



Für die Labordiagnostik



Kylt[®]

Kylt[®] RNA / DNA Purification HTP

Kit für die automatisierte Aufreinigung von
RNA und DNA aus diagnostischen Proben

www.kylt.eu

Kylt® RNA / DNA Purification HTP

Aufreinigungskit für RNA und DNA aus diagnostischen Proben

4x 96 Aufreinigungen

A. Einleitung

Kylt® RNA / DNA Purification HTP wurde entwickelt, um den ersten entscheidenden Schritt in jeder Anwendung in der molekularen Diagnostik zu vereinfachen, nämlich die Aufreinigung von Zielnukleinsäuren aus gängigen diagnostischen Proben.

Kylt® RNA / DNA Purification HTP ist für die Verwendung mit automatisierten Systemen, insbesondere dem Kylt® Purifier, vorgesehen. Es ermöglicht die gleichzeitige Aufreinigung aller relevanten Nukleinsäuren (virale RNA und DNA sowie pro- und eukaryotische RNA und DNA, z.B. aus Bakterien und dem jeweiligen Wirtsorganismus) aus einem breiten Spektrum von Probenmatrices wie Tupfern, Gewebe, Kot, Serum, Plasma und anderen Körperflüssigkeiten, die von Menschen, verschiedenen Tierspezies und aus ihrer Umgebung stammen. Proben, die aus kulturellen Prozessen stammen, z.B. bakterielle Voranreicherungen, können auch direkt verwendet werden.

Dieses Kit ist für die Verwendung durch geschultes Laborpersonal gemäß den in diesem Handbuch beschriebenen standardisierten Verfahren vorgesehen.

Bei der Arbeit mit diesem Kit ist stets geeignete persönliche Schutzausrüstung, wie Laborkittel, Handschuhe und Schutzbrille zu tragen und die angegebenen Sicherheitshinweise sind zu beachten.

B. Kitinhalt

- Alle Komponenten sind bei Raumtemperatur zu lagern und für 15 Monate ab Produktionsdatum verwendbar.

Reagenz	Menge für 4x96 Aufreinigungen	Hinweis	GHS Symbol
Lysis Solution	100 ml	Falls benötigt, bitte IC-RNA* zusetzen und in angemessenen Portionen bei ≤ -18 °C lagern.	
Proteinase K	5x 1800 µl	Nach dem Öffnen bei +2 bis +8 °C lagern.	
Magnetic Beads	5x 1800 µl		
Binding Solution	2x 110 ml		
Wash Solution	4x 125 ml		
Elution Buffer	125 ml		

*Bei Verwendung von Kylt® Real-Time RT-PCR Detection Kits ist die Zugabe von 5 µl Kylt® IC-RNA pro Probenvorbereitung ausreichend. Abhängig von den verwendeten Proben kann die Menge an Kylt® IC-RNA pro Probe auf Basis einer laborinternen Validierung des Endanwenders im Rahmen des Qualitätsmanagementsystems angepasst werden.

Folgendes Material wird zusätzlich benötigt:

- Kylt® Purifier oder andere Magnetpartikelprozessoren oder Laborroboter.
- Kylt® Purifier Plates, Kylt® Purifier Spin Tips bzw. die jeweiligen Verbrauchsmaterialien.
- Kylt® Purifier oder beheizbarer Plattenschüttler.
- Vortexer.
- 80 % v/v Ethanol (für den letzten Waschschrift).
- Pipetten für 1 µl bis 1000 µl, gegebenenfalls elektronisch und Mehrkanal mit passenden Filterspitzen.
- Homogenisierer für Gewebeproben (z.B. Stahl- und Keramikkugelhörchen, Rotor-Stator oder Mörser und Pistill).
- Physiologische Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %) zur Tupferauswaschung und zur Gewebehomogenisierung.

C. Hinweise für eine erfolgreiche Anwendung

- Es sollte sehr sorgfältig darauf geachtet werden, dass die gereinigte RNA nicht durch eine RNase-Kontamination abgebaut wird. RNasen sind sehr stabile und aktive Enzyme. Obwohl sie durch die Komponenten des Kits inaktiviert werden, sollte jede zusätzliche RNase-Kontamination vermieden werden, um höchste Sensitivität in nachfolgenden Untersuchungen zu garantieren.
- Um die RNase-Freiheit zu gewährleisten, sollten:
- Nur nuklease-freie (PCR-grade) Verbrauchsmaterialien verwendet werden.
- Bei allen manuellen Schritten und beim Umgang mit der Eluateplatte Handschuhe getragen werden.
- Aufgereinigte Nukleinsäuren alsbald kühl gelagert werden.

D. Probenvorbereitung

- Eine Poolung ist möglich, sollte aber für das jeweilige Nachweissystem validiert werden. Es wird empfohlen, maximal fünf Einzelproben bzw. Proben von fünf Individuen pro Aufreinigung zu nehmen.
- Tupferproben sollten in steriler Kochsalzlösung (0,9%) für mindestens 5 Minuten eingeweicht werden. Zum Auswaschen empfiehlt sich gründliches Puls-Vortexen. Der Überstand (200 µl) kann direkt als Probe verwendet werden, zu der noch Proteinase und Lysis Solution zugegeben werden müssen.
- Alternativ können die Tupferproben in einer Mischung aus Wasser und Kylt® Lysis Solution (2:1,3 v/v) ausgewaschen werden. 330 µl des Überstandes (lysierte Tupferprobe) müssen dann nur noch mit der Proteinase vermischt werden. Dieses Verfahren inaktiviert virale Pathogene in einem frühen Stadium des Protokolls. Die Kylt® Swab Wash Solution ist separat erhältlich und besteht aus bereits verdünnter Kylt® Lysis Solution.
- Gewebeproben sollten gründlich in sterilem Puffer homogenisiert werden (siehe oben). Die Probe durch kurzes Zentrifugieren von großen Partikeln befreien und den Überstand verwenden. Bis zu 20 mg Gewebe können pro Probe verwendet werden, hierzu z.B. 40 mg in 400 µl Puffer homogenisieren, dann 200 µl Überstand verwenden.
- Material aus Kultivierungen, wie z.B. Zellkulturüberstand, Allantoisflüssigkeit oder andere flüssige Proben mit wenigen zellulären Bestandteilen, wie z.B. bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit, können direkt verwendet werden.
- Stuhl- bzw. Kotproben sollten in dem 10-fachen Volumen eines sterilen Puffers suspendiert werden. Zum Entfernen großer Partikel kurz zentrifugieren. 200 µl Überstand verwenden.
- Bis zu 5 Ausschnitte von Probenkarten (z.B. AniCard oder FTA-Karten), die mit den oben genannten Proben geladen sind, können pro Aufreinigung verwendet werden. Diese werden in ein Röhrchen gegeben und mit 200 µl sterilem Puffer versetzt (siehe oben). Fahren Sie mit dem Protokoll durch die Lyse fort (Zugabe von Lysis Solution und Proteinase K), und übertragen Sie das Lysat (ohne die Ausschnitte) in ein Well der verwendeten Platte. Je nach Grösse und Anzahl der Stanzen müssen die Volumina von sterilem Puffer, Lysis Solution und Proteinase K angepasst werden. 350 µl Lysat verwenden. Bitte beachten Sie, dass ein erhöhtes Auswaschvolumen die Probe verdünnt und zu einer verminderten Empfindlichkeit führen kann.

E. Verwendung mit dem Kylt® Purifier

1. Lyse

Variante 1: 20 µl Proteinase K in ein Well der Deep-Well-Platte geben.

Variante 2: 20 µl Proteinase K und 20 µl Magnetic Beads in ein Well der Deep-Well-Platte geben.

- In jedes verwendete Well einer Kylt® Purifier Plate 200 µl Probe und 130 µl Lysis Solution zugeben oder 330 µl Tupferauswaschung (in Kylt® Swab Wash Solution) geben.
- Methode "Kylt Lysis" im Kylt Purifier starten.
- Kylt® Purifier Spin Tips auf Position 8 laden.
- Kylt® Purifier Plate mit den Proben auf Position 1 laden und den Start der Methode bestätigen.

