

Инструкции за употреба (наръчник) за QIAamp[®] DSP Circulating NA Kit



50

Версия 2



За ин витро диагностика



61504



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Германия



1127632BG

Съдържание

Предвидена употреба	4
Потребители, за които е предназначен	4
Описание и принцип	5
Обеми на аликвотната част	5
Лизиране на аликвотните части	7
Адсорбция с мембраната на колоната QIAamp Mini	7
Отстраняване на остатъчни замърсители	7
Елуиране на пречистени нуклеинови киселини	8
Добив и големина на нуклеиновите киселини	8
Описание на протоколите	9
Кратко изложение и обяснение	9
Предоставени материали	10
Съдържание на набора	10
Компоненти на набора	11
Необходими, но непредоставени материали	12
Допълнителни реактиви	12
Консумативи	12
Оборудване	13
Предупреждения и предпазни мерки	14
Информация за безопасността	14
Информация за спешни случаи	15
Предпазни мерки	15

Изхвърляне	16
Съхранение и боравене с реактиви	17
Стабилност при употреба	17
Съхранение и работа с проби	18
Процедура	19
Приготвяне на буфери и реактиви	26
Протокол Breeze: Пречистване на циркулиращи нуклеинови киселини от 1–5 ml човешка кръвна плазