

AmoyDx[®] Tissue RNA Kit (Spin-Säule)

Für die Aufreinigung von RNA aus menschlichem Gewebe oder Pleuraergusspräzipitation

Gebrauchsanweisung

REF 8.02.0079 36 Tests/Kit



Amoy Diagnostics Co., Ltd.
Nr. 39, Dingshan Road, Haicang District,
361027 Xiamen, Volksrepublik China
Tel: +86 592 6806835
Telefax: +86 592 6806839
E-Mail: sales@amoydx.com
Webseite: www.amoydx.com



QbD RepS BV
Groenenborgerlaan 16
2610 Wilrijk
Belgien



Qarad Suisse S.A.
World Trade Center
Avenue Gratta-Paille 2
1018 Lausanne
Schweiz



Umedwings Netherlands B.V.
Treubstraat 1, 2288EG, Rijswijk,
Niederlande
SRN: NL-IM-000000454
Diese Angaben zum Importeur gelten nur für
den EU-Markt

Version: V02

Zweckbestimmung

Das AmoyDx® Tissue RNA Kit wurde speziell für die Isolierung und Aufreinigung von RNA aus menschlichem Gewebe oder Pleuraerguss entwickelt. Die aufgereinigte RNA eignet sich für Downstream-Anwendungen wie PCR-Amplifikationen, Northern-Blot-Hybridisierungen und andere Experimente.

Vorgesehener Anwender

Das AmoyDx® Tissue RNA Kit ist ausschließlich für die Verwendung durch ausgebildetes Laborpersonal bestimmt.

Prinzip

Die Gewebeproben werden mit Puffer RLB und Proteinase K-Lösung lysiert, um die RNA freizusetzen. Danach wird das Lysat mit Ethanol gemischt, um geeignete Bindungsbedingungen für die RNA zu schaffen. Anschließend wird die Mischung auf eine RNA-Spin-Säule aufgetragen, wo die RNA an die Membran bindet und Verunreinigungen mit Waschpuffer entfernt werden. Die RNA wird in Puffer RTE eluiert.

Inhalt des Kits

Dieses Kit enthält genügend Reagenzien, um 36 Tests durchzuführen (Tabelle 1).

Tabelle 1: Inhalt des Kits

Röhrchen-Nr.	Komponente	Kennzeichnung	Menge
—	RNA-Spin-Säulen	RNA SpinColumns RNA 吸附柱	36 Stck. ×1
—	Sammelröhrchen (2 mL)	Collection Tubes (2 mL) 2 mL 收集管	72 Stck. ×1
—	Zentrifugenröhrchen (1,5 mL)	Centrifugal Tubes (1.5 mL) 1.5 mL 离心管	54 Stck. ×2
1	Puffer RLB	Buffer RLB 裂解结合液	31 mL ×1
2	Proteinase K-Lösung	Proteinase K Solution 蛋白酶 K 溶液	900 µL ×1
3	DNase I Magic Puffer	DNase I Magic Buffer DNase I 工作液	1,5 mL ×1
4	DNase I (30 U/µL)	DNase I DNA 消化酶	40 µL ×1
5	RNase-freies Wasser	RNase-free Water 无核酸酶水	1,5 mL ×1
6	Waschpuffer A	Wash Buffer A 洗涤液 A	13 mL ×2
7	Waschpuffer B	Wash Buffer B 洗涤液 B	6 mL ×2
8	RNA Schutzpuffer	RNA Protection Buffer RNA 保护液	200 µL ×1
9	Puffer RTE	Buffer RTE 洗脱液	1,5 mL ×3
10	Puffer TC	Buffer TC 样本清洗液 TC	15 mL ×1

Hinweis:

- 1) **Puffer RLB** und **Waschpuffer A** enthalten Guanidinsalz, das nicht in Kontakt mit bleichmittelhaltigen Desinfektionsmitteln oder säurehaltigen Lösungen gebracht werden darf.
- 2) Geben Sie vor der ersten Verwendung 17 mL bzw. 24 mL absolutes Ethanol zu **Waschpuffer A** und **Waschpuffer B**, und mischen Sie diese gründlich. Kreuzen Sie das Kontrollkästchen auf dem Flaschenetikett an.
- 3) Geben Sie vor der ersten Verwendung 360 µL **RNase-freies Wasser** in das **DNase I (30 U/µL)**-Röhrchen, um eine **DNase I (3 U/µL)**-Lösung zu erhalten. Mischen Sie gut, indem Sie vorsichtig auf- und abpipettieren. Lagern Sie die Lösung bei 4 °C.

Lagerung und Stabilität

Die Haltbarkeit des Kits beträgt 12 Monate. Das Kit sollte trocken bei Raumtemperatur (10~30 °C) transportiert und gelagert werden.

Zusätzlich benötigte Reagenzien und Ausrüstung

- 1) Ethanol (96~100 %).
- 2) Thermomixer mit Block für 1,5 mL Röhrchen (56 °C und 500 U/min einstellbar).
- 3) Mikrozentrifuge (12.000 ×g einstellbar).
- 4) Vortexer.
- 5) Handzentrifuge.
- 6) Sterile, RNase-freie Pipettenspitzen.

Vorsichtsmaßnahmen und Anforderungen an die Handhabung

Für den Einsatz in der *In-Vitro* Diagnostik.

Vorsichtsmaßnahmen

- Bitte lesen Sie vor der ersten Verwendung die Anleitung sorgfältig durch und machen Sie sich mit allen Komponenten des Kits vertraut. Befolgen Sie während des Gebrauchs strikt die Anweisungen.
- Verwenden Sie das Kit oder einzelne Komponenten des Kits NICHT nach Ablauf des Verfallsdatums.
- Verwenden Sie für die Tests KEINE Reagenzien aus anderen Chargen.
- Verwenden Sie KEINE Reagenzien anderer Testkits.

Sicherheitsinformationen

- **Puffer RLB und Waschpuffer A** enthalten Guanidinsalz, das in Verbindung mit Bleichmittel hochreaktive Verbindungen bilden kann. **Geben Sie keine Bleichmittel oder säurehaltigen Lösungen direkt in den Probenaufbereitungsabfall.** Wenn die Flüssigkeit, die diesen Puffer enthält, verschüttet wird, reinigen Sie die betroffene Stelle mit einem geeigneten Laborreinigungsmittel und Wasser.



Signalwort

Gefahrenhinweise:

H302+H332:

H315:

H319:

Sicherheitshinweise

P261:

P264:

P301+P312:

P302+P352:

P304+P340+P312:

P305+P351+P338:

Warnung

Gesundheitsschädlich beim Verschlucken oder beim Einatmen.

Verursacht Hautreizungen.

Verursacht schwere Augenreizungen.

Vermeiden Sie das Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol.

Waschen Sie die Haut nach dem Umgang gründlich.

BEIM VERSCHLUCKEN: Rufen Sie ein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder einen Arzt an, wenn Sie sich unwohl fühlen.

BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Waschen Sie sich mit viel Wasser und Seife.

BEI EINATMEN: Bringen Sie die Person an die frische Luft und sorgen Sie für eine ungehinderte Atmung

BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.

- Behandeln Sie alle Proben und Komponenten des Kits als potenziell infektiöses Material unter Anwendung sicherer Laborverfahren.
- Verwendung nur durch geschultes Fachpersonal. Bitte tragen Sie beim Umgang mit den Reagenzien einen geeigneten Laborkittel und Einweghandschuhe.
- Wenn ein verschüttetes Produkt potenziell infektiöse Reagenzien enthält, reinigen Sie den betroffenen Bereich zuerst mit Laborreinigungsmittel und Wasser und anschließend mit 1 % (v/v) Natriumhypochlorid oder einem geeigneten Labordesinfektionsmittel.
- Vermeiden Sie den Kontakt von Haut, Augen und Schleimhäuten mit den Chemikalien. Im Falle eines Kontakts spülen Sie sofort mit Wasser.
- NICHT mit dem Mund pipettieren.

Dekontamination und Entsorgung

- Beim Umgang mit Proben und Reagenzien sollten Sie Handschuhe tragen und diese häufig wechseln, um eine Kontamination zu vermeiden.
- Verwenden Sie beim Umgang mit Proben und Reagenzien separate Pipetten und Filterspitzen, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.
- Alle Einwegmaterialien sind für den einmaligen Gebrauch bestimmt. BITTE NICHT wiederverwenden.
- Die nicht verwendeten Reagenzien, das gebrauchte Kit und der Abfall müssen ordnungsgemäß entsorgt werden.

