

Istruzioni per l'uso  
InviTrap® Spin Universal RNA Mini Kit

**INVITEK**  
diagnostics





InviTrap®

Lingua: IT



**REF** 1060100200  
1060100300

 50 preparazioni  
250 preparazioni

 ALS Life Sciences Portugal, S.A.  
Zona Industrial de Tondela, ZIM II,  
Lote 6, 3460-070 Tondela  
Portugal

## Note importanti

Grazie per aver acquistato **InviTrap® Spin Universal RNA Mini Kit** di Invitek Diagnostics.

Il prodotto serve all'isolamento manuale dell'RNA totale da una varietà di campioni umani, come coltura cellulare, tessuto e sangue venoso, utilizzando la tecnologia Spin Column.

**AVVERTENZA!** Un uso e una manipolazione impropri per scopi diversi da quelli previsti possono causare pericoli e danni. Pertanto, si invita a leggere e seguire attentamente le presenti istruzioni per l'uso. Tenerle sempre a portata di mano. Per evitare lesioni a persone, osservare anche le istruzioni di sicurezza.

Tutte le versioni delle istruzioni per l'uso sono scaricabili dal nostro sito web o possono essere richieste su: [www.invitek.com](http://www.invitek.com)

Supporto tecnico:

[techsupport@invitek.com](mailto:techsupport@invitek.com)

GERMANIA

Haynauer Str. 60, 12249 Berlin, Germania

PORTOGALLO

Zona Industrial de Tondela, ZIM II, Lote 6, 3460-070 Tondela, Portogallo

+351 232 817 817

© 2025 Invitek Diagnostics, tutti i diritti riservati.

Il kit è conforme al REGOLAMENTO (UE) 2017/746 relativo ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Tuttavia, non è pensato per l'uso diagnostico in vitro nei Paesi in cui il REGOLAMENTO (UE) 2017/746 sui dispositivi medico-diagnostici in vitro non è riconosciuto.

Marchi commerciali: InviSorb®, PSP®, InviMag®, Eppendorf®. I marchi registrati, quelli commerciali, ecc. utilizzati nel presente documento, anche se non specificatamente contrassegnati come tali, non sono da considerarsi non tutelati dalla legge.

InviGenius®, InviMag®, InviSorb®, Invitek®, InviTrap®, MSB®, PSP®, RTP® sono marchi commerciali registrati di Invitek Molecular GmbH.

## Indice dei contenuti

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1.    | Istruzioni di sicurezza .....  | 3  |
| 2.    | Informazioni sul prodotto .....  | 5  |
| 2.1   | Il kit contiene .....  | 5  |
| 2.2   | Reagenti e attrezzatura che l'utente deve fornire .....                        | 6  |
| 2.3   | Conservazione, aspetto e scadenza .....  | 6  |
| 2.4   | Uso previsto .....   | 7  |
| 2.5   | Informazioni sul prodotto e specifiche .....                                   | 7  |
| 2.6   | Principio e procedura .....  | 8  |
| 3.    | Estrazione di acido nucleico con l'InviTrap® Spin Universal RNA Mini Kit ..... | 9  |
| 3.1   | Prima di avviare un protocollo .....   | 9  |
| 3.2   | Campionamento e conservazione del materiale di partenza .....                  | 10 |
| 3.3   | Preparazione del materiale di partenza .....                                   | 11 |
| 3.3.1 | Coltura cellulare .....  | 11 |
| 3.3.2 | Campioni di tessuto .....  | 12 |
| 3.3.3 | Tessuto incluso in paraffina trattato con formalina (fette di paraffina) ..... | 13 |
| 3.3.4 | Sangue .....   | 13 |
| 3.4   | Protocollo breve di InviTrap® Spin Universal RNA Mini Kit .....                | 14 |
| 3.5   | Protocollo 1: estrazione dell'RNA totale dalla coltura cellulare .....         | 16 |
| 3.6   | Protocollo 2: estrazione dell'RNA totale dal tessuto .....                     | 18 |
| 3.7   | Protocollo 3: estrazione dell'RNA totale dal sangue intero .....               | 19 |
| 4.    | Appendice .....  | 21 |
| 4.1   | Risoluzione di problemi .....  | 21 |
| 4.2   | Garanzia .....   | 22 |
| 4.3   | Simboli utilizzati su prodotto e etichettatura .....                           | 22 |
| 4.4   | Ulteriori documenti e informazioni aggiuntive .....                            | 23 |
| 4.5   | Informazioni sull'ordine .....   | 23 |

## 1. Istruzioni di sicurezza

Accertarsi che chiunque utilizzi il presente prodotto abbia ricevuto le istruzioni sulle pratiche di sicurezza generali per i laboratori e le informazioni sulla sicurezza riportate nel presente documento.

- Nel maneggiare i prodotti chimici, indossare sempre indumenti protettivi, guanti monouso e occhiali di sicurezza.
- Cambiare sempre i puntali delle pipette tra un trasferimento di liquidi e l'altro. Per evitare la contaminazione incrociata, si consiglia l'uso di puntali per pipette con barriera antiaerosol.
- Non riutilizzare i materiali di consumo.
- Gettare i guanti qualora fossero esposti a contaminazioni.
- Non combinare componenti di kit diversi.
- Evitare una contaminazione microbica dei reagenti del kit.
- Per minimizzare il rischio di infezioni dal materiale potenzialmente infettivo, raccomandiamo di lavorare in flusso d'aria laminare fino alla lisi dei campioni.

Prima di maneggiare i prodotti chimici, leggere e comprendere tutte le schede dati di sicurezza applicabili (MSDS). Queste sono reperibili online su [www.invitek.com](http://www.invitek.com).

Smaltire i residui del kit e i rifiuti liquidi in conformità alle normative nazionali, far riferimento alle MSDS. Invitek Diagnostics non ha testato i materiali infettivi residui nei rifiuti liquidi generati dal kit. La contaminazione di rifiuti liquidi con materiali infettivi residui è altamente improbabile ma non può essere esclusa del tutto. Pertanto, i rifiuti liquidi vanno considerati infettivi e devono essere manipolati e smaltiti in conformità alle normative di sicurezza locali.

Le frasi di rischio e sicurezza della Comunità Europea per i componenti dell'**InviTrap® Spin Universal RNA Mini Kit** a cui si applicano sono elencate di seguito come segue:

### Invis Solution TR



Pericolo

Contiene: guanidinio tiocianato; sodio N-laurosarcosinato

#### Indicazioni di pericolo

H302+H332 - Nocivo se ingerito o inalato.

H314 - Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari.

H412 - Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.

#### Consigli di prudenza

P260 - Non respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol.

P271 - Utilizzare soltanto all'aperto o in luogo ben ventilato.

P273 - Non disperdere nell'ambiente.

P301+P312 - IN CASO DI INGESTIONE accompagnata da malessere: contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico.

P301+P330+P331 - IN CASO DI INGESTIONE: sciacquare la bocca. NON provocare il vomito.

P303+P361+P353 - IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): togliersi di dosso immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle/fare una doccia.

P501 - Smaltire il contenuto/recipiente in un punto di raccolta per rifiuti pericolosi o speciali, in conformità alle normative locali, regionali, nazionali e/o internazionali.

## Wash Buffer R1



Pericolo

Contiene: guanidinio tiocianato

### Indicazioni di pericolo

H302 - Nocivo se ingerito.

H314 - Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari.

H412 - Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.

### Consigli di prudenza

P260 - Non respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol.

P273 - Non disperdere nell'ambiente.

P301+P312 - IN CASO DI INGESTIONE accompagnata da malessere: contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico.

P301+P330+P331 - IN CASO DI INGESTIONE: sciacquare la bocca. NON provocare il vomito.

P303+P361+P353 - IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): togliersi di dosso immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle/fare una doccia.

P304+P340 - IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione.

P501 - Smaltire il contenuto/recipiente in un punto di raccolta per rifiuti pericolosi o speciali, in conformità alle normative locali, regionali, nazionali e/o internazionali.

## Buffer EL concentrate



Avvertenza

Contiene: cloruro di ammonio

### Indicazioni di pericolo

H302 - Nocivo se ingerito.

H319 - Provoca grave irritazione oculare.

### Consigli di prudenza

P301+P312 - IN CASO DI INGESTIONE accompagnata da malessere: contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico.

P305+P351+P338 - IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.

P330 - Sciacquare la bocca.

P337+P313 - Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico.

P501 - Smaltire il contenuto/recipiente in un punto di raccolta per rifiuti pericolosi o speciali, in conformità alle normative locali, regionali, nazionali e/o internazionali.

**Le informazioni mediche di emergenza sono ottenibili 24 ore su 24 da infotrac, [www.infotrac.net](http://www.infotrac.net):**

**al di fuori degli USA: 1 – 352 – 323 – 3500**

**negli USA: 1 – 800 – 535 – 5053**

## 2. Informazioni sul prodotto

### 2.1 Il kit contiene

|                                 | 50 purificazioni                               | 250 purificazioni                               |
|---------------------------------|--|---|
| <b>N. catalogo</b>              | 1060100200                                     | 1060100300                                      |
| <b>Buffer EL concentrate</b>    | 30 ml/flacone                                  | 4 x 30 ml/flacone                               |
| <b>Lysis Solution TR</b>        | 50 ml/flacone                                  | 250 ml/flacone                                  |
| <b>Zirconia Beads I</b>         | 1 fiala  | 5 fiale   |
| <b>Zirconia Beads II</b>        | 1 fiala  | 5 fiale   |
| <b>Wash Buffer R1</b>           | 20 ml/flacone<br>(volume finale 40 ml)         | 80 ml/flacone<br>(volume finale 160 ml)         |
| <b>Wash Buffer R2</b>           | 2 x 12 ml/flacone<br>(volume finale 2 x 60 ml) | 2 x 40 ml/flacone<br>(volume finale 2 x 200 ml) |
| <b>Elution Buffer R</b>         | 15 ml/flacone                                  | 30 ml/flacone                                   |
| <b>DNA-Binding Spin Filter</b>  | 50 pezzi                                       | 5 x 50 pezzi                                    |
| <b>RNA-RTA Spin Filter Set</b>  | 50 set   | 5 x 50 set                                      |
| <b>Receiver Tubes da 2,0 ml</b> | 2 x 50 pezzi                                   | 10 x 50 pezzi                                   |
| <b>RTA Receiver Tubes</b>       | 50 pezzi                                       | 5 x 50 pezzi                                    |
| <b>Receiver Tubes da 1,5 ml</b> | 50 pezzi                                       | 5 x 50 pezzi                                    |
| <b>Short Protocol</b>           | 1 volantino                                    | 1 volantino                                     |

## 2.2 Reagenti e attrezzatura che l'utente deve fornire

Attrezzatura da laboratorio:

- microcentrifuga (*tutti i protocolli sono stati validati con una centrifuga 5415 D Eppendorf*)
- opzionale: centrifuga per provette da 15 o 50 ml
- termoshaker (37 °C - 95 °C)
- cilindro di misurazione (250 ml)
- 1 flacone vuoto (1L) per diluire Buffer EL (necessario per i campioni di sangue)
- guanti monouso
- pipetta e puntali per pipette, privi di RNasi
- miscelatore Vortex
- Provette di reazione (1,5 ml, 2,0 ml, 15 ml)

Liquidi e solventi:

- DNase/RNase free water
- etanolo al 96 - 100 % (non denaturato)
- etanolo al 70% (non denaturato)
- Ditione (DTT)
- Opzionale: β-mercaptoetanol
- Opzionale (per fette di paraffina): ottano o xilene, Proteinase K, RNase free TE buffer (50 mM TrisCl pH 8 with 10 mM EDTA)

## 2.3 Conservazione, aspetto e scadenza

**Data di scadenza:** tutti i buffer e i kit di componenti possono essere conservati a temperatura ambiente, se non diversamente indicato, e presentano una scadenza, come riportato sull'etichetta della confezione del kit esterno.

**Dopo l'apertura,** i componenti individuali del kit, come quelli preparati in modo conforme prima del primo uso, hanno una scadenza di 3 mesi.

Prima di ogni uso, accertarsi che tutti i componenti siano a temperatura ambiente. Se nelle soluzioni sono presenti precipitati per via della temperatura, scioglierli riscaldandoli accuratamente (fino a 30 °C).

**La temperatura ambiente è definita come intervallo di 15-30 °C.**

**Wash Buffer R1, Wash Buffer R2:** dopo aver aggiunto l'etanolo, chiudere per bene e conservare a temperatura ambiente.

**Buffer EL:** una volta disciolto in DNase/RNase free water, Buffer EL deve essere conservato a 2-8°C.

**1 M DTT Solution (non fornita):** conservare a -20°C per evitare danni ossidativi. A queste condizioni, la 1 M DTT solution è stabile per 12 mesi. Si raccomanda di aliquotare la soluzione 1 M DTT per ridurre al minimo il numero di cicli di congelamento-scongelo.

## 2.4 Uso previsto

L'InviTrap® Spin Universal RNA Mini Kit è un kit di estrazione dell'acido nucleico basato sulla tecnologia Spin Column, destinato all'isolamento e alla purificazione dell'RNA totale.

Il kit può essere utilizzato per una varietà di tipi di campioni umani, come colture cellulari fresche o congelate, materiale/tessuto bioptico fresco o congelato, tessuto incluso in paraffina trattato con formalina, sangue intero venoso fresco anticoagulato con EDTA o citrato, buffy coat e leucociti.

Il prodotto non è pensato per essere impiegato con campioni di sangue eparinizzato né congelato. Esso è previsto per l'uso esclusivo da parte di professionisti, come tecnici di laboratorio, medici e biologi con formazione in tecniche di biologia molecolare e procedure diagnostiche *in vitro*.

## 2.5 Informazioni sul prodotto e specifiche

| Materiale di partenza   | Resa  | Qualità                          | Tempo  |
|---|---|----------------------------------|--|
| Coltura cellulare, fino a $1 \times 10^7$ cellule/ml  | Fino a 80 µg di RNA totale<br>es. 10 - 15 µg di RNA totale da $5 \times 10^5$ fibroblasti NIH 3T3 | $A_{260} : A_{280}$<br>1,8 – 2,3 | Circa<br>20 - 25 min<br>(incl. lisi)                       |
| Fino a 1,5 ml di sangue fresco o congelato (EDTA/citrato stabilizzato, ma <u>non</u> eparina) | Fino a 1 - 5 µg di RNA totale / ml of di sangue intero (in base alla conta leucocitaria)          | $A_{260} : A_{280}$<br>1,8 – 2,3 | Circa<br>45 min<br>(incl. trattamento Buffer EL)           |
| Fino a 20 mg di tessuto fresco o congelato  | Fino a 80 µg di RNA totale (in base al tipo e alla quantità di materiale di partenza)             | $A_{260} : A_{280}$<br>1,8 – 2,3 | Circa<br>15 - 20 min (escl. omogeneizzazione del campione) |

La resa e la qualità degli acidi nucleici purificati dipendono dal tipo di campione, dalla fonte del campione, dal trasporto, dalla conservazione, dall'età e, per i campioni di sangue, anche dalla conta leucocitaria.