2. Vorbereitung der Waschplatten

- Während der Lyse vier Kylt® Purifier Plates wie folgt vorbereiten:
 - Die erste Kylt® Purifier Plate mit "W-1" beschriften und in jedes verwendete Well 500 µl Wash Solution geben.
 - Die zweite Kylt® Purifier Plate mit "W-2" beschriften und in jedes verwendete Well 500 µl Wash Solution geben.
 - Die dritte Kylt® Purifier Plate mit "W-3" beschriften und in jedes verwendete Well 500 µl 80 % Ethanol geben.
 - Die vierte Kylt® Purifier Plate mit "ELUT" beschriften und in jedes verwendete Well 100 µl Elution Buffer geben.

3. Bindung

- Wenn das "Kylt Lysis" Protokoll durchgelaufen ist, direkt das Protokoll "Kylt Purif" starten.
- Die Kylt® Purifier Spin Tips verbleiben auf Platz 8, Abfrage entsprechend bestätigen.
- Die Kylt® Purifier Plate mit den Proben von Position 1 entnehmen.
- 20 µl Magnetic Beads zu jedem verwendeten Well der Kylt® Purifier Plate geben (falls nicht bereits vor der Lyse erfolgt (Variante 1)).
- 500 µl Binding Solution zu jedem verwendeten Well der Kylt® Purifier Plate geben.

4. Aufreinigung

- Die Kylt® Purifier Plate mit den Proben auf Position 1 zurücksetzen und dies am Display bestätigen.
- Die Kylt® Purifier Plates beschriftet mit W-1, W-2, W-3 und ELUT nach Displayanzeige laden.
- Start der Aufreinigung bestätigen.

5. Abschluss der Aufreinigung

- Die Methode ist nach etwa 30 Minuten durchgelaufen und die Platte "ELUT" mit der aufgereinigten RNA / DNA befindet sich vorne im Kylt® Purifier.
- Platte ELUT entnehmen.
- Eluate entweder direkt für die PCR-Analytik verwenden oder aber Platte mit Klebefolie verschließen und gekühlt lagern.
- Langfristige Lagerung tiefgekühlt bei ≤ -18 °C oder ≤ -70 °C.
- Alle weiteren Kylt® Purifier Plates und die Kylt® Purifier Spin Tips entnehmen und entsorgen.
- Gegebenenfalls UV-Dekontamination starten.

F. Manuelle Anwendung

1. Lyse

Variante 1: 20 µl Proteinase K in ein Well der Deep-Well-Platte geben.

Variante 2: 20 µl Proteinase K und 20 µl Magnetic Beads in ein Well der Deep-Well-Platte geben.

- In jedes verwendete Well einer Kylt® Purifier Plate 200 µl Probe und 130 µl Lysis Solution zugeben oder 330 µl Tupferauswaschung (in Kylt® Swab Wash Solution) zugeben.
- Durch pipettieren oder mithilfe eines Schüttlers mischen.
- 10 Minuten bei $+56 \pm 2$ °C inkubieren, idealerweise auf einem Schüttler.

2. Bindung

- Magnetic Beads gründlich resuspendieren (Vortex).
- 20 µl Magnetic Beads zu jedem verwendeten Well zugeben. (Nicht zutreffend für Variante 2 siehe Punkt 1)
- Kurz mithilfe der Pipette oder eines Schüttlers mischen.
- 500 µl Binding Solution zugeben.
- Mithilfe der Pipette oder eines Schüttlers mischen. 5 Minuten inkubieren.
- Beads mithilfe eines Magneten separieren (1 Minute).
- Überstand abnehmen und verwerfen.

3. Waschschrift 1

- 500 µl Wash Solution zugeben.
- Beads mithilfe der Pipette oder eines Schüttlers resuspendieren .
- Während 2 Minuten die Beads suspendiert halten.
- Beads mithilfe eines Magneten separieren (1 Minute).
- Überstand abnehmen und verwerfen.

4. Waschschrift 2

- Wiederhole Schritt 3.

5. Waschschrift 3

- 500 µl 80 % Ethanol zugeben.
- Beads mithilfe der Pipette oder eines Schüttlers resuspendieren .
- Während 2 Minuten die Beads suspendiert halten.
- Beads mithilfe eines Magneten separieren (1 Minute).
- Überstand abnehmen und verwerfen.

6. Trocknung

- Beads lufttrocknen (5 - 10 Minuten, bitte verifizieren).
- Die Verwendung eines Heizschüttlers bei $+56 \pm 2$ °C ist empfohlen. Schütteln unterstützt die effektive Trocknung.
- Die Einstellungen müssen an die verwendeten Gerätschaften angepasst werden.

7. Elution

- 50-200 µl Elution Buffer zu den Magnetic Bead Pellets geben.
- Durch Pipettieren resuspendieren und 1 Minute inkubieren. Heizen und/oder Schütteln ist empfohlen.
- Beads mithilfe eines Magneten separieren (1 Minute).
- Eluat in eine neue Platte übertragen.
- Eluate entweder direkt für die PCR-Analytik verwenden oder aber Platte mit Klebefolie verschließen und gekühlt lagern.
- Langfristige Lagerung tiefgekühlt bei ≤ -18 °C oder ≤ -70 °C.

G. Automatisierung

1. Instruments

- Dieses Kit ist optimal für die Verwendung im Kylt® Purifier geeignet, das entsprechende Protokoll ist bereits installiert.
- Das Kit kann auch in Liquid Handling Robotern oder anderen Magnetpartikelprozessoren verwendet werden.

2. Protocols

Protokolle für den Kylt® Purifier, Thermo Fisher Scientific KingFisher® Instrumente (Bindlt 4.0) und Hamilton STAR Line Systeme (Venus 4) sind erhältlich.

H. Fehlerbehebung

Beobachtung	Mögliche Ursachen und Lösung
PCR-Inhibition	Restethanol im Eluat. Bitte das Bead-Pellet am Ende der Trocknung auf Restfeuchtigkeit prüfen. Idealerweise sind keine Flüssigkeitsreste mehr vorhanden, das Pellet äußerlich trocken (nicht-glänzend) und rissig. Falls nötig, Trocknung verlängern.
PCR-Inhibition	Probe war reich an Huminsäure oder anderen Inhibitoren oder Bindungssystem war überladen. Eluat entweder verdünnen oder Aufreinigung mit weniger Probe wiederholen.

I. Ähnliche und zusätzliche Produkte

Product	Artikel No.	Content	Description
Kylt® Purifier	31436	1	Aufreinigungssystem für Magnetbead-basierte Kits. Bis zu 96 Proben in unter 45 Minuten.
Kylt® Purifier Spin Tips	31434	5	Platte mit 96 Spin Tips für die Verwendung im Kylt® Purifier. Benötigt eine Platte pro Lauf.
Kylt® Purifier Plates	31435	20	Platten zur Vorbefüllung mit den diversen Lösungen der Aufreinigungskits. 4 - 5 Platten werden pro Lauf benötigt.
Kylt® Swab Wash Solution	31453	500 ml	Vorverdünnte Kylt® Lysis Solution zur Auswaschung von Tupferproben.
Kylt® Salmonella Purification HTP	31433	4 x 96	Kit zur einfachen automatisierten Extraktion angereicherter Proben für die Salmonella-Diagnostik.

Herstellung

AniCon Labor GmbH | Mühlenstr. 13 | D-49685 Höttinghausen | www.kylt.eu | info@kylt.eu

Entwicklung, Herstellung und Vertrieb von Kylt® *In-Vitro* Diagnostika ist ISO 9001:2015 zertifiziert.

Kylt® ist ein eingetragenes Warenzeichen.

Nur für *in vitro*-Gebrauch.

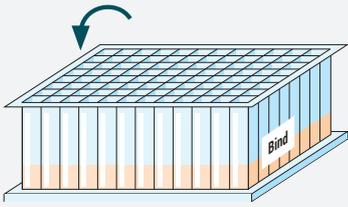
© 2021 AniCon Labor GmbH. Alle Rechte vorbehalten. Die in diesem Dokument genannten Marken sind Eigentum der AniCon Labor GmbH oder der genannten Markeninhaber.



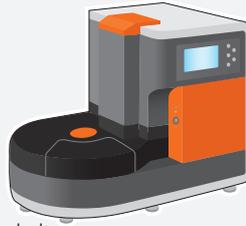
KURZANLEITUNG

Kylt® RNA/DNA Purification HTP

1



1.1
20 µl Proteinase, 200 µl Probe, 130 µl Lysis Sol.

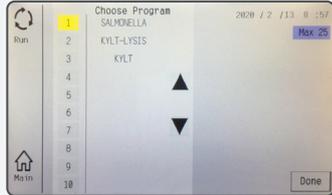


1.2
Kylt® Purifier einschalten



1.3
Run auswählen

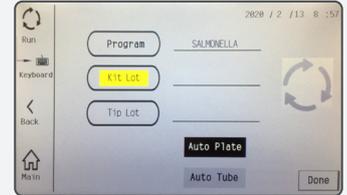
2



2.1
Kylt-Lysis auswählen

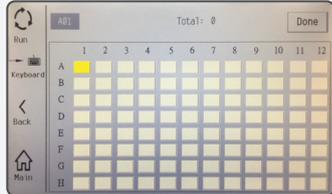


2.2
Auswahl bestätigen

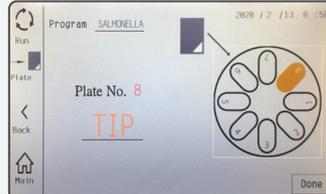


2.3
Bei Bedarf Chargen eintragen

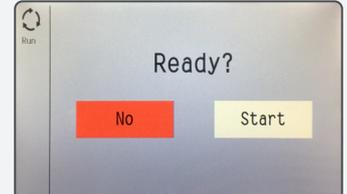
3



3.1
Bei Bedarf Probenamen eintragen.

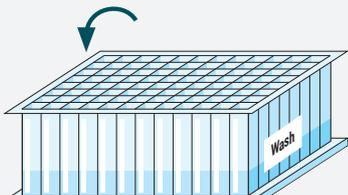


3.2
Kylt® Purifier wie angezeigt beladen

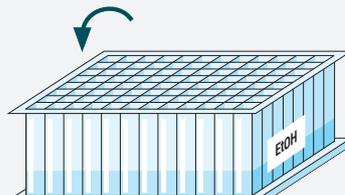


3.3
Start der Methode bestätigen

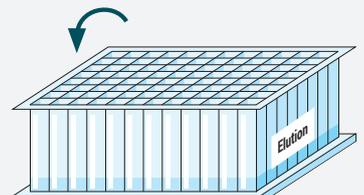
4



4.1
500 µl Wash Solution in die Platten W-1 und W-2

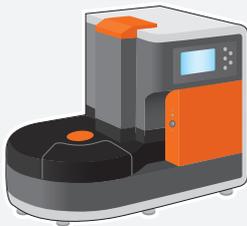


4.2
500 µl 80% Ethanol in die Platte W-3

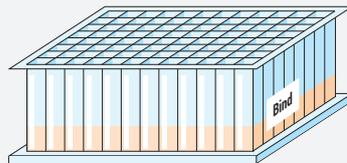


4.3
100 µl Elution Buffer in die Elution Platte

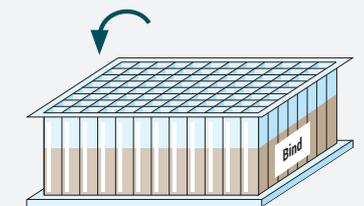
5



5.1
Ende der Kylt-Lysis Methode abwarten

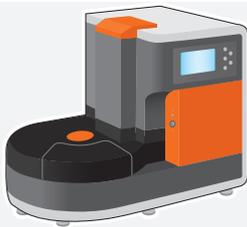


5.2
Platte "Bind" entnehmen



5.3
20 µl Magnetic Beads und 500µl Binding Solution

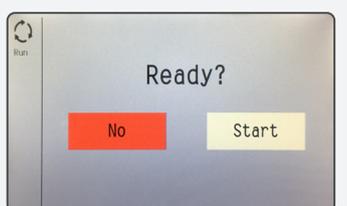
6



6.1
Methode Kylt-Purif starten

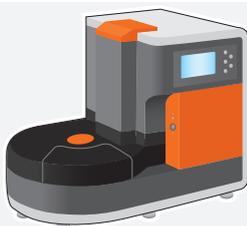


6.2
Kylt® Purifier wie angezeigt beladen

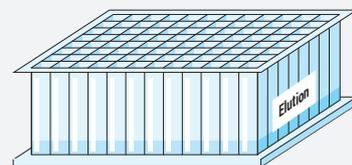


6.3
Start der Methode bestätigen

7



7.1
Ende der Methode abwarten und Kylt Purifier entladen



7.2
Eluate können direkt für die PCR-Diagnostik verwendet werden