di reazione per rimuovere eventuali gocce dall'interno del tappo.

10.3.5 Legame del DNA

- Preparare il collettore per vuoto oCheck® come mostrato nella **figura 6** (fare riferimento al capitolo 9 per una descrizione più dettagliata).

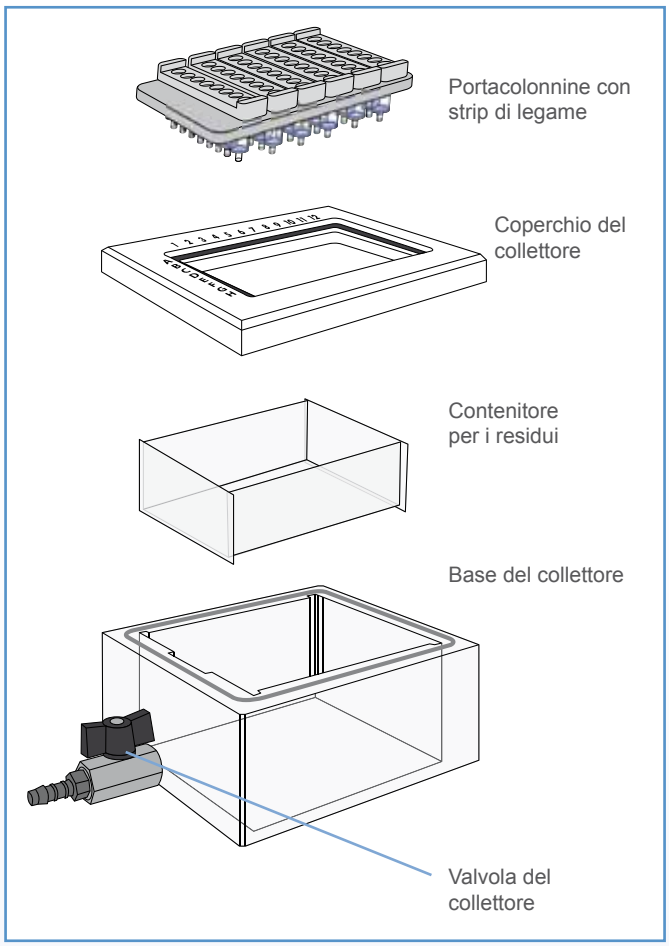


Figura 6: Disposizione per il legame del DNA e il lavaggio

- Collocare uno dei due **contenitori per i residui*** all'interno della **base del collettore**.
- Chiudere la **base del collettore** con il **coperchio del collettore**.
- Collocare il **portacolonnine** nella guarnizione in gomma del **coperchio del collettore**.
- Inserire il numero necessario di **strip di legame** nel **portacolonnine**. Verificare che le **strip di legame** siano inserite correttamente e che si innestino saldamente nel **portacolonnine** (quando scattano in posizione si udirà distintamente un "clic"). Se vengono trattati contemporaneamente meno di 48 campioni, inserire nel portacolonnine soltanto il numero di **strip di legame** necessario e riempire le posizioni rimanenti del **portacolonnine** con il numero appropriato di **strip fittizie**.

!

Verificare che le **strip di legame** e le **strip fittizie** siano correttamente inserite nel **portacolonnine** prima di applicare il vuoto.

* Non collocare il **contenitore per i residui** in lavastoviglie per pulirlo!

- Pipettare attentamente **900 µl** dei lisati nei pozzetti delle **strip di legame** e fare attenzione a non bagnare i bordi dei pozzetti (**figura 7**).

