



«УТВЕРЖДАЮ»

Директор отделения Диагностики
ЗАО «Рош-Москва»

О.В. Нестеров

«27» апреля 2009г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению изделия медицинского назначения: Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот (COBAS AmpliPrep Total Nucleic Acid Isolation Kit (TNAI))

**Набор для общего выделения нуклеиновых
кислот
COBAS® AmpliPrep Total Nucleic Acid
Isolation Kit**

TNAI

**Для программного обеспечения
AMPLILINK v3.1 или AMPLILINK v3.2**

P/N: 03337928 190 на 48 исследований

1. Реагенты

Реагент	Количество	Состав
TNAI CS1 Magnetic glass particles (TNAI MGP) Стеклянные магнитные частицы Кассета	1 x 48 Tests	• 60 г/л суспензия стеклянных магнитных частиц • 93% (w/w) Изопропанол Осторожно легко воспламеняется Осторожно раздражающее вещество
TNAI CS2 Lysis Reagent (TNAI LYS) Лизирующий реагент кассета	1 x 48 Tests	• Sodium citrate buffer • 473 г/л гуанидин тиоцинат Вредно для здоровья • Polydocanol • 9 g/L Dithiothreitol
TNAI CS3 Multi-Reagent cassette Мульти-реагентная кассета	1 x 3.8 mL 1 x 19 mL 1 x 4 mL vial	• Protease Solution (TNAI Pase) Вредно для здоровья • Elution buffer (TNAI EB) • Флакон для внесения реагентов Внутреннего контроля (пустой) $X_n \leq 7.8\%$ (w/w) Protease

TNAI CS4

Specimen Diluent (TNAI SD)

Разбавитель образцов

Кассета

1 x 48 Tests

- фосфатный буфер
- хлорид натрия
- 0.09% азид натрия

Internal Control /**Quantitation Standard**

Diluent (TNAI IC/QS DIL)

Разбавитель для внутреннего контроля

1 x 5.3 mL

- Tris-HCl buffer
- EDTA
- Poly rA RNA
- 0.05% азид натрия

General Purpose Vial (GPV)

Флаконы общего назначения

3 флакона

- Флаконы для приготовления реагента рабочего внутреннего контроля IC/QS

COBAS® AmpliPrep TNAI Wash Reagent (TNAI WR) P/N: 03337936 190

Промывочный реагент Cobas TNAI Wash Reagent (TNAI WR)

Реагент**TNAI Wash Reagent**

(TNAI WR)

Reagent Quantity Contents

Количество

1 x 5.1 L

Состав

- Sodium citrate buffer
- 0.05% N-Methylisothiazolone

Volume to be 50 100 200 500 850

processed (µL)

Minimal 250 250 325 650 1000

volume needed

in S-tube (µL)

2. Обзор набора**Описание продукта**

Набор COBAS® AmpliPrep Total Nucleic Acid Isolation разработан для выделения и высокой очистки нуклеиновых кислот из сыворотки и плазмы прибором COBAS® AmpliPrep. (6).

Очищенные нуклеиновые кислоты могут использоваться в дальнейшем в различных технологиях амплификации нуклеиновых кислот (7,8).

Внутренний контроль/Количественный Стандарт IC/QS может добавляться к любому индивидуальному образцу и будет проходить все этапы процесс выделения образца. Это обеспечит компенсацию потерь образца и выявление ингибиторов в последующих амплификационных этапах. Пользователь сам должен отладить и утвердить применение TNAI, включая использование Внутреннего контроля/Количественного Стандарта IC/QS, для любого специфичного применения.

Принципы постановки

Процесс применения набора COBAS® AmpliPrep Total Nucleic Acid Isolation Kit состоит из следующих пяти этапов:

Раствор протеазы расщепляет белки высвобождая РНК или ДНК.

Добавление Лизирующего реагента к образцу приводит к полному лизису за счет денатурации белков. РНК или ДНК высвобождаются и одновременно стабилизируются. Высвобожденные нуклеиновые кислоты связываются с поверхностью кварца добавленных магнитных стеклянных частиц (**TNAI MGP**) вследствие хаотропной солевой условий и высокой ионной силы лизирующего реагента.

Промывочный реагент удалит не связавшиеся вещества и загрязнения, такие как денатурированные белки, остатки клеток и ПЦР ингибиторы (гемоглобин и т.д.) снижая концентрацию солей.

Очищенные нуклеиновые кислоты элюируются при повышенной температуре.

Материал образцов

- данный набор предназначен для использования человеческой сыворотки или плазмы собранной в пробирки только с EDTA или ACD. Для сравнимости результатов не изменяйте тип образца.

Предупреждения и предосторожности

- Не смешивайте реагенты или кассеты разных лотов.
- Кроме кассеты **TNAI CS3**, не открывайте другие кассеты, не заменяйте, не удаляйте и не добавляйте флаконы. Кассета **TNAI CS3** может открываться для добавления разведенного в нужной пропорции Внутреннего контроля/Количественного Стандарта IC/QS в 4 мл пустой флакон из набора. Уничтожайте не использованные реагенты и отходы в соответствии с требованиями государственных, федеральных или местных законов.
- Не используйте просроченные реагенты.
- Кассета **TNAI CS4** после длительного хранения при 2-8°C может иметь осадок, который может быть растворен в течении 12 часов при 20-30°C или 1 часа при 37°C в инкубаторе.
- Избегайте повреждения штрих кода реагентных кассет COBAS® AmpliPrep. Не вытирайте конденсат, если он появился, с поверхности штрих кода.
- Кассеты **TNAI SD** и **TNAI IC/QS DIL** содержат азид натрия. Азид натрия может реагировать со свинцом и медью канализационных труб образуя взрывоопасный металлический азид. Утилизируя в канализацию растворы содержащие азид натрия смывайте большое количество воды.
- Не позволяйте лизирующему реагенту (**TNAI LYS**), который содержит гуанидин тиоцианат контактировать с растворами гипохлорида натрия. Такое смешивание может вырабатывать высоко токсичный газ.
- когда утилизируете устройства подготовки образцов COBAS® AmpliPrep Sample Processing Units (SPUs), которые содержат гуанидин тиоцианат, избегайте любого контакта с растворами гипохлорида натрия.

Хранение и стабильность.

- Не замораживайте реагенты.
- Храните кассеты **TNAI CS1**, **TNAI CS2**, **TNAI CS3**, **TNAI CS4** и **TNAI IC/QS DIL** при 2-8°C. Не использованные реагенты стабильны по окончании срока годности. Начатые реагенты стабильны 30 дней при 2-8°C. Кассеты **TNAI CS1**, **TNAI CS2**, **TNAI CS3**, **TNAI CS4** и **TNAI IC/QS DIL** могут использоваться максимум в 4 постановках при условии хранения при 2-8°C между постановками, суммарное время between cycles, up to a maximum of 72 hours cumulative on board on the COBAS® AmpliPrep Instrument. Equilibrate **TNAI CS4** at 20-30°C for 12 hours or at

37°C for one hour prior to use. After equilibration, mix the content of **TNAI CS4** by shaking for 10 seconds.

- Store **TNAI WR** at 2-30°C. **TNAI WR** is stable until the expiration date indicated. Once opened, this reagent is stable for 30 days at 2-30°C or until the expiration date, whichever comes first.

- Store partially used sample preparation reagents at 2-8°C between instrument runs. Check expiration date of reagents prior to loading on the COBAS® AmpliPrep Instrument.

Materials Required But Not Provided

- COBAS® AmpliPrep Instrument
- AMPLILINK software, v3.1 or v3.2
- COBAS® AmpliPrep TNAI Prep File CD ROM
- Data Station for the AMPLILINK software, with printer
- Sample processing units (SPUs)
- Sample input tubes (S-tubes, natural caps) with barcode clips
- Racks of output tubes (S-tubes, gray caps)
- Racks of K-tips
- Pipettors with aerosol barrier or positive displacement DNase-/RNase-free tips
- Vortex mixer
- Centrifuge
- Incubator
- Disposable gloves, powderless
- COBAS® AmpliPrep **TNAI WR**
- Cassette opener

3. Experimental protocol

Sample input

Variable levels of sample input (50, 100, 200, 500 or 850 µL) can be processed by the COBAS® AmpliPrep Instrument using the COBAS® AmpliPrep Total Nucleic Acid Isolation Kit. The COBAS® AmpliPrep Instrument automatically adds specimen diluent (**TNAI SD**) up to a final volume of 850 µL. For accurate automated transfer of the requested sample volume into the sample processing unit (SPU) the minimal volumes tabulated in the following table must be pipetted into the sample input tubes (S-tubes). The maximal volume should not exceed 1100 µL in any case.

COBAS® AmpliPrep Total Nucleic Acid Isolation Kit

TNAI (For Use With AMPLILINK Software v3.1 or AMPLILINK Software v3.2)

P/N: 03337928 190 48 Tests

For Laboratory Use

1

Roche Molecular Systems, Inc.