Reinigung

- Reinigen Sie nach dem Experiment den Arbeitsbereich und besprühen Sie die Pipetten und Geräte mit 75 %igem Ethanol oder 10 % Natriumhypochlorid.

Ausgangsmaterial

RNA im menschlichen Gewebe oder Pleuraerguss ist während des Zerkleinerns und bei der Abtrennung von Nukleinsäuren leicht biologisch abbaubar. Bevor Sie das Kit zur RNA-Isolierung verwenden, beachten Sie folgende Empfehlungen:

- 1) Die entnommene frische Gewebeprobe sollte sofort in einem 4–8-fachen Volumen einer Gewebekonservierungslösung aufbewahrt werden. Lagern und verwenden Sie die Probe entsprechend den Anforderungen und dem Verfahren.
- 2) Die Aufbewahrungszeit von Gewebeproben sollte weniger als drei Jahre bei -70 °C betragen.
- 3) Bei Gewebeproben, die in flüssigem Stickstoff oder bei -70 °C gelagert wurden, fügen Sie bitte vor der Isolierung das 10-fache Volumen der Gewebeschutzlösung hinzu und tauen Sie sie bei 4 °C auf.
- 4) Wenn Sie eine andere Gewebeschutzlösung verwenden, waschen Sie die Gewebeprobe vor der RNA-Isolierung mit Puffer TC.

Zusätzliche Anforderungen für die Handhabung von RNA

Beachten Sie die folgenden Richtlinien, um eine RNase-Kontamination zu vermeiden und die RNA-Ausbeute zu maximieren:

- 1) Verwenden Sie steriles Einweg-Laborplastik.
- 2) Verwenden Sie sterile, neue Pipettenspitzen und Mikrozentrifugenröhrchen.
- 3) Die Glas- oder Keramikbehälter wie Mörser und Mahlstäbe, die während des Verfahrens verwendet werden, sollten für 8 Stunden in einer 0,1 %igen Diethyl (DEPC)-Lösung eingeweicht und für 4 Stunden bei 180 °C autoklaviert werden.
- 4) Tragen Sie beim Umgang mit Reagenzien und RNA-Proben Latex- oder Nitrilhandschuhe, um eine Kontamination mit RNase von der Hautoberfläche zu vermeiden.
- 5) Wenden Sie bei der Arbeit mit RNA die richtige mikrobiologische aseptische Technik an.
- 6) Verwenden Sie eine geeignete Methode, um RNase-Kontaminationen von Oberflächen zu entfernen.

Assay-Verfahren

1. Probenvorbehandlung

1.1 Pleuraergussproben:

- 1.1.1 Nehmen Sie 10–40 mL Pleuraflüssigkeitsprobe, zentrifugieren Sie diese bei $3.000 \times g$ für 10 Minuten und entfernen Sie den Überstand durch Pipettieren.
- 1.1.2 Geben Sie 20–80 mg Präzipitat in ein sauberes 1,5 mL Zentrifugenröhrchen, fügen Sie 300 μL **Puffer TC** hinzu und mischen Sie durch Vortexen. Zentrifugieren Sie dann für 10 Minuten bei $3.000 \times g$ und entfernen Sie den Überstand durch Pipettieren.

1.2 Menschliche Gewebeproben:

- 1.2.1 Geben Sie 20–60 mg zerkleinertes Gewebe in ein sauberes 1,5 mL Zentrifugenröhrchen.

Hinweis:

- Entnehmen Sie eine Gewebeprobe in etwa der Größe eines Reiskorns. Ein Mangel oder Überschuss an Gewebe kann die Performance des Kits beeinträchtigen.
- Das Gewebe kann durch Vermahlung in flüssigem Stickstoff oder durch Scherung aufbereitet werden. Gründliches Zerkleinern erleichtert die Gewebelyse.

2. RNA-Extraktion

Hinweis:

- Geben Sie vor der ersten Verwendung 17 mL bzw. 24 mL absolutes Ethanol zu **Waschpuffer A** und **Waschpuffer B**, mischen Sie diese gründlich und markieren Sie es deutlich.
- Geben Sie vor der ersten Verwendung 360 μL **RNase-freies Wasser** in das **DNase I (30 U/ μL)-Röhrchen**, um eine **DNase I (3 U/ μL)-Lösung** zu erhalten. Mischen Sie gut, indem Sie vorsichtig auf- und abpipettieren. Lagern Sie es bei 4 °C .
- Überprüfen Sie vor der RNA-Extraktion, dass die Reagenzien nicht auslaufen. Schütteln Sie die Reagenzien vorsichtig, um die Lösungen zu mischen. Wenn die Reagenzien Präzipitate enthalten, lösen Sie diese durch Erhitzen auf 50 °C auf.

- 2.1 Geben Sie 800 μL **Puffer RLB** und 20 μL **Proteinase K-Lösung** in das Zentrifugenröhrchen mit der Probe und vortexen Sie es für 15 Sekunden. Zentrifugieren Sie kurz und inkubieren Sie bei 56 °C unter Schütteln (500 U/min) für 20 Minuten im Thermomixer.
- 2.2 Nehmen Sie das Zentrifugenröhrchen heraus und kühlen Sie es auf Raumtemperatur ab. Zentrifugieren Sie bei $12.000 \times g$ für 3 Minuten. Überführen Sie 800 μL des Überstandes durch langsames Pipettieren von oben nach unten in ein sauberes 1,5 mL Zentrifugenröhrchen.

Hinweis: Berühren Sie das Präzipitat nicht.

- 2.3 Geben Sie 600 μL **Ethanol** (96–100 %) zum Überstand, schließen Sie den Deckel und mischen Sie die Lösung, indem Sie das Röhrchen 20-mal umdrehen.
- 2.4 Zentrifugieren Sie das Röhrchen kurz und transferieren Sie 700 μL Lysat auf die RNA-Spin-Säule (in einem 2 mL Sammelröhrchen),

ohne den Rand zu benetzen, schließen Sie den Deckel und zentrifugieren Sie für 30 Sekunden bei 12.000 ×g. Verwerfen Sie den Durchfluss im Sammelröhrchen.

- 2.5 Übertragen Sie das verbleibende Lysat auf die RNA-Spin-Säule (in einem 2 mL Sammelröhrchen), ohne den Rand zu benetzen, schließen Sie den Deckel und zentrifugieren Sie bei 12.000 ×g für 30 Sekunden. Verwerfen Sie den Durchfluss im Sammelröhrchen.
- 2.6 Entsprechend dem Verhältnis von 20 µL **DNase I Magic Puffer** und 10 µL **DNase I** (3 U/µL) pro Probe, mischen Sie **DNase I Magic Buffer** und **DNase I** (3 U/µL) durch Auf- und Abpipettieren, um einen DNase I-Master Mix vorzubereiten.
- 2.7 Geben Sie 30 µL DNase I-Master Mix in die Mitte der Membran. Inkubieren Sie bei Raumtemperatur für 15 Minuten.

Hinweis:

- *Berühren Sie die Membran nicht.*
- *Der DNase I-Master Mix sollte erst kurz vor der Verwendung zubereitet werden.*

- 2.8 Geben Sie 600 µL **Waschpuffer A** auf die RNA-Spin-Säule und zentrifugieren Sie bei 12.000 ×g für 30 Sekunden. Verwerfen Sie den Durchfluss im Sammelröhrchen.
- 2.9 Geben Sie 600 µL **Waschpuffer A** auf die RNA-Spin-Säule und zentrifugieren Sie bei 12.000 ×g für 30 Sekunden. Verwerfen Sie den Durchfluss im Sammelröhrchen.
- 2.10 Geben Sie 600 µL **Waschpuffer B** auf die RNA-Spin-Säule und zentrifugieren Sie bei 12.000 ×g für 30 Sekunden. Verwerfen Sie den Durchfluss im Sammelröhrchen.
- 2.11 Geben Sie 600 µL **Waschpuffer B** auf die RNA-Spin-Säule und zentrifugieren Sie bei 12.000 ×g für 30 Sekunden. Verwerfen Sie das Sammelröhrchen mit dem Durchfluss.
- 2.12 Geben Sie die RNA-Spin-Säule in ein sauberes 2 mL Sammelröhrchen und zentrifugieren Sie bei 12.000 ×g für 3 Minuten. Verwerfen Sie das Sammelröhrchen mit dem Durchfluss.
- 2.13 Geben Sie die RNA-Spin-Säule in ein sauberes 1,5 mL Zentrifugenröhrchen. Öffnen Sie das Röhrchen und inkubieren Sie es für 3 Minuten bei 56 °C. Stellen Sie sicher, dass das restliche Ethanol verdampft ist, bevor Sie fortfahren.
- 2.14 Entsprechend dem Verhältnis von 100 µL **Puffer RTE** und 5 µL **RNA-Schutzpuffer** pro Probe, mischen Sie **Puffer RTE** und **RNA-Schutzpuffer** durch Auf- und Abpipettieren, um einen ausreichenden **Puffer RTE-Mix** herzustellen.
- 2.15 Geben Sie 80~100 µL **Puffer RTE-Mix** in die Mitte der Membran. Berühren Sie die Membran nicht. Inkubieren Sie bei 56 °C für 3 Minuten. Zentrifugieren Sie bei 12.000 ×g für 1 Minute.

Hinweis: Eine zweifache Elution sorgt für eine höhere RNA-Ausbeute. (z. B. Wenn das Elutionsvolumen 100 µL beträgt, geben Sie zunächst 50 µL Puffer RTE-Mix in die Mitte der Membran, inkubieren bei 56 °C für 2 Minuten und zentrifugieren bei 12.000 ×g für 1 Minute. Geben Sie dann weitere 50 µL Puffer RTE-Mix auf die Membran, inkubieren Sie bei 56 °C für 2 Minuten und zentrifugieren Sie bei 12.000 ×g für 1 Minute.)

- 2.16 Die eluierte RNA ist sofort einsatzbereit. Wenn die RNA nicht innerhalb von 2 Stunden verwendet wird, sollte sie bei -20 °C gelagert werden.

Leistungsmerkmale

Die Extraktionseffizienz des Kits wurde durch Tests an sechs klinischen Gewebeproben nachgewiesen.

- Extrahierte RNA: Mittlere Absorption bei 260 nm (A_{260}) $\geq 0,25$, und mittleres Verhältnis $A_{260}/A_{280} \geq 1,6$.

Einschränkungen

- 1) Die Qualität der extrahierten RNA unterliegt dem Einfluss von Faktoren wie Probenquelle, Probennahmeverfahren, Entnahmeort und Lagerbedingungen.
- 2) Die Qualität der Probe hat einen großen Einfluss auf die Qualität und Menge der aufgereinigten RNA.
- 3) Das Vorhandensein von RNase in der Laborumgebung kann zum Abbau der extrahierten RNA führen. Bitte entfernen Sie RNase von allen Geräten und Verbrauchsmaterialien vor der DNA- oder RNA-Extraktion.

Allgemeine Hinweise

Wenn während der Verwendung dieses Kits oder als Folge seiner Verwendung ein schwerwiegender Zwischenfall eingetreten ist, melden Sie dies bitte dem Hersteller und Ihrer nationalen Behörde.

Referenzen

Chevillard S. A method for sequential extraction of RNA and DNA from the same sample, specially designed for a limited supply of biological material. *Biotechniques*. 1993 Jul;15(1):22-4

Symbole

	Bevollmächtigter Vertreter in der Europäischen Gemeinschaft/Europäischen Union		In-vitro-Diagnostikum
	Hersteller		Katalognummer
	Chargennummer		Haltbarkeitsdatum
	Ausreichend für <n> Tests		Temperaturgrenze
	Gebrauchsanweisung beachten		Trocken halten
	Hier nach oben		Zerbrechlich, mit Vorsicht zu behandeln
	Kitkomponenten		Kreuzen Sie das Kästchen an, nachdem Sie Ethanol in das Fläschchen gegeben haben
	Hinzufügen von		Ethanol
	Importeur		

Änderungshistorie

Änderung	Datum des Inkrafttretens	Änderungshistorie
B1.0	26.05.2022	Erste Ausgabe
V01	04.11.2022	<ol style="list-style-type: none"> 1. Fügen Sie das Symbol und die Informationen des Importeurs hinzu; 2. Änderungshistorie hinzufügen; 3. Verschieben Sie das "Gültigkeitsdatum" von der ersten auf die letzte Seite; 4. Umsetzung der neuen Kodierungsregeln.
V02	10.03.2025	Aktualisierung des europäischen und schweizerischen Bevollmächtigten