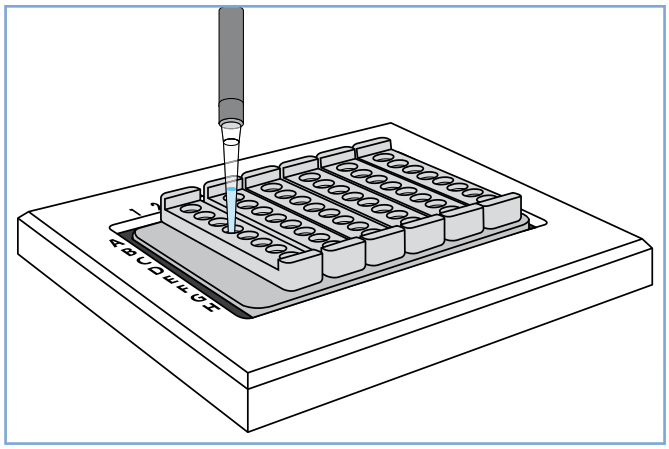
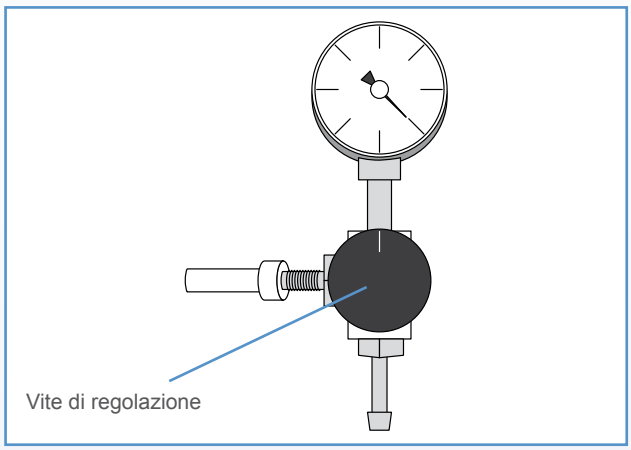


Figura 7: Pipettaggio del lisato nei pozzetti delle strip di legame

- Impostare il vuoto su **-200 mbar** tramite il regolatore del vuoto (**figura 8a**).
- Applicare lentamente il vuoto aprendo la **valvola del collettore** finché tutti i lisati non sono passati attraverso le colonnine (**figura 8b**).



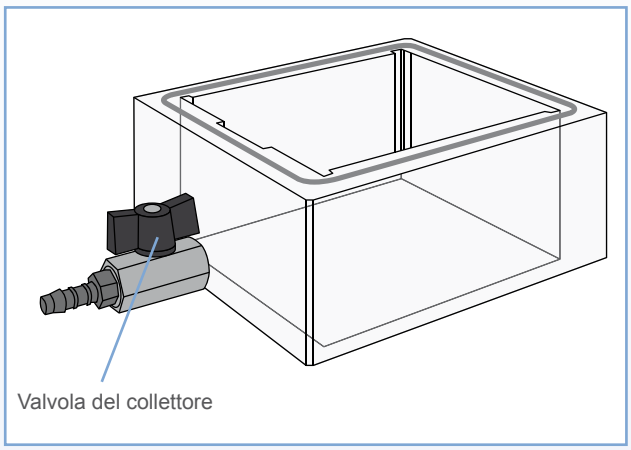


Figura 8: a) Regolatore del vuoto **b)** Valvola del collettore

- Arrestare il vuoto subito dopo il passaggio di tutto il liquido attraverso le colonnine (circa **30 secondi**) per evitare la formazione di schiuma, chiudendo la **valvola del collettore**.
- Spegnere la **pompa a vuoto** e ripristinare le normali condizioni di pressione.

10.3.6 Lavaggio delle strip di legame

Per le operazioni descritte di seguito è consigliabile utilizzare la pipetta a 8 canali e le apposite vaschette per reagenti (i volumi di tampone necessari in caso di uso di vaschette per reagenti sono indicati nella **tabella 1**).
Se si usano vaschette per i tamponi, preparare la quantità appropriata di soluzioni tampone

Numero di campioni da estrarre	8	16	24	32	40	48
Tampone W1	6,5 ml	12 ml	17,5 ml	23 ml	28,5 ml	34 ml
Tampone W2*	16 ml	32 ml	48 ml	64 ml	80 ml	96 ml

Tabella 1: Quantità di soluzioni tampone necessaria per n = x campioni

* Prima di usarlo per la prima volta, aggiungere 200 ml di etanolo (vedere anche il capitolo 10.1).

- Aggiungere **600 µl** di **tampone W1** in ciascun pozzetto delle **strip di legame** (**figura 9 a+b**).

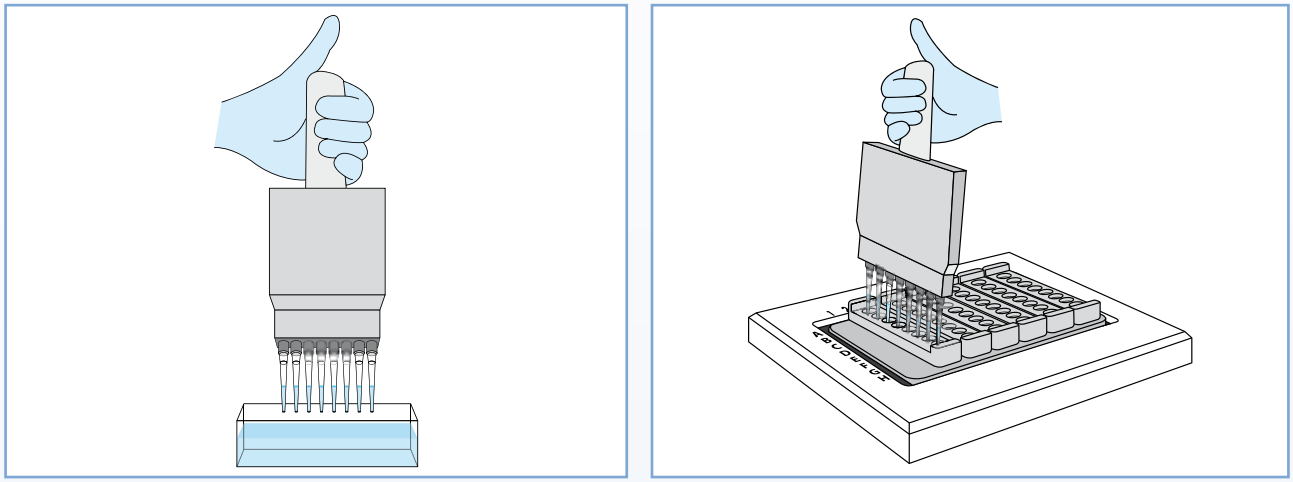


Figura 9: a) Pipettaggio del tampone W1 dalla vaschetta del tampone. **b)** Aggiunta del tampone W1 nei pozzetti delle strip di legame.

- Impostare il vuoto su **-200 mbar** mediante il **regolatore del vuoto**.
- Applicare lentamente il vuoto aprendo la **valvola del collettore** finché tutti i lisati non sono passati attraverso le colonnine (**figura 8**).
- Arrestare il vuoto chiudendo la **valvola del collettore** subito dopo il passaggio di tutto il liquido attraverso le colonnine (circa **30 secondi**) per evitare la formazione di schiuma.
- Aggiungere **900 µl** di **tampone W2** in ciascun pozzetto delle **strip di legame**.
- Impostare il vuoto su **-200 mbar** mediante il **regolatore del vuoto**.
- Applicare il vuoto finché il tampone non è passato attraverso le colonnine (circa **30 secondi**).
- Arrestare il vuoto chiudendo la **valvola del collettore** subito dopo il passaggio di tutto il liquido attraverso le colonnine (circa **30 secondi**) per evitare la formazione di schiuma.
- Aggiungere **900 µl** di **tampone W2** in ciascun pozzetto delle **strip di legame**.
- Impostare il vuoto su **-200 mbar** mediante il **regolatore del vuoto**.
- Applicare il vuoto finché tutto il tampone non è passato attraverso le colonnine (circa **30 secondi**).
- Arrestare il vuoto chiudendo la **valvola del collettore** subito dopo il passaggio di tutto il liquido attraverso le colonnine (circa **30 secondi**) per evitare la formazione di schiuma.
- Spegnere la **pompa a vuoto** e ripristinare le normali condizioni di pressione.

10.3.7 Essiccamento delle strip di legame

- Dopo l'ultimo lavaggio, arrestare il vuoto e ventilare il **collettore per vuoto** (sezione 9.6). Rimuovere il **portacolonnine** insieme con le **strip di legame**. Nel frattempo rimuovere il **coperchio del collettore** e il **contenitore per i residui** usato e sostituirlo con quello ancora inutilizzato (pulito).
- Inserire il **coperchio del collettore** insieme con il **portacolonnine** e le **strip di legame** nella **base del collettore**. Verificare nuovamente che il **collettore** sia ben chiuso e che tutte le **strip di legame** o le **strip fittizie** siano inserite correttamente.
- Applicare il vuoto massimo (almeno da **~400 a ~600 mbar** di differenza di pressione) per **10 minuti** per far seccare completamente la membrana.
- Spegnere la **pompa a vuoto** e ripristinare le normali condizioni di pressione.

> **!** Questo passaggio serve per eliminare eventuali tracce di etanolo. L'etanolo presente nel **tampone W2** inibisce le reazioni enzimatiche e deve essere completamente rimosso prima dell'eluizione del DNA.

10.3.8 Eluizione del DNA

Per la procedura di eluizione descritta di seguito il **collettore per vuoto** deve essere modificato come mostrato nella **figura 10**.

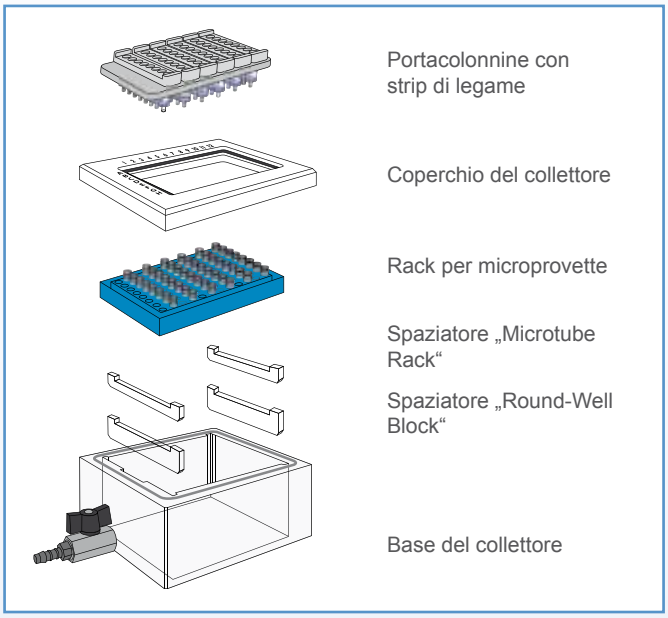


Figura 10: Disposizione per l'eluizione del DNA

- Rimuovere il **portacolonnine** insieme con le **strip di legame** e collocarlo su un **foglio di carta** pulito (fornito nel kit).
- Rimuovere il **coperchio del collettore** e il **contenitore per i residui** usato.
- Inserire gli **spaziatori per blocco con pozzetti rotondi** e sopra di essi quelli per **rack per microprovette** nei lati corti della **base del collettore** (**figura 10**).
- Collocare il **rack per microprovette** sugli **spaziatori**.
- Collocare il numero appropriato di provette per PCR etichettate ogni 2 file del **rack per microprovette** iniziando dalla fila N. 2 del **rack per microprovette**.
- Chiudere il **collettore per vuoto** e collocare le **strip di legame** in cima. Verificare che ogni **strip di legame** sia posizionata direttamente al di sopra di una provetta per PCR per raccogliere il DNA eluito (**figura 11**). Controllare nuovamente che tutte le **strip di legame** e le **strip fittizie** siano ancora correttamente inserite nel **portacolonnine**.

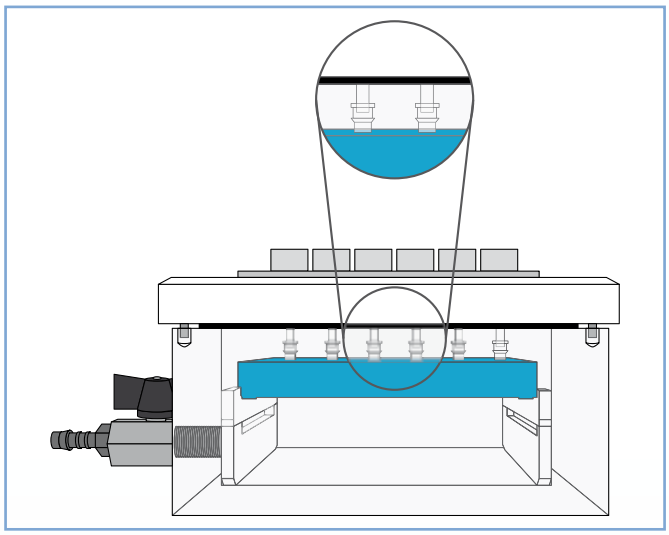


Figura 11: Ogni colonnina della strip di legame deve essere posizionata direttamente al di sopra di una provetta per PCR della strip per PCR.

- Pipettare **100 µl** di **tampone E** preriscaldato **(70 °C)** direttamente sulla membrana di ciascuna **strip di legame** adoperando una pipetta monocanale. **Utilizzare un puntale nuovo per ogni campione.**
- Incubare per **5 minuti** a **temperatura ambiente**.
- Applicare lentamente il vuoto fino a un massimo di **-400 mbar** aprendo la **valvola del collettore**.
- Arrestare rapidamente il vuoto chiudendo la **valvola del collettore** subito dopo il passaggio di tutto il liquido attraverso le colonnine per evitare la formazione di schiuma.
- Spegnere la **pompa a vuoto** e ripristinare le normali condizioni di pressione.
- Chiudere le provette per PCR etichettate e conservarle.

!

Per garantire che il DNA isolato offra prestazioni ottimali nelle applicazioni successive, si raccomanda di eseguire l'eluizione con il **tampone E**. Conservare il DNA estratto a **-20 °C**.
Per ulteriori analisi con saggi appartenenti alla linea di prodotti oCheck® fare riferimento alle rispettive Istruzioni per l'uso (Papill**oCheck®** e Papill**oCheck®** high-risk).

11. RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

Problema e causa	Commenti e suggerimenti
RESA DI DNA BASSA O NULLA	
Lisi incompleta	• Campioni non adeguatamente omogeneizzati e miscelati con il tampone L1/con la proteinasi K. La miscela deve essere agitata vigorosamente al vortex subito dopo l'aggiunta del tampone L1. • Numero insufficiente di cellule nel campione. • Attività ridotta della proteinasi K: suddividere la soluzione in aliquote e conservarle a -20 °C per un massimo di 6 mesi. Non ricongelarle.
Reagenti non applicati correttamente	• Preparare i tamponi L4 e W2, l'RNA carrier e la soluzione di proteinasi K come indicato nella sezione 8.1 o 10.1. Aggiungere l'etanolo ai lisati prima di caricarli nelle colonnine.
Eluizione subottimale del DNA dalla colonnina	• Preriscaldare il tampone E a 70 °C prima dell'eluizione. Applicare il tampone E direttamente al centro della membrana di silice. • L'efficienza di eluizione diminuisce drasticamente se l'eluizione viene eseguita con tamponi con pH < 7,0. Utilizzare tamponi di eluizione leggermente alcalini come il tampone E (pH 8,5).
COLONNINE OSTRUITE	
Lisi incompleta	• Campioni non adeguatamente omogeneizzati e miscelati con il tampone L1/con la proteinasi K. La miscela deve essere agitata vigorosamente al vortex subito dopo l'aggiunta del tampone L1. • Attività ridotta della proteinasi K: suddividere la soluzione in aliquote e conservarle a -20 °C per un massimo di 6 mesi. Non ricongelarle.
Reagenti non applicati correttamente	• Preparare i tamponi L4 e W2, l'RNA carrier e la soluzione di proteinasi K come indicato nella sezione 8.1 o 10.1. Aggiungere l'etanolo ai lisati prima di caricarli nelle colonnine.
PRESTAZIONI SUBOTTIMALI DEL DNA NELLE REAZIONI ENZIMATICHE	
Residui di etanolo o sale	• Certificarsi che la centrifugazione duri almeno 1 minuto a 11.000 g per rimuovere tutto il tampone W2 contenente etanolo prima di eluire il DNA. Se, per un qualsiasi motivo, il livello di tampone W2 ha raggiunto lo scarico della colonnina dopo l'essiccamento, ripetere la centrifugazione. • Non raffreddare il tampone W2 prima dell'uso. Se il tampone è freddo, i sali verranno rimossi in maniera inefficiente. Equilibrare il tampone W2 a temperatura ambiente prima dell'uso.
Contaminazione del DNA con sostanze inibenti	• Non eluire il DNA con tampone TE. L'EDTA potrebbe inibire le reazioni enzimatiche. Ripurificare il DNA ed eluirlo in tampone E. • Se il rapporto A260/A280 dell'eluato è inferiore a 1,6, ripetere la procedura di purificazione: aggiungere all'eluato 1 volume di tampone L4 più 1 volume di etanolo (96-100%). Caricare la miscela su una colonnina da centrifuga e procedere con la fase di legame del DNA (sezione 8.3.5 o 10.3.5) del protocollo standard.

12. ASSISTENZA TECNICA

Greiner Bio-One dispone di un Dipartimento di Assistenza tecnica dotato di personale esperto con approfondite competenze pratiche e teoriche in biologia molecolare e nei prodotti oCheck®.
Per qualsiasi domanda o in caso di problemi nell'uso dei prodotti oCheck®, non esitare a contattare il proprio distributore locale Greiner Bio-One.

13. CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Il Kit di estrazione del DNA oCheck® è un dispositivo per uso diagnostico in vitro per saggi della linea di prodotti oCheck®. Le prestazioni analitiche e specifiche del Kit di estrazione del DNA oCheck® sono state testate in combinazione con il saggio corrispondente. Fare riferimento alle Istruzioni per l'uso dei rispettivi prodotti oCheck® per una descrizione dettagliata delle prestazioni [Papill**oCheck**® (Greiner Bio-One; N. cat. 465 060), Papill**oCheck**® high-risk (Greiner Bio-One; N. cat. 505 060) e Pelv**oCheck**® CT/NG (Greiner Bio-One; N. cat. 504 002)].

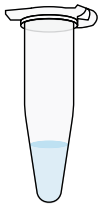
14. PROTOCOLLI BREVI

14.1 Protocollo breve per la preparazione con colonnina singola (N. cat. 515 040)

Estrazione del DNA con il Kit di estrazione del DNA oCheck® - Preparazione con colonnina singola (Greiner Bio-One N. cat. 515 040)

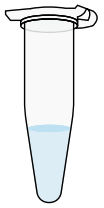
1. PREPARAZIONE

- Verificare che la centrifuga sia impostata a temperatura ambiente (18-25 °C)
- Preparare le soluzioni di lavoro come indicato nel capitolo 8.1
- Impostare i blocchi riscaldanti o i bagni termostatici a 56 °C e 70 °C
- Preriscaldare il tampone E di eluizione a 70 °C
- Preparare i campioni come indicato nel capitolo 8.2
- Pipettare 250 µl di campione in un tubo di reazione da 1,5 o 2,0 ml



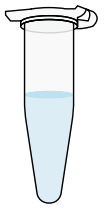
2. PRELISI

- 80 µl di tampone L1
- 2,4 µl di soluzione di RNA carrier
- 20 µl di soluzione di proteinasi K
- Passare brevemente al vortex!
- 56 °C per almeno 30 minuti
- Centrifugare brevemente!



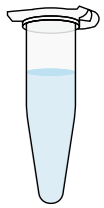
3. LISI

- 250 µl di tampone L4
- Passare brevemente al vortex!
- 70 °C per 15 minuti
- Centrifugare brevemente!



4. OTTIMIZZAZIONE DELLE CONDIZIONI DI LEGAME DEL DNA

- 300 µl di etanolo
- Passare brevemente al vortex
- Centrifugare brevemente



PROTOCOLLO BREVE

5. LEGAME DEL DNA

- Preparare le colonnine da centrifuga
- 450 µl di lisato
- 1 minuto a 11.000 g
- 450 µl di lisato
- 1 minuto a 11.000 g

6. LAVAGGIO DELLE COLONNINE DA CENTRIFUGA

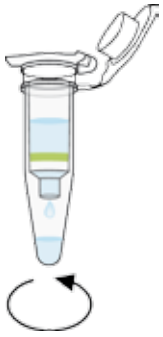
- 500 µl di tampone W1
- 1 minuto a 11.000 g
- 600 µl di tampone W2
- 1 minuto a 11.000 g

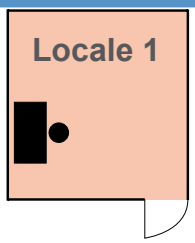
7. ESSICCAMENTO DELLE COLONNINE DA CENTRIFUGA

- Centrifugare 1 minuto a 11.000 g

8. ELUIZIONE DEL DNA

- 100 µl di tampone E (preriscaldato a 70 °C)
- 1 minuto a temperatura ambiente (18-25 °C)
- 1 minuto a 11.000 g



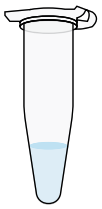


14.2 Protocollo breve per la preparazione con 8 colonnine (N. cat. 515 050)

Estrazione del DNA con il Kit di estrazione del DNA oCheck® - Preparazione con 8 colonnine (Greiner Bio-One N. cat. 515 050)

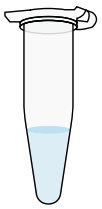
1. PREPARAZIONE

- Verificare che la centrifuga sia impostata a temperatura ambiente (18-25 °C)
- Preparare le soluzioni di lavoro come indicato nel capitolo 10.1
- Impostare i blocchi riscaldanti o i bagni termostatici a 56 °C e 70 °C
- Preriscaldare il tampone E di eluizione a 70 °C
- Preparare i campioni come indicato nel capitolo 10.2
- Pipettare 250 µl di campione in un tubo di reazione da 1,5 o 2,0 ml



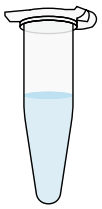
2. PRELISI

- 80 µl di tampone L1
- 2,4 µl di soluzione di RNA carrier
- 20 µl di soluzione di proteinasi K
- Passare brevemente al vortex!
- 56 °C per almeno 30 minuti
- Centrifugare brevemente!



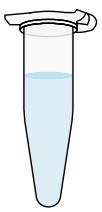
3. LISI

- 250 µl di tampone L4
- Passare brevemente al vortex!
- 70 °C per 15 minuti
- Centrifugare brevemente!



4. OTTIMIZZAZIONE DELLE CONDIZIONI DI LEGAME DEL DNA

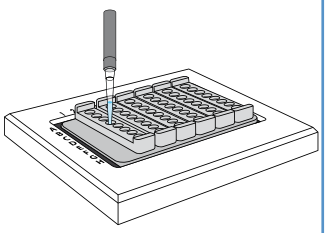
- 300 µl di etanolo
- Passare brevemente al vortex
- Centrifugare brevemente



PROTOCOLLO BREVE

5. LEGAME DEL DNA

- Pipettare 900 µl di lisato nelle strip di legame
- Applicare il vuoto: -200 mbar*
- Evitare la formazione di schiuma!

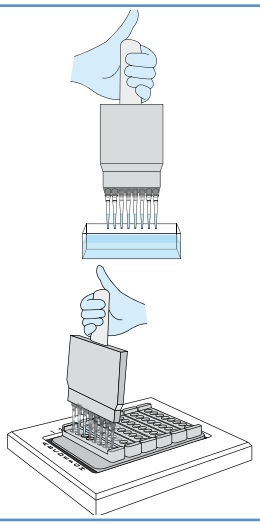


6. LAVAGGIO DELLE STRIP DI LEGAME

- 1° lavaggio con 600 µl di tampone W1
- 2° lavaggio con 900 µl di tampone W2
- 3° lavaggio con 900 µl di tampone W2

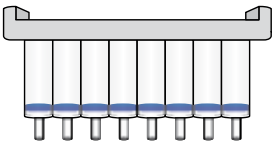
Per ogni lavaggio:

- 30-60 secondi
- -200 mbar*
- Evitare la formazione di schiuma!



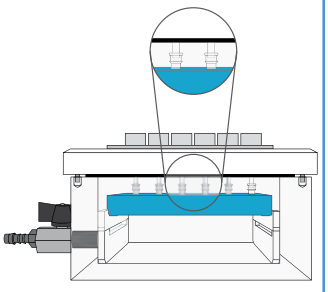
7. ESSICCAMENTO DELLE STRIP DI LEGAME

- 10 minuti a -600 mbar*



8. ELUIZIONE DEL DNA

- 100 µl di tampone E (preriscaldato a 70 °C)
- 5 minuti a temperatura ambiente (18-25 °C)
- Applicare il vuoto: -400 mbar*
- Evitare la formazione di schiuma!



* Riduzione della pressione atmosferica: a seconda della viscosità del campione, potrebbe essere necessario prolungare il tempo di filtrazione o aumentare il vuoto (ad es. da -200 a – 400 mbar).