Per la purificazione di RNA dai campioni di cellule, la conta leucocitaria non dovrebbe superare  $1 \times 10^7$  cellule/ml. Una conta leucocitaria maggiore potrebbe comportare una contaminazione di DNA, una minore purezza dell'RNA e l'intasamento dell'RTA Spin Filter.

Per purificare l'RNA dal sangue intero venoso, il kit è validato per la conta leucocitaria da  $3 \times 10^6$  a  $1 \times 10^7$  cellule/ml. Il sangue intero di un adulto sano contiene all'incirca  $4 \times 10^6 - 1 \times 10^7$  leucociti/ml volume del campione. Conteggi cellulari eccessivamente elevati possono causare l'ostruzione dell'RTA Spin Filter e quindi effetti indesiderati sul processo di purificazione. Si raccomanda pertanto di considerare il volume di input del campione come parametro durante l'implementazione del protocollo diagnostico *in vitro*. Dato che l'estrazione del campione si basa sui leucociti intatti, il sangue congelato non può essere utilizzato, in quanto il congelamento provoca danni ai leucociti.

Per purificare l'RNA dal tessuto incluso in paraffina trattato con formalina, la resa e la qualità dipendono da diversi fattori, come il tipo di campione, la sua età, la preparazione del campione e le sezioni utilizzate per l'estrazione. Per ulteriori informazioni sulla preparazione del campione e sul pretrattamento, far riferimento ai capitoli 3.2 e 3.3.

#### **Applicazioni a valle:**

la resa e la qualità dell'RNA totale isolato sono generalmente adatte a numerose applicazioni diagnostiche molecolari, come le tecniche PCR, NGS e i metodi di ibridazione. Le applicazioni a valle devono essere eseguite secondo le specifiche dei rispettivi produttori.

## **2.6 Principio e procedura**

### **1. Pretrattamento del campione**

Nella preparazione per la lisi, va eseguito un pretrattamento specifico del campione. Per le cellule, ad esempio, il mezzo di coltura va rimosso, le cellule di tessuto devono essere completamente disgregate e omogeneizzate. Per il tessuto incluso in paraffina trattato con formalina è necessario un pretrattamento con ottano o xilene.

Per i campioni di sangue occorre un trattamento con Buffer EL. Il sangue umano di persone sane contiene circa 1000 volte più eritrociti rispetto ai leucociti, con solo questi ultimi contenenti RNA. Buffer EL ha un effetto ipotonico e causa la lisi osmotica degli eritrociti. Aggiungendo il buffer al campione di sangue, gli eritrociti vengono lisati selettivamente mentre i leucociti rimangono intatti.

### **2. Campioni di lisi**

Per la lisi del campione, i campioni sono miscelati con la Lysis Solution TR contenente DTT. Si osservi che la Lysis Solution TR va prima miscelata con DTT (non incluso nel kit) prima di ogni uso. La Lysis Solution TR contiene una sospensione con particelle portanti minerali che legano il DNA durante la lisi cellulare. Il DTT viene aggiunto per inattivare le RNases tagliando i ponti disolfuro intramolecolari. Per via delle forti condizioni di lisi denaturante, le cellule vengono rotte rapidamente e le RNases sono inattivate simultaneamente.

### **3. Legare e rimuovere il DNA**

Le particelle portanti minerali cariche di DNA della Lysis Solution TR contenente DTT sono rimosse mediante pellettizzazione o centrifugazione con il DNA-Binding Spin Filter, a seconda del materiale di partenza e del rispettivo protocollo di estrazione di acido nucleico.

In genere, non è richiesta la digestione di DNase per la rimozione genomica del DNA. Tuttavia, per le applicazioni RNA con maggiore sensibilità alla contaminazione di DNA, la digestione di DNase può aver luogo. Per la digestione di DNase durante il protocollo di purificazione RNA, far riferimento al Protocollo supplementare 3.9. In alternativa, è possibile eseguire una digestione dopo la purificazione nell'eluato.

### **4. Legare l'RNA totale**

Dopo aver rimosso il DNA genomico, l'RNA totale si trova nel supernatante. Per adattare le condizioni di legame dell'RNA, viene aggiunto etanolo al 96-100% e la miscela viene trasferita all'RNA-RTA Spin Filter Set. L'RNA si lega alla membrana dello Spin Filter.

### **5. Lavare per rimuovere le contaminazioni residue**

I contaminanti vengono eliminati in modo efficiente utilizzando Wash Buffer R1 e R2, mentre l'RNA rimane legato alla membrana.

### **6. Eluire il RNA**

L'RNA totale è eluito dall'RNA- RTA Spin Filter utilizzando 30 - 100 µl di Elution Buffer R.

### 3. Estrazione di acido nucleico con l'InviTrap® Spin Universal RNA Mini Kit

#### 3.1 Prima di avviare un protocollo

Quando si utilizza il kit per la prima volta, accertarsi che tutti i buffer e i reagenti siano preparati come indicato:

| Preparazioni di buffer prima del primo utilizzo: 50 preparazioni   |
|--|
| <p><b>(vedi anche sotto):</b> portare il volume necessario in una fiala separata e aggiungere 1/100 di volume di 1 M DTT.</p> <p><b>Wash Buffer R1:</b> aggiungere 20 ml di <b>etanolo al 96 -100%</b> al flacone. Miscelare per bene, tenendo il flacone sempre ben chiuso.</p> <p><b>Wash Buffer R2:</b> aggiungere 48 ml di <b>etanolo al 96 -100%</b> ad ogni flacone. Miscelare per bene, tenendo il flacone sempre ben chiuso.</p> <p><b>Buffer EL concentrate:</b> riempire 970 ml di <b>DNase/RNase free water</b> in un flacone vuoto e pulito. Aggiungere l'intero importo (30 ml) di <b>Buffer EL concentrate</b>, miscelare per bene. Etichettare il flacone con <b>Buffer EL</b>, conservare il <b>Buffer EL</b> a 2-8°C.</p>     |
| Preparazioni di buffer prima del primo utilizzo: 250 preparazioni  |
| <p><b>(vedi anche sotto):</b> portare il volume necessario in una fiala separata e aggiungere 1/100 di volume di 1 M DTT.</p> <p><b>Wash Buffer R1:</b> aggiungere 80 ml di <b>etanolo al 96 -100%</b> al flacone. Miscelare per bene, tenendo il flacone sempre ben chiuso.</p> <p><b>Wash Buffer R2:</b> aggiungere 160 ml di <b>etanolo al 96 -100%</b> ad ogni flacone. Miscelare per bene, tenendo il flacone sempre ben chiuso.</p> <p><b>Buffer EL concentrate:</b> riempire 970 ml di <b>DNase/RNase free water</b> in un flacone vuoto e pulito. Aggiungere l'intero importo (30 ml) di un <b>Buffer EL concentrate</b>, miscelare per bene. Etichettare il flacone con <b>Buffer EL</b>, conservare il <b>Buffer EL</b> a 2-8°C.</p> |

- Raffreddare Buffer EL a 2-8°C (Buffer EL è necessario solo per isolare l'RNA dai campioni di sangue e non per altri tipi di campioni)
- Determinare il numero di reazioni necessarie inclusi i controlli ed etichettare la quantità necessaria di RTA Spin Filter (coperchio) e di Receiver Tubes da 1,5 ml (per campione: 1 Receiver Tube necessario).

## Preparazione di Lysis Solution TR

DTT (o opzionalmente  $\beta$ -mercaptoetanololo) va aggiunto alla Lysis Solution TR. Per via dell'instabilità del DTT disciolto, preparare sempre la Lysis Solution TR con DTT fresco e poco prima dell'uso.

Prima dell'uso, agitare delicatamente la Lysis Solution TR per assicurare una distribuzione omogenea della matrice portante minerale legante il DNA nella soluzione. Attendere brevemente finché la schiuma che si è formata scompare.

Definire il numero di reazioni necessarie, inclusi eventuali controlli che si desideri eventualmente aggiungere. Si raccomanda di preparare un volume che ecceda il numero totale di preparazioni del 5%. Il volume necessario di Lysis Solution TR è reperibile nel protocollo per il rispettivo materiale di partenza del campione.

Trasferire la quantità necessaria di Lysis Solution TR in una fiala a parte adatta al volume totale necessario, ad es. una provetta da 15 ml.

Aggiungere 1/100 volume di DTT al volume necessario di Lysis Solution TR. In via opzionale, il DTT può essere sostituito da 1/100 volume di  $\beta$ -mercaptoetanololo.

## 3.2 Campionamento e conservazione del materiale di partenza

Per rese riproducibili ed elevate, è essenziale una corretta conservazione del campione. Le rese possono variare a seconda di fattori come salute del donatore, età del campione, tipo di campione, trasporto e conservazione.

Evitare cicli ripetuti di congelamento-scongelo dei campioni per evitare una degradazione dell'acido nucleico. In linea generale, sono i campioni freschi a dare i migliori risultati. Si raccomanda di tener conto di guide tecniche, come standard CEN/TS e ISO, in materia di processo di pre-esame per la diagnostica molecolare in IVDR.

**Colture cellulari:** per evitare la degradazione dell'RNA, i campioni devono essere utilizzati per l'estrazione dell'acido nucleico subito dopo la raccolta. Per la successiva estrazione, le cellule vanno congelate nel nitrogeno liquido subito dopo la raccolta, dopo di che è possibile una conservazione a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  per vari mesi. Il materiale di partenza può anche essere conservato nella Lysis Solution TR contenente DTT a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  dopo la lisi cellulare.

**Campioni di tessuto:** i campioni vanno surgelati subito dopo il campionamento e conservati a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  oppure la purificazione dell'RNA deve aver luogo subito. L'RNA ottenuto da campioni surgelati è stabile per mesi. Il tessuto congelato non deve scongelarsi durante la manipolazione. Il materiale di partenza può anche essere conservato nella Lysis Solution TR contenente DTT a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  dopo la lisi cellulare.

**Tessuto incluso in paraffina trattato con formalina:** le procedure di fissazione in formalina e di inclusione in paraffina secondo protocolli standard causano sempre una degradazione degli acidi nucleici. L'RNA può essere isolato con successo dalle sezioni solo se la formalina ha un pH adattato (pH 7-8), se il campione è fresco ed è stato conservato correttamente. Le sezioni vanno conservate sempre in un luogo fresco e asciutto, evitando temperature elevate e umidità. Le sezioni non vanno conservate per più di 8 settimane, in quanto l'RNA nelle sezioni è molto instabile. L'RNA è preservato meglio in blocchi non tagliati. È anche importante accertarsi che il campione sia stato fissato correttamente e, ad esempio, che non contenga acqua residua.

**Sangue:** i campioni di sangue (stabilizzati con EDTA o citrato, ma non eparinizzati) dovrebbero essere conservati con ghiaccio subito dopo la raccolta per ridurre le attività regolatorie di RNA nel campione. Non utilizzare campioni congelati ma solo campioni freschi per la purificazione. I leucociti vanno isolati entro 4 ore dalla raccolta e possono essere poi conservati a -80 °C. I leucociti possono anche essere conservati nella Lysis Solution TR contenente DTT: con ghiaccio fino ad un giorno o a -20 °C fino a 5 giorni.

### **3.3 Preparazione del materiale di partenza**

Di seguito viene descritto il pretrattamento dei materiali di raccolta.

Dopo la preparazione del materiale di partenza, far riferimento al protocollo di estrazione dell'acido nucleico specifico del campione corrispondente.

#### **3.3.1 Coltura cellulare**

##### **a) Cellule cresciute in sospensione**

Centrifugare fino a  $1 \times 10^7$  cellule per 5 min a 240 x g. Non eccedere una conta cellulare di  $1 \times 10^7$  cellule; si raccomanda di eseguire la conta cellulare. Rimuovere completamente il supernatante e continuare con la lisi del campione, come descritto nel protocollo 1.

##### **b) Cellule cresciute in un monostrato**

In grandi vasi di coltura (piatti > Ø 35 mm, boccette > 12,5 cm<sup>2</sup>) staccare le cellule mediante tripsinizzazione. Trasferire le cellule ad una provetta di centrifuga e pellettizzare per 5 min a 250 x g. Rimuovere completamente il supernatante.

In piccoli vasi di coltura (piastre da 96, 24, 12 e 6 pozzetti, piatti da Ø 35 mm, boccette da 12,5 cm<sup>2</sup>) scartare completamente il mezzo di coltura e continuare con la lisi subito come descritto nel protocollo 1.

Dopo la lisi, il materiale di partenza può essere conservato in una Lysis Solution TR contenente DTT a -20 °C fino a 5 giorni o più a -80 °C. Per procedere con l'estrazione dell'acido nucleico, i lisati congelati dovrebbero essere incubati in un bagno d'acqua a 37 °C fino a completo scongelamento, poco prima dell'estrazione. Evitare l'incubazione prolungata, in quanto ciò potrebbe compromettere l'integrità dell'RNA.

### 3.3.2 Campioni di tessuto

Per una resa maggiore dell'RNA totale, è necessaria la completa interruzione e omogeneizzazione dei campioni di tessuto.

La completa interruzione e omogeneizzazione porterà ad una resa significativamente ridotta e potrà causare l'intasamento dell'RNA-RTA Spin Filter. L'omogeneizzazione con un mulino a sfere, ecc. generalmente si traduce in rese di RNA più elevate.

#### a) L'omogeneizzazione con Zirconia Beads e un mulino a sfere o miscelatore Vortex

Trasferire 1-20 mg di campioni di tessuto freschi o congelati in una fiala adatta all'omogeneizzatore e aggiungere Zirconia Beads. Si raccomanda un misto di Zirconia Beads, 6 Zirconia Beads I e 3 Zirconia Beads II. Potrebbe essere necessario adattare rapporto e numero totale di Zirconia Beads I e II in base al tipo e alla quantità di tessuto.

Agitare delicatamente la Lysis Solution TR contenente DTT prima dell'uso, evitando di pipettare la schiuma.

Tessuto con contenuto di acido nucleico da basso a moderato: aggiungere 600 µl di Lysis Solution TR contenente DTT e omogeneizzare il campione.

Tessuto con contenuto elevato di acido nucleico, come milza, rene, polmone: aggiungere 900 µl di Lysis Solution TR contenente DTT e omogeneizzare il campione.

trasferire il campione in un Receiver Tube da 2,0 ml e avviare l'estrazione di RNA, seguire il protocollo 2. In via opzionale, il campione può essere conservato a -20 °C fino all'estrazione.

#### b) Omogeneizzazione utilizzando mortaio e pestello

Congelare 1-29 mg di campione di tessuto nel nitrogeno liquido e macinare in polvere fine. Trasferire la polvere in un Receiver Tube da 2,0 ml. Far evaporare il nitrogeno liquido ma non far scongelare il campione.

Agitare delicatamente la Lysis Solution TR contenente DTT prima dell'uso, evitando di pipettare la schiuma.

Tessuto con contenuto di acido nucleico da basso a moderato: aggiungere 600 µl di Lysis Solution TR contenente DTT.

Tessuto con contenuto elevato di acido nucleico, come milza, rene, polmone: aggiungere 900 µl di Lysis Solution TR contenente DTT.

Seguire il protocollo 2. In via opzionale, il campione può essere conservato a -20 °C fino all'estrazione.

### 3.3.3 Tessuto incluso in paraffina trattato con formalina (fette di paraffina)

Si raccomanda l'uso di sezioni appena tagliate con spessore fino a 10 µm. Non applicare più di 8 sezioni con superficie di 250 mm<sup>2</sup> in una corsa di purificazione. Per i tessuti con contenuto elevato di acido nucleico (es. timo), utilizzare meno sezioni per la preparazione, al fine di evitare un sovraccarico della colonna. Per stabilire il numero di sezioni usato in una preparazione, raccomandiamo di iniziare con una o 2 sezioni. Si osservi che il contenuto di RNA di fette di paraffina è altamente variabile e che l'RNA è degradato dal trattamento con formalina.

Trasferire le fette di formalina in una provetta di reazione da 1,5 ml e aggiungere 0,5 ml di ottano o xilene. Agitare su vortex attentamente per sciogliere la paraffina.

Centrifugare per 2 min a velocità massima per rimuovere completamente il tessuto. Eliminare il supernatante molto cautamente. Questa fase andrebbe ripetuta se è ancora visibile della paraffina nel campione. Quando il campione di tessuto appare trasparente, eseguire una fase di lavaggio finale con etanolo al 96 –100%.

Per asciugare il campione, centrifugare brevemente e rimuovere l'etanolo. Incubare la provetta di reazione aperta a 52 °C finché l'etanolo rimanente non evapora.

Aggiungere 10 µl di Proteinase K (40 mg/ml) e 90 µl di RNase free TE-Buffer (50 mM TrisCl pH 8 con 10 mM EDTA) contenente 10 mM DTT al campione, mescolare completamente pipettando su e giù e incubare per 10 min a 48 °C. La macinazione meccanica o il taglio del materiale sono raccomandati prima o durante la lisi.

Per la Proteinase K considerare anche le raccomandazioni del produttore; questo protocollo fornisce un esempio per una soluzione madre da 40 mg/ml.

Incubare per 10 min agitando costantemente a 80 °C per capovolgere parzialmente la regolazione degli acidi nucleici rilasciati e migliorare la resa e la qualità dell'RNA.

Aggiungere 600 µl di Lysis Solution TR contenente DTT e continuare con la fase 2, Protocollo 2.

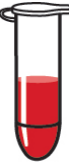








### 3.3.4 Sangue

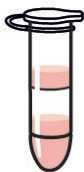
Il pretrattamento di campioni di sangue intero è descritto nel protocollo 3. Va eseguita una separazione cellulare per cellule nucleate, pertanto non è possibile utilizzare campioni congelati.

Se il campione contiene già leucociti separati (Buffy coat, Ficoll® density-gradient e relativi) seguire il protocollo 1, che descrive l'elaborazione delle colture cellulari. I leucociti devono essere freschi o congelati a -80 °C; scongelare i pellet di leucociti aggiungendo la Lysis Solution TR contenente DTT.

### 3.4 Protocollo breve di InviTrap® Spin Universal RNA Mini Kit

#### Campioni di lisi

| Far riferimento al capitolo 3.3 nelle istruzioni per l'uso per il pretrattamento specifico per campione  |  |
|--|--|
| Agitare delicatamente la Lysis Solution TR contenente DTT prima dell'uso, evitando di pipettare la schiuma   |  |
|  <p>OR</p>  | <p><b>Coltura cellulare</b></p> <p>1a). <u>Lisi delle cellule pellettizzate</u><br/>           Allentare il pellet cellulare facendo scorrere la provetta</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Per le cellule <math>&lt; 5 \times 10^6</math>: aggiungere 350 <math>\mu</math>l di Lysis Solution TR contenente DTT</li> <li>• Per <math>5 \times 10^6 - 1 \times 10^7</math> cellule: aggiungere 700 <math>\mu</math>l di Lysis Solution TR contenente DTT</li> </ul> <p>Miscelare per bene pipettando su e giù.</p> <p>1b). <u>Lisi delle cellule in monostrato</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Per piastre da 96, 24 e 12 pozzetti: aggiungere 350 <math>\mu</math>l di Lysis Solution TR contenente DTT.</li> <li>• Per piastre a 6 pozzetti; piatti <math>\varnothing</math> 35 mm; cellule in boccette da 12,5 cm<sup>2</sup>: aggiungere 700 <math>\mu</math>l di Lysis Solution TR contenente DTT</li> </ul> <p>Raccogliere il lisato cellulare con un beccuccio di gomma Miscelare per bene pipettando su e giù.</p> |
|   | <p><b>Tessuto</b></p> <p>1. Disgregare e omogeneizzare il campione come descritto al capitolo 3.3:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• campioni con contenuto medio/basso di acido nucleico: aggiungere 600 <math>\mu</math>l di Lysis Solution TR contenente DTT</li> <li>• campioni con contenuto elevato di acido nucleico: aggiungere 900 <math>\mu</math>l di Lysis Solution TR contenente DTT.</li> </ul> <p>Trasferire il campione in un Receiver Tube da 2,0 ml</p>   |
|          | <p><b>Sangue</b></p> <p>1. Capovolgere il campione di sangue 15 volte, non agitare su vortex!<br/>           Trasferire 0,5-1,5 ml in una provetta da 15 ml e aggiungere 10 ml di Buffer EL freddo (2-8°C). Miscelare capovolgendo.<br/>           Incubare per 15 min con ghiaccio, capovolgere 2 volte durante l'incubazione.<br/>           Centrifugare per 5 min, 4 °C a 960 x g. Rimuovere il supernatante e aggiungere 5 ml di Buffer EL freddo (2-8 °C).<br/>           Centrifugare per 5 min, 4 °C a 960 x g. Rimuovere il surnatante lasciando un pellet bianco.<br/>           Aggiungere 900 <math>\mu</math>l di Lysis Solution TR contenente DTT. Risospendere pipettando.</p>  |
| <b>Legare e rimuovere il DNA</b>   |  |
|   | <p><b>Coltura cellulare</b></p> <p>2. Posizionare un DNA-Binding Spin Filter su un Receiver Tube da 2,0 ml, trasferire l'intero lisato, incluso l'eventuale precipitato.<br/>           Incubare per 1 min.<br/>           Centrifugare per 2 min a 11.000 x g<br/>           Eliminare il DNA-Binding Spin Filter.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Per <math>&lt; 5 \times 10^6</math> cellule: aggiungere 250 <math>\mu</math>l di etanolo al 70%</li> <li>• Per <math>5 \times 10^6 - 1 \times 10^7</math> cellule: aggiungere 500 <math>\mu</math>l di etanolo al 70%</li> </ul> <p>Miscelare per bene pipettando su e giù</p>  |
|          | <p><b>Tessuto</b></p> <p>2. Centrifugare per 2 min a velocità massima.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Campioni con contenuto medio/basso di acido nucleico: trasferire 500 <math>\mu</math>l di supernatante ad un nuovo Receiver Tubes da 2,0 ml, aggiungere 330 <math>\mu</math>l di etanolo al 96-100%</li> <li>• Campioni con contenuto elevato di acido nucleico: trasferire 800 <math>\mu</math>l di supernatante ad un nuovo Receiver Tubes da 2,0 ml, aggiungere 500 <math>\mu</math>l di etanolo al 96-100%</li> </ul> <p>Miscelare per bene pipettando su e giù.</p>   |
|   | <p><b>Sangue</b></p> <p>2. Trasferire la miscela di campione in un Receiver Tubes da 2,0 ml, agitare su vortex per 10 secondi<br/>           Incubare per 5 min, 3-5 volte durante l'incubazione.<br/>           Centrifugare per 1 min a 11.000 x g<br/>           Trasferire il supernatante in un nuovo Receiver Tube da 2,0 ml.<br/>           Aggiungere 750 <math>\mu</math>l di etanolo al 96-100%, miscelare pipettando.</p>   |



### Legare il RNA

- Trasferire l'intero campione (fino a 700 µl) ad un RNA-RTA Spin Filter Set  
Incubare per 1 min.  
Centrifugare per 1 min a 11.000 x g  
Eliminare il filtrato e riposizionare l'RNA-RTA Spin Filter nell'RTA Receiver Tube.  
Ripetere se il volume del campione eccede i 700 µl.

### Lavare per rimuovere le contaminazioni residue

- Aggiungere 600 µl di **Wash Buffer R1**, centrifugare per 1 min a 11.000 x g  
Eliminare l'RTA Receiver Tube con il filtrato e posizionare l'RNA-RTA Spin Filter in un nuovo RTA Receiver Tube.
- Aggiungere 700 µl di **Wash Buffer R2**, centrifugare 1 min a 11.000 x g  
Eliminare il filtrato e riposizionare l'RNA-RTA Spin Filter nell'RTA Receiver Tube.
- Ripetere questa fase di lavaggio (5.) una volta.
- Centrifugare per 4 min a velocità max. per rimuovere l'etanolo residuo.  
Eliminare l'RTA Receiver Tube con il filtrato.

### Eluire il RNA

|                          |  |
|--------------------------|--|
| <b>Coltura cellulare</b> | <ol style="list-style-type: none"> <li>Posizionare l'RNA-RTA Spin Filter in un Receiver Tube da 1,5 ml.<br/>Aggiungere 30-100 µl di <b>Elution Buffer R</b> direttamente all'RNA-RTA Spin Filter.<br/>Incubare per 2 min e centrifugare 1 min a 11.000 x g<br/>Eliminare l'RTA Spin Filter e conservare l'RNA eluito con ghiaccio</li> </ol> |
| <b>Tessuto</b>           | <ol style="list-style-type: none"> <li>Posizionare l'RNA-RTA Spin Filter in un Receiver Tube da 1,5 ml.<br/>Aggiungere 30-60 µl di <b>Elution Buffer R</b> direttamente all'RNA-RTA Spin Filter.<br/>Incubare per 2 min e centrifugare 1 min a 11.000 x g<br/>Eliminare l'RTA Spin Filter e conservare l'RNA eluito con ghiaccio</li> </ol>  |
| <b>Sangue</b>            | <ol style="list-style-type: none"> <li>Posizionare l'RNA-RTA Spin Filter in un Receiver Tube da 1,5 ml.<br/>Aggiungere 30-60 µl di <b>Elution Buffer R</b> direttamente all'RNA-RTA Spin Filter.<br/>Incubare per 2 min e centrifugare 1 min a 11.000 x g<br/>Eliminare l'RTA Spin Filter e conservare l'RNA eluito con ghiaccio</li> </ol>  |

### 3.5 Protocollo 1: estrazione dell'RNA totale dalla coltura cellulare

Fare riferimento al capitolo 3.3 "Preparazione del materiale di partenza" per il pretrattamento specifico del campione.

---

Agitare delicatamente la Lysis Solution TR contenente DTT prima dell'uso, evitando di pipettare la schiuma.

#### **1.a) Lisi del campione di cellule pellettizzate**

Allentare il pellet cellulare facendo scorrere la provetta.

- Per le cellule  $< 5 \times 10^6$ : aggiungere 350  $\mu$ l di **Lysis Solution TR contenente DTT**.
- Per  $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$  cellule: aggiungere 700  $\mu$ l di **Lysis Solution TR contenente DTT**.

Miscelare per bene pipettando su e giù. Non dovrebbero essere visibili grumi di cellule prima di procedere alla fase successiva.

#### **1.b) Lisi del campione di cellule in monostrato**

- Per piastre da 96, 24 e 12 pozzetti: aggiungere 350  $\mu$ l di **Lysis Solution TR contenente DTT**.
- Per piastre da 6 pozzetti; piatti  $\varnothing$  35 mm; cellule in boccette da 12,5 cm<sup>2</sup>: aggiungere 700  $\mu$ l di **Lysis Solution TR contenente DTT**.

Raccogliere il lisato cellulare con un beccuccio di gomma. Miscelare per bene pipettando su e giù. Non dovrebbero essere visibili grumi di cellule prima di procedere alla fase successiva.

2. Posizionare un DNA-Binding Spin Filter su un Receiver Tube da 2,0 ml (con coperchio). Trasferire l'intero lisato, incluso l'eventuale precipitato eventualmente formatosi, al DNA-Binding Spin Filter. Incubare per 1 min. Centrifugare per 2 min a 11.000 x g. Eliminare il DNA-Binding Spin Filter.
  - Per  $< 5 \times 10^6$  cellule: aggiungere 250  $\mu$ l di **etanolo al 70%** al lisato.
  - Per  $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$  cellule: aggiungere 500  $\mu$ l di **etanolo al 70%** al lisato.

Miscelare per bene pipettando su e giù.

3. Trasferire l'intero campione (fino a 700  $\mu$ l) ad un RNA-RTA Spin Filter Set. Incubare per 1 min. Centrifugare per 1 min a 11.000 x g. Eliminare il filtrato e riposizionare l'RNA-RTA Spin Filter nell'RTA Receiver Tube. Se il volume del campione eccede i 700  $\mu$ l, separare il caricamento dell'RNA-RTA Spin Filter e ripetere i passaggi.
4. Aggiungere 600  $\mu$ l di **Wash Buffer R1** all'RNA-RTA Spin Filter e centrifugare 1 min a 11.000 x g. Eliminare l'RTA Receiver Tube con il filtrato e posizionare l'RNA-RTA Spin Filter in un nuovo RTA Receiver Tube.
5. Aggiungere 700  $\mu$ l di **Wash Buffer R2** all'RNA-RTA Spin Filter e centrifugare 1 min a 11.000 x g. Eliminare il filtrato e riposizionare l'RNA-RTA Spin Filter nell'RTA Receiver Tube.

6. Aggiungere 700 µl di **Wash Buffer R2** all'RNA- RTA Spin Filter e centrifugare 1 min a 11.000 x g  
Eliminare il filtrato e riposizionare l'RNA-RTA Spin Filter nell'RTA Receiver Tube.
7. Centrifugare per 4 min a velocità massima per rimuovere completamente l'etanolo.  
Eliminare l'RTA Receiver Tube con il filtrato.
8. Posizionare l'RNA-RTA Spin Filter in un Receiver Tube da 1,5 ml RNase free.  
Aggiungere 30-100 µl di **Elution Buffer R** direttamente alla superficie dell'RNA-RTA Spin Filter.  
Incubare per 2 min e centrifugare 1 min a 11.000 x g.  
Eliminare l'RTA Spin Filter.  
Chiudere il Receiver Tube da 1,5 ml e conservare subito con ghiaccio l'RNA eluito.  
Utilizzare direttamente per l'analisi o congelare a -80 °C.

### 3.6 Protocollo 2: estrazione dell'RNA totale dal tessuto

Fare riferimento al capitolo 3.3 "Preparazione del materiale di partenza" per il pretrattamento specifico del campione.

---

Lavorare rapidamente ed eseguire tutti i passaggi a temperatura ambiente.

Agitare delicatamente la Lysis Solution TR contenente DTT prima dell'uso, evitando di pipettare la schiuma

1. Disgregare e omogeneizzare il campione come descritto al capitolo 3.3:
  - campioni con contenuto moderato/basso di acido nucleico: aggiungere 600 µl di **Lysis Solution TR contenente DTT**
  - campioni con contenuto elevato di acido nucleico: aggiungere 900 µl di **Lysis Solution TR contenente DTT**

Trasferire l'intera miscela del campione in un Receiver Tube da 2,0 ml.

2. Centrifugare il Receiver Tube da 2,0 ml con il lisato per 2 min a velocità massima.
  - Campioni con contenuto di acido nucleico moderato/basso: trasferire 500 µl di supernatante (senza Zirconia Beads) in un Receiver Tube da 2,0 ml, aggiungere 330 µl di **etanolo al 96-100%** e miscelare per bene pipettando su e giù.
  - Campioni con contenuto elevato di acido nucleico: trasferire 800 µl di supernatante (senza Zirconia Beads) in un Receiver Tube da 2,0 ml, aggiungere 500 µl di **etanolo al 96-100%** e miscelare per bene pipettando su e giù.
3. Trasferire 700 µl ad un RNA-RTA Spin Filter Set.  
Incubare per 1 min.  
Centrifugare per 2 min a 11.000 x g  
Eliminare il filtrato e riposizionare l'RNA-RTA Spin Filter nell'RTA Receiver Tube.  
Se il volume del campione eccede i 700 µl, separare il caricamento dell'RNA-RTA Spin Filter e ripetere i passaggi.
4. Aggiungere **600 µl di Wash Buffer R1** all'RNA-RTA Spin Filter e centrifugare 1 min a 11.000 x g.  
Eliminare l'RTA Receiver Tube con il filtrato e posizionare l'RNA-RTA Spin Filter in un nuovo RTA Receiver Tube.
5. Aggiungere **700 µl di Wash Buffer R2** all'RNA-RTA Spin Filter e centrifugare 1 min a 11.000 x g.  
Eliminare il filtrato e riposizionare l'RNA-RTA Spin Filter nell'RTA Receiver Tube.
6. Aggiungere 700 µl di **Wash Buffer R2** all'RNA- RTA Spin Filter e centrifugare 1 min a 11.000 x g  
Eliminare il filtrato e riposizionare l'RNA-RTA Spin Filter nell'RTA Receiver Tube.
7. Centrifugare per 4 min a velocità massima per rimuovere completamente l'etanolo.  
Eliminare l'RTA Receiver Tube con il filtrato.
8. Posizionare l'RNA-RTA Spin Filter in un Receiver Tube da 1,5 ml RNase free  
Aggiungere 30-60 µl di **Elution Buffer R** direttamente alla superficie dell'RNA-RTA Spin Filter.  
Incubare per 2 min e centrifugare 1 min a 11.000 x g.  
Eliminare l'RTA Spin Filter.  
Chiudere il Receiver Tube da 1,5 ml e conservare subito con ghiaccio l'RNA eluito.  
Utilizzare direttamente per l'analisi o congelare a -80 °C.

### 3.7 Protocollo 3: estrazione dell'RNA totale dal sangue intero

Fare riferimento al capitolo 3.3 "Preparazione del materiale di partenza" per il pretrattamento specifico del campione.

---

1. Capovolgere i campioni di sangue fresco attentamente per 15 volte per omogeneizzare il campione, non agitare su vortex!  
Trasferire 0,5 – 1,5 ml (max.  $1 \times 10^7$  leucociti) ad una provetta da 15 ml.  
Aggiungere 10 ml di **Buffer EL** freddo (2-8°C). Miscelare capovolgendo con attenzione.  
Incubare per 15 min con ghiaccio. Miscelare capovolgendo due volte durante l'incubazione.

**Nota:** *La sospensione torbida diventa traslucida durante l'incubazione, indicando la lisi degli eritrociti. Se necessario, il tempo di incubazione può essere esteso a 20 min.*

Centrifugare per 5 min e 4 °C a 960 x g.

Rimuovere completamente e molto attentamente il supernatante (i leucociti formano un pellet visibile).

Aggiungere 5 ml di **Buffer EL** freddo (2-8°C), risospendere il pellet tagliando con il dito.

Centrifugare per 5 min e 4 °C a 960 x g.

Rimuovere il supernatante il più possibile, incluse le cellule rosse restanti.

**Nota:** *la rimozione incompleta del supernatante interferirà con la lisi e il successivo legame dell'RNA all'RNA-RTA Spin Filter, con conseguente resa e purezza basse.*

Aggiungere 900 µl di **Lysis Solution TR contenente DTT**. Agitare delicatamente la Lysis Solution TR contenente DTT prima dell'uso, evitando di pipettare la schiuma.

Pipettare più volte su e giù per sospendere completamente il pellet.

2. Trasferire la miscela di campione in un Receiver Tubes da 2,0 ml, agitare su vortex per 10 secondi.  
Incubare per 5 min, agitare su vortex 3-5 volte durante l'incubazione.  
Centrifugare per 1 min a 11.000 x g (sarà visibile un pellet di gelatina).  
Trasferire completamente il supernatante in un nuovo Receiver Tube da 2,0 ml; evitare il riporto di pellet.

Aggiungere 750 µl di **etanolo al 96-100%** e miscelare per bene pipettando su e giù (potrebbe apparire un precipitato che non influirà sulla procedura).

3. Trasferire 700 µl della miscela ad un RNA-RTA Spin Filter Set.  
Incubare per 1 min.  
Centrifugare per 1 min a 11.000 x g  
Eliminare il filtrato e riposizionare l'RNA-RTA Spin Filter nell'RTA Receiver Tube.  
Ripetere i passaggi per il volume di campione rimanente.
4. Aggiungere **600 µl di Wash Buffer R1** all'RNA-RTA Spin Filter e centrifugare 1 min a 11.000 x g.  
Eliminare il filtrato e posizionare l'RNA-RTA Spin Filter in un nuovo RTA Receiver Tube.
5. Aggiungere **700 µl di Wash Buffer R2** all'RNA-RTA Spin Filter e centrifugare 1 min a 11.000 x g.  
Eliminare il filtrato e riposizionare l'RNA-RTA Spin Filter nell'RTA Receiver Tube.
6. Aggiungere **700 µl di Wash Buffer R2** all'RNA- RTA Spin Filter e centrifugare 1 min a 11.000 x g  
Eliminare il filtrato e riposizionare l'RNA-RTA Spin Filter nell'RTA Receiver Tube.