Note: Do not freeze. Store **TNAI CS1**, **TNAI CS2**, **TNAI CS3**, **TNAI CS4** and **TNAI IC/QS DIL** at 2-8°C. Equilibrate **TNAI CS4** to ambient temperature for 12 hours or warm in an incubator for 1 hour at 37°C prior to use.

Sample preparation reagents should be removed from 2-8°C storage at least 30 minutes before the first sample is to be processed on the COBAS® AmpliPrep Instrument. **TNAI CS4** must be removed from 2-8°C storage at least 12 hours before the first sample is to be processed on the COBAS® AmpliPrep Instrument or it must be warmed in an incubator for 1 hour at 37°C prior to use. Mix contents of **TNAI CS4** by shaking for 10 seconds.

Serum and plasma samples must be at ambient temperature before use.

Run Size

Each kit contains reagents sufficient for four 12-test runs, which may be performed separately in up to 4 separate instrument cycles or simultaneously.

Workflow

The COBAS® AmpliPrep Total Nucleic Acid Isolation Kit procedure followed by any nucleic acid amplification/detection can be completed in one day or over two days. Processed samples can remain on the COBAS® AmpliPrep Instrument overnight for up to 20 hours or can be removed from the COBAS® AmpliPrep Instrument and stored at 2-8°C for up to 7 days in the output tubes. Do not freeze.

Part A: COBAS® AmpliPrep Instrument Set-Up

A1. Turn the COBAS® AmpliPrep Instrument **ON**. The COBAS® AmpliPrep Instrument will automatically prime the system when it is powered on.

A2. Check the supply of **TNAI WR** using the Status Screen and replace if necessary.

A3. Perform all Maintenance that is listed in the Due Tab.

A4. If using frozen samples, thaw the samples at room temperature.

A5. Determine the number of COBAS® AmpliPrep reagent cassettes, Sample Processing Units (SPUs), Sample tubes (S-tubes) and K-tips needed. One SPU, one Input S-tube (natural caps), one Output S-tube (gray caps) and one K-tip are needed for each sample.

A6. Place **TNAI CS1** onto a reagent rack. Place **TNAI CS2**, **TNAI CS3** and **TNAI CS4** onto a separate reagent rack.

Note: If an IC/QS is to be used, an appropriate dilution of IC/QS in **TNAI IC/QS DIL** must be made and filled in a vial for preparation of working IC/QS. The working IC/QS should be a minimum of 1.1 mL for 12 tests and a maximum of 4.0 mL for 48 tests. **GPV** must be placed in the assigned position in **TNAI CS3**. Close cassette after addition of **GPV**.

A7. Load the reagent rack containing **TNAI CS1** onto rack position **A** of the COBAS® AmpliPrep Instrument.

A8. Load the reagent rack containing **TNAI CS2**, **TNAI CS3** and **TNAI CS4** onto rack position **B**, **C**, **D** or **E** of the COBAS® AmpliPrep Instrument.

A9. Place the SPUs in the SPU rack(s) and load the rack(s) onto the COBAS® AmpliPrep Instrument.

A10. Load the appropriate number of full output tube racks onto the COBAS® AmpliPrep Instrument.

A11. Attach a barcode label clip to each sample rack position where a sample (S-tube) is to be placed. Place one input S-tube into each position containing a barcode label clip.

A12. Using the Data Station for the AMPLILINK software, create the Test Definitions with the desired settings (sample volume, use of IC/QS, use of clot detection). Create one or more sample orders in the Sample Tab and save. Load the sample racks onto rack positions **F**, **G**, or **H** of the COBAS® AmpliPrep Instrument. Print a worksheet.

A13. Move the racks to the designated Pre-Amplification Area for sample addition.

Part B: COBAS® AmpliPrep Instrument Loading and Operation

B1. Vortex each sample for 3 to 5 seconds. Spin each sample briefly to collect fluid in the base of the tube. Avoid contaminating gloves when manipulating the samples.

B2. Transfer 250, 325, 650 or 1000 µL of each sample to the appropriate bar

code labeled S-tube using a micropipettor with an aerosol barrier or positive displacement DNase-/RNase-free tip. Avoid transferring particulates and/or fibrin clots from the original sample to the S-tube. Samples should be transferred to tube positions as assigned in step A12.

B3. Load the sample rack(s) containing samples onto rack position(s) **F, G** or **H** of the COBAS® AmpliPrep Instrument.

B4. Start the COBAS® AmpliPrep Instrument using the AMPLILINK software. Sample processing is automatically performed by the COBAS® AmpliPrep Instrument.

B5. Take the following precautions to avoid contamination: Thoroughly clean and disinfect all work surfaces used during sample and control transfer with a freshly prepared solution of 0.5% sodium hypochlorite in deionized or distilled water^{9,10}.

Part C: Processed Sample Handling

C1. After the sample preparation run on the COBAS® AmpliPrep Instrument is complete, check validity of sample processing.

C2. Remove the sample rack(s) containing the processed samples. Once removed from the COBAS® AmpliPrep Instrument, processed samples may be stored in the output tubes at 2-8°C for up to 7 days. Do not freeze.

C3. Close the test orders in the Order Screen (assign results to the test orders and save). Processed samples without flags or error messages are ready for amplification.

C4. Accept results in the Result Screen.

C5. Take the following precautions to avoid contamination: Thoroughly clean and disinfect all work surfaces used during sample transfer with a freshly prepared solution of 0.5% sodium hypochlorite in deionized or distilled water.

4. References

- (1) Boom R., Sol C.J.A., Salimans M.M.M., Jansen C.L., Wertheim-van Dillen P.M.E., and van der Noordaa, J. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. *J Clin Microbiol* **28**, 1990, 495-503.
- (2) MacDonald R.J., Swift G.H., Przybyla A.E., and Chirgwin J.M. Isolation of RNA Using Guanidinium Salts. *Meth Enzymol* **152**, 1987, 219-226.
- (3) McCaustland K.A., Bi S., Purdy M.A. and Bradley D.W. Application of two RNA extraction methods prior to amplification of hepatitis E nucleic acid by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods*, **35**, 1991, p. 331-342.
- (4) Gantzer C., Senouci S., Maul A., Levi Y., Schwartzbrod L. Enterovirus genomes in wastewater: concentration on glass wool and glass powder and detection by RT-PCR. *J Virol Methods* **65**, 1997, 265-271.
- (5) Chungue E., Roche C., Lefevre M.-F., Barbazan P., and Chanteau S. Ultra-Rapid, Simple, Sensitive, and Economical Silica Method for Extraction of Dengue Viral RNA from Clinical Specimens and Mosquitoes by Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *J Med Virol* **40**, 1993, 142-145.
- (6) Morsica G., Novati R., Lazzarin A. Detection of Hepatitis C Virus RNA by Methods Using Phenol-Chloroform or Silica Particles. *J Clin Microbiol* **33**, 1995, 2522-2523.
- (7) Martin GP and Timmers E. PCR and Its Modifications for the Detection of Infectious Diseases. In: *Nucleic Acid Amplification Technologies: Application to Disease Diagnosis*. Lee HH, Morse SA and Olsvik O eds. BioTechniques Books, Div Eaton

Publishing 1997: 79-100.

(8) McDonough SH, Bott MA and Giachetti C. Application of Transcription-Mediated Amplification to Detection of Nucleic Acids from Clinically Relevant Organisms. In: Nucleic Acid Amplification Technologies: Application to Disease Diagnosis. Lee HH, Morse SA and Olsvik O eds. BioTechniques Books, Div Eaton Publishing 1997: 113-124.

(9) Richmond, J.Y. and McKinney, R.W. eds. 1999. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. HHS Publication Number (CDC) 93-8395.

(10) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Third Edition. CLSI Document M29-A3 Wayne, PA:CLSI, 2005.

Manufactured by:

Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ 08876 USA

A Member of the Roche Group

Distributed by:

Roche Diagnostics Roche Diagnostics

Indianapolis, IN 46256 USA H7V 4A2 Laval, Quebec

(For Technical Assistance call the (For Technical Assistance call:

Roche Response Center Pour toute assistance technique,

toll-free: 1-800 526 1247) appeler le: 1-877 273 3433)

Roche Diagnostics (Schweiz) AG Roche Diagnostics

CH-6343 Rotkreuz F-38240 Meylan

Roche Diagnostics GmbH Distributore in Italia:

D-68298 Mannheim, Germany Roche Diagnostics SpA

Piazza Durante 11

I-20131 Milano

Roche Diagnostics S.L. Distribuidor em Portugal:

E-08006 Barcelona Roche Farmacêutica Química, Lda

P-2700 Amadora

ROCHE, AMPLILINK, COBAS and AMPLIPREP are trademarks of Roche.

ROCHE RESPONSE CENTER is a service mark of Roche.

Copyright 2008, by Roche Molecular Systems, Inc. All rights reserved.

8/2008

Doc Rev. 3.0 04709896001-03

2

Roche Molecular Systems, Inc.



«УТВЕРЖДАЮ»



Директор отделения Диагностики
ЗАО «Рош-Москва»

О.В. Нестеров

«25» апреля 2009г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению изделия медицинского назначения: Реагент для промывки
лизирующего буфера (COBAS AmpliPrep TNAI Wash Reagent (TNAI WR))

**Набор для общего выделения нуклеиновых
кислот
COBAS® AmpliPrep Total Nucleic Acid
Isolation Kit**

TNAI

**Для программного обеспечения
AMPLILINK v3.1 или AMPLILINK v3.2**

P/N: 03337928 190 на 48 исследований

1. Реагенты

Реагент	Количество	Состав
TNAI CS1 Magnetic glass particles (TNAI MGP) Стекланные магнитные частицы Кассета	1 x 48 Tests	• 60 г/л суспензия стеклянных магнитных частиц • 93% (w/w) Изопропанол Осторожно легко воспламеняется Осторожно раздражающее вещество
TNAI CS2 Lysis Reagent (TNAI LYS) Лизирующий реагент кассета	1 x 48 Tests	• Sodium citrate buffer • 473 г/л гуанидин тиоцианат Вредно для здоровья • Polydocanol • 9 g/L Dithiothreitol
TNAI CS3 Multi-Reagent cassette Мульти-реагентная кассета	1 x 3.8 mL 1 x 19 mL 1 x 4 mL vial	• Protease Solution (TNAI Pase) Вредно для здоровья • Elution buffer (TNAI EB) • Флакон для внесения реагентов Внутреннего контроля (пустой) Xn ≤ 7.8% (w/w) Protease

TNAI CS4

Specimen Diluent (TNAI SD)

Разбавитель образцов

Кассета

1 x 48 Tests

- фосфатный буфер
- хлорид натрия
- 0.09% азид натрия

Internal Control /**Quantitation Standard**

Diluent (TNAI IC/QS DIL)

Разбавитель для внутреннего контроля

1 x 5.3 mL

- Tris-HCl buffer
- EDTA
- Poly rA RNA
- 0.05% азид натрия

General Purpose Vial (GPV)

Флаконы общего назначения

3 флакона

- Флаконы для приготовления реагента рабочего внутреннего контроля IC/QS

COBAS® AmpliPrep TNAI Wash Reagent (TNAI WR) P/N: 03337936 190

Промывочный реагент Cobas TNAI Wash Reagent (TNAI WR)

Реагент**TNAI Wash Reagent**

(TNAI WR)

Reagent Quantity Contents

Количество

1 x 5.1 L

Состав

- Sodium citrate buffer
- 0.05% N-Methylisothiazolone

Volume to be 50 100 200 500 850

processed (µL)

Minimal 250 250 325 650 1000

volume needed

in S-tube (µL)

2. Обзор набора**Описание продукта**

Набор COBAS® AmpliPrep Total Nucleic Acid Isolation разработан для выделения и высокой очистки нуклеиновых кислот из сыворотки и плазмы прибором COBAS® AmpliPrep. (6).

Очищенные нуклеиновые кислоты могут использоваться в дальнейшем в различных технологиях амплификации нуклеиновых кислот (7,8).

Внутренний контроль/Количественный Стандарт IC/QS может добавляться к любому индивидуальному образцу и будет проходить все этапы процесс выделения образца. Это обеспечит компенсацию потерь образца и выявление ингибиторов в последующих амплификационных этапах. Пользователь сам должен отладить и утвердить применение TNAI, включая использование Внутреннего контроля/Количественного Стандарта IC/QS, для любого специфичного применения.

Принципы постановки

Процесс применения набора COBAS® AmpliPrep Total Nucleic Acid Isolation Kit состоит из следующих пяти этапов:

Раствор протеазы расщепляет белки высвобождая РНК или ДНК.

Добавление Лизирующего реагента к образцу приводит к полному лизису за счет денатурации белков. РНК или ДНК высвобождаются и одновременно стабилизируются.

Высвобожденные нуклеиновые кислоты связываются с поверхностью кварца добавленных магнитных стеклянных частиц (**TNAI MGP**) вследствие хаотропной солевых условий и высокой ионной силы лизирующего реагента.

Промывочный реагент удалит не связавшиеся вещества и загрязнения, такие как денатурированные белки, остатки клеток и ПЦР ингибиторы (гемоглобин и т.д.) снижая концентрацию солей.

Очищенные нуклеиновые кислоты элюируются при повышенной температуре.

Материал образцов

- данный набор предназначен для использования человеческой сыворотки или плазмы собранной в пробирки только с EDTA или ACD. Для сравнимости результатов не изменяйте тип образца.

Предупреждения и предосторожности

- Не смешивайте реагенты или кассеты разных лотов.
- Кроме кассеты **TNAI CS3**, не открывайте другие кассеты, не заменяйте, не удаляйте и не добавляйте флаконы. Кассета **TNAI CS3** может открываться для добавления разведенного в нужной пропорции Внутреннего контроля/Количественного Стандарта IC/QS в 4 мл пустой флакон из набора. Уничтожайте не использованные реагенты и отходы в соответствии с требованиями государственных, федеральных или местных законов.
- Не используйте просроченные реагенты.
- Кассета **TNAI CS4** после длительного хранения при 2-8°C может иметь осадок, который может быть растворен в течении 12 часов при 20-30°C или 1 часа при 37°C в инкубаторе.
- Избегайте повреждения штрих кода реагентных кассет COBAS® AmpliPrep. Не вытирайте конденсат, если он появился, с поверхности штрих кода.
- Кассеты **TNAI SD** и **TNAI IC/QS DIL** содержат азид натрия. Азид натрия может реагировать со свинцом и медью канализационных труб образуя взрывоопасный металлический азид. Утилизируйте в канализацию растворы содержащие азид натрия смывая большое количество воды.
- Не позволяйте лизирующему реагенту (**TNAI LYS**), который содержит гуанидин тиоцианат контактировать с растворами гипохлорида натрия. Такое смешивание может вырабатывать высоко токсичный газ.
- когда утилизируете устройства подготовки образцов COBAS® AmpliPrep Sample Processing Units (SPUs), которые содержат гуанидин тиоцианат, избегайте любого контакта с растворами гипохлорида натрия.

Хранение и стабильность.

- Не замораживайте реагенты.
- Храните кассеты **TNAI CS1**, **TNAI CS2**, **TNAI CS3**, **TNAI CS4** и **TNAI IC/QS DIL** при 2-8°C. Не использованные реагенты стабильны по окончании срока годности. Начатые реагенты стабильны 30 дней при 2-8°C. Кассеты **TNAI CS1**, **TNAI CS2**, **TNAI CS3**, **TNAI CS4** и **TNAI IC/QS DIL** могут использоваться максимум в 4 постановках при условии хранения при 2-8°C между постановками, суммарное время between cycles, up to a maximum of 72 hours cumulative on board on the COBAS® AmpliPrep Instrument. Equilibrate **TNAI CS4** at 20-30°C for 12 hours or at

37°C for one hour prior to use. After equilibration, mix the content of **TNAI CS4** by shaking for 10 seconds.

- Store **TNAI WR** at 2-30°C. **TNAI WR** is stable until the expiration date indicated. Once opened, this reagent is stable for 30 days at 2-30°C or until the expiration date, whichever comes first.

- Store partially used sample preparation reagents at 2-8°C between instrument runs. Check expiration date of reagents prior to loading on the COBAS® AmpliPrep Instrument.

Materials Required But Not Provided

- COBAS® AmpliPrep Instrument
- AMPLILINK software, v3.1 or v3.2
- COBAS® AmpliPrep TNAI Prep File CD ROM
- Data Station for the AMPLILINK software, with printer
- Sample processing units (SPUs)
- Sample input tubes (S-tubes, natural caps) with barcode clips
- Racks of output tubes (S-tubes, gray caps)
- Racks of K-tips
- Pipettors with aerosol barrier or positive displacement DNase-/RNase-free tips
- Vortex mixer
- Centrifuge
- Incubator
- Disposable gloves, powderless
- COBAS® AmpliPrep **TNAI WR**
- Cassette opener

3. Experimental protocol

Sample input

Variable levels of sample input (50, 100, 200, 500 or 850 µL) can be processed by the COBAS® AmpliPrep Instrument using the COBAS® AmpliPrep Total Nucleic Acid Isolation Kit. The COBAS® AmpliPrep Instrument automatically adds specimen diluent (**TNAI SD**) up to a final volume of 850 µL. For accurate automated transfer of the requested sample volume into the sample processing unit (SPU) the minimal volumes tabulated in the following table must be pipetted into the sample input tubes (S-tubes). The maximal volume should not exceed 1100 µL in any case.

COBAS® AmpliPrep Total Nucleic Acid Isolation Kit

TNAI (For Use With AMPLILINK Software v3.1 or AMPLILINK Software v3.2)

P/N: 03337928 190 48 Tests

For Laboratory Use

1

Roche Molecular Systems, Inc.

Note: Do not freeze. Store **TNAI CS1**, **TNAI CS2**, **TNAI CS3**, **TNAI CS4** and **TNAI IC/QS DIL** at 2-8°C. Equilibrate **TNAI CS4** to ambient temperature for 12 hours or warm in an incubator for 1 hour at 37°C prior to use.

Sample preparation reagents should be removed from 2-8°C storage at least 30 minutes before the first sample is to be processed on the COBAS® AmpliPrep Instrument. **TNAI CS4** must be removed from 2-8°C storage at least 12 hours before the first sample is to be processed on the COBAS® AmpliPrep Instrument or it must be warmed in an incubator for 1 hour at 37°C prior to use. Mix contents of **TNAI CS4** by shaking for 10 seconds.

Serum and plasma samples must be at ambient temperature before use.

Run Size

Each kit contains reagents sufficient for four 12-test runs, which may be performed separately in up to 4 separate instrument cycles or simultaneously.

Workflow

The COBAS® AmpliPrep Total Nucleic Acid Isolation Kit procedure followed by any nucleic acid amplification/detection can be completed in one day or over two days. Processed samples can remain on the COBAS® AmpliPrep Instrument overnight for up to 20 hours or can be removed from the COBAS® AmpliPrep Instrument and stored at 2-8°C for up to 7 days in the output tubes. Do not freeze.

Part A: COBAS® AmpliPrep Instrument Set-Up

A1. Turn the COBAS® AmpliPrep Instrument **ON**. The COBAS® AmpliPrep Instrument will automatically prime the system when it is powered on.

A2. Check the supply of **TNAI WR** using the Status Screen and replace if necessary.

A3. Perform all Maintenance that is listed in the Due Tab.

A4. If using frozen samples, thaw the samples at room temperature.

A5. Determine the number of COBAS® AmpliPrep reagent cassettes, Sample Processing Units (SPUs), Sample tubes (S-tubes) and K-tips needed. One SPU, one Input S-tube (natural caps), one Output S-tube (gray caps) and one K-tip are needed for each sample.

A6. Place **TNAI CS1** onto a reagent rack. Place **TNAI CS2**, **TNAI CS3** and **TNAI CS4** onto a separate reagent rack.

Note: If an IC/QS is to be used, an appropriate dilution of IC/QS in **TNAI IC/QS DIL** must be made and filled in a vial for preparation of working IC/QS. The working IC/QS should be a minimum of 1.1 mL for 12 tests and a maximum of 4.0 mL for 48 tests. **GPV** must be placed in the assigned position in **TNAI CS3**. Close cassette after addition of **GPV**.

A7. Load the reagent rack containing **TNAI CS1** onto rack position **A** of the COBAS® AmpliPrep Instrument.

A8. Load the reagent rack containing **TNAI CS2**, **TNAI CS3** and **TNAI CS4** onto rack position **B**, **C**, **D** or **E** of the COBAS® AmpliPrep Instrument.

A9. Place the SPUs in the SPU rack(s) and load the rack(s) onto the COBAS® AmpliPrep Instrument.

A10. Load the appropriate number of full output tube racks onto the COBAS® AmpliPrep Instrument.

A11. Attach a barcode label clip to each sample rack position where a sample (S-tube) is to be placed. Place one input S-tube into each position containing a barcode label clip.

A12. Using the Data Station for the AMPLILINK software, create the Test Definitions with the desired settings (sample volume, use of IC/QS, use of clot detection). Create one or more sample orders in the Sample Tab and save. Load the sample racks onto rack positions **F**, **G**, or **H** of the COBAS® AmpliPrep Instrument. Print a worksheet.

A13. Move the racks to the designated Pre-Amplification Area for sample addition.

Part B: COBAS® AmpliPrep Instrument Loading and Operation

B1. Vortex each sample for 3 to 5 seconds. Spin each sample briefly to collect fluid in the base of the tube. Avoid contaminating gloves when manipulating the samples.

B2. Transfer 250, 325, 650 or 1000 µL of each sample to the appropriate bar

code labeled S-tube using a micropipettor with an aerosol barrier or positive displacement DNase-/RNase-free tip. Avoid transferring particulates and/or fibrin clots from the original sample to the S-tube. Samples should be transferred to tube positions as assigned in step A12.

B3. Load the sample rack(s) containing samples onto rack position(s) **F, G** or **H** of the COBAS® AmpliPrep Instrument.

B4. Start the COBAS® AmpliPrep Instrument using the AMPLILINK software. Sample processing is automatically performed by the COBAS® AmpliPrep Instrument.

B5. Take the following precautions to avoid contamination: Thoroughly clean and disinfect all work surfaces used during sample and control transfer with a freshly prepared solution of 0.5% sodium hypochlorite in deionized or distilled water^{9,10}.

Part C: Processed Sample Handling

C1. After the sample preparation run on the COBAS® AmpliPrep Instrument is complete, check validity of sample processing.

C2. Remove the sample rack(s) containing the processed samples. Once removed from the COBAS® AmpliPrep Instrument, processed samples may be stored in the output tubes at 2-8°C for up to 7 days. Do not freeze.

C3. Close the test orders in the Order Screen (assign results to the test orders and save). Processed samples without flags or error messages are ready for amplification.

C4. Accept results in the Result Screen.

C5. Take the following precautions to avoid contamination: Thoroughly clean and disinfect all work surfaces used during sample transfer with a freshly prepared solution of 0.5% sodium hypochlorite in deionized or distilled water.

4. References

- (1) Boom R., Sol C.J.A., Salimans M.M.M, Jansen C.L., Wertheim-van Dillen P.M.E., and van der Noordaa, J. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. *J Clin Microbiol* **28**, 1990, 495-503.
- (2) MacDonald R.J., Swift G.H., Przybyla A.E., and Chirgwin J.M. Isolation of RNA Using Guanidinium Salts. *Meth Enzymol* **152**, 1987, 219-226.
- (3) McCaustland K.A., Bi S., Purdy M.A. and Bradley D.W. Application of two RNA extraction methods prior to amplification of hepatitis E nucleic acid by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods*, **35**, 1991, p. 331-342.
- (4) Gantzer C., Senouci S., Maul A., Levi Y., Schwartzbrod L. Enterovirus genomes in wastewater: concentration on glass wool and glass powder and detection by RT-PCR. *J Virol Methods* **65**, 1997, 265-271.
- (5) Chungue E., Roche C., Lefevre M.-F., Barbazan P., and Chanteau S. Ultra-Rapid, Simple, Sensitive, and Economical Silica Method for Extraction of Dengue Viral RNA from Clinical Specimens and Mosquitoes by Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *J Med Virol* **40**, 1993, 142-145.
- (6) Morsica G., Novati R., Lazzarin A. Detection of Hepatitis C Virus RNA by Methods Using Phenol-Chloroform or Silica Particles. *J Clin Microbiol* **33**, 1995, 2522-2523.
- (7) Martin GP and Timmers E. PCR and Its Modifications for the Detection of Infectious Diseases. In: *Nucleic Acid Amplification Technologies: Application to Disease Diagnosis*. Lee HH, Morse SA and Olsvik O eds. BioTechniques Books, Div Eaton

Publishing 1997: 79-100.

(8) McDonough SH, Bott MA and Giachetti C. Application of Transcription-Mediated Amplification to Detection of Nucleic Acids from Clinically Relevant Organisms. In: Nucleic Acid Amplification Technologies: Application to Disease Diagnosis. Lee HH, Morse SA and Olsvik O eds. BioTechniques Books, Div Eaton Publishing 1997: 113-124.

(9) Richmond, J.Y. and McKinney, R.W. eds. 1999. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. HHS Publication Number (CDC) 93-8395.

(10) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Third Edition. CLSI Document M29-A3 Wayne, PA:CLSI, 2005.

Manufactured by:

Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ 08876 USA

A Member of the Roche Group

Distributed by:

Roche Diagnostics Roche Diagnostics

Indianapolis, IN 46256 USA H7V 4A2 Laval, Quebec

(For Technical Assistance call the (For Technical Assistance call:

Roche Response Center Pour toute assistance technique,

toll-free: 1-800 526 1247) appeler le: 1-877 273 3433)

Roche Diagnostics (Schweiz) AG Roche Diagnostics

CH-6343 Rotkreuz F-38240 Meylan

Roche Diagnostics GmbH Distributore in Italia:

D-68298 Mannheim, Germany Roche Diagnostics SpA

Piazza Durante 11

I-20131 Milano

Roche Diagnostics S.L. Distribuidor em Portugal:

E-08006 Barcelona Roche Farmacêutica Química, Lda

P-2700 Amadora

ROCHE, AMPLILINK, COBAS and AMPLIPREP are trademarks of Roche.

ROCHE RESPONSE CENTER is a service mark of Roche.

Copyright 2008, by Roche Molecular Systems, Inc. All rights reserved.

8/2008

Doc Rev. 3.0 04709896001-03

2

Roche Molecular Systems, Inc.