7. Centrifugare per 4 min a velocità massima per rimuovere completamente l'etanolo. Eliminare l'RTA Receiver Tube con il filtrato.
8. Posizionare l'RNA-RTA Spin Filter in un Receiver Tube da 1,5 ml RNase free. Aggiungere 30-60 µl di **Elution Buffer R** direttamente alla superficie dell'RNA-RTA Spin Filter. Incubare per 2 min e centrifugare 1 min a 11.000 x g. Eliminare l'RTA Spin Filter. Chiudere il Receiver Tube da 1,5 ml e conservare subito con ghiaccio l'RNA eluito. Utilizzare direttamente per l'analisi o congelare a -80 °C.

## 4. Appendice

### 4.1 Risoluzione di problemi

| Problema   | Causa possibile   | Raccomandazione   |
|--|---|---|
| <b>Quantità bassa di RNA</b>   | Eluizione incompleta  | Aumentare il tempo di incubazione con <b>Elution Buffer R</b> a 5-10 min.<br>Eluire due volte con gli stessi 100 µl di <b>Elution Buffer R</b> .  |
|  | Disgregazione o omogeneizzazione insufficienti                    | Ridurre l'importo di materiale di partenza, non sovraccaricare il kit.  |
|  | Rimozione incompleta del mezzo di coltura cellulare.              | Accertarsi che il mezzo di coltura cellulare venga completamente rimosso dopo la raccolta delle cellule.  |
| <b>RNA degradato</b>   | Conservazione errata del materiale di partenza, vecchio materiale | Accertarsi che il campione sia prelevato e conservato correttamente.<br>Utilizzare il materiale di un campione fresco.  |
|  | Manipolazione inadeguata del materiale di partenza                | Il protocollo di purificazione deve essere eseguito senza interruzioni.<br>Far riferimento alla sezione FAQ della pagina web di Invitek per note generali sulla gestione dell'RNA.  |
|  | La Lysis Solution TR non contiene DTT                             | Accertarsi che il DTT sia aggiunto alla Lysis Solution TR.  |
| <b>RNA impuro</b>  | Carryover di eritrociti nel protocollo del sangue                 | Estendere l'incubazione in ghiaccio a 20 min.<br>Il pellet leucocitario deve essere bianco e può contenere tracce residue di eritrociti. Se la lisi degli eritrociti è incompleta, il pellet bianco potrebbe non essere visibile e gli eritrociti formeranno un pellet rosso. Se ciò accade, incubare per altri 5-10 min nel ghiaccio dopo aver aggiunto <b>Buffer EL</b> . |
| <b>Contaminazioni del DNA</b>  | Troppo materiale di partenza                                      | Ridurre la quantità di materiale di partenza<br>Eseguire una digestione di DNase dell'eluato.   |
|  | Matrice portante legante il DNA insufficiente                     | Agitare la <b>Lysis Solution TR</b> attentamente prima di utilizzarla per assicurare una distribuzione adeguata della matrice portante legante il DNA   |
| <b>Gli acidi nucleici non funzionano bene nelle applicazioni a valle</b> | Etanolo residuo durante l'eluizione                               | Aumentare il tempo di asciugatura per la rimozione dell'etanolo.  |
|  | Ripporto di sale durante l'eluizione                              | Controllare eventuali precipitati di sale nei <b>Wash Buffer</b> .<br>Se sono visibili dei precipitati, scioglierli riscaldandoli accuratamente fino a 30 °C<br>Accertarsi che i <b>Wash Buffer</b> siano a temperatura ambiente prima dell'uso.  |
| <b>Rapporto A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> basso</b>                    | L'RNA è stato diluito con acqua                                   | Non utilizzare RNase free water per diluire il campione per misurare la purezza dell'RNA. Si raccomanda l'uso di un buffer neutrale (10 mM Tris/ HCl pH 7.0).   |

## 4.2 Garanzia

Invitek Diagnostics garantisce il perfetto funzionamento del kit per le applicazioni descritte nel presente manuale e in conformità all'uso previsto. In conformità al sistema di gestione della qualità a norma EN ISO 13485 di Invitek Diagnostics, la prestazione di tutti i componenti del kit è stata testata per assicurare la qualità del prodotto.

Qualsiasi problema, incidente o difetto sarà riportato a Invitek Diagnostics subito dopo il rilevamento. Ispezionare il prodotto al ricevimento dello stesso per garantirne la completezza e l'integrità. In presenza di discrepanze, informare subito Invitek Diagnostics per iscritto. La garanzia non copre eventuali modifiche al kit e ai protocolli né un uso diverso da quello previsto.

Invitek Diagnostics si riserva il diritto di modificare, alterare o cambiare qualsiasi prodotto per migliorarne la prestazione e il design in qualsiasi momento.

Invitek Diagnostics garantisce i prodotti come stabilito nelle Condizioni Generali disponibili all'indirizzo [www.invitek.com](http://www.invitek.com). Per eventuali domande contattare [techsupport@invitek.com](mailto:techsupport@invitek.com).

## 4.3 Simboli utilizzati su prodotto e etichettatura



Produttore



Numero di lotto



Identificatore univoco del dispositivo medico



Numero di catalogo



Data di scadenza



Consultare le istruzioni per l'uso



Limitazione della temperatura



Non riutilizzare



Quantità di preparati per campioni



dispositivo medico diagnostico *in vitro*

## 4.4 Ulteriori documenti e informazioni aggiuntive

Visitare [www.invitek.com](http://www.invitek.com) per ulteriori informazioni su:

- FAQ e suggerimenti per la risoluzione di problemi
- Manuali in varie lingue
- Schede dati di sicurezza (MSDS)
- Supporto web
- Video prodotti

Se, nonostante un attento studio delle istruzioni per l'uso e ulteriori informazioni, si avesse ancora bisogno di assistenza, scrivere all'indirizzo [techsupport@invitek.com](mailto:techsupport@invitek.com) o contattare il proprio rivenditore.

## 4.5 Informazioni sull'ordine

| <b>Prodotto</b>                       | <b>Dimensione della</b> | <b>N. catalogo</b> |
|---------------------------------------|-------------------------|--------------------|
| InviTrap® Spin Universal RNA Mini Kit | 50 preparazioni         | 1060100200         |
| InviTrap® Spin Universal RNA Mini Kit | 250 preparazioni        | 1060100300         |

Storico revisioni

| <b>Revisione</b> | <b>Data</b> | <b>Descrizione</b> |
|------------------|-------------|--------------------|
| DE 816.01_IT     | 2025-07-31  | Nuovo documento    |



# **INVITEK** diagnostics

## **PORTUGAL**

Zona Industrial de Tondela, ZIM II, Lote 6  
3460-070 Tondela  
Portugal

Telefono: +351 232 817 817

## **GERMANY**

Haynauer Str. 60, 12249  
Berlin, Germany

[info@invitek.com](mailto:info@invitek.com)  
[www.invitek.com](http://www.invitek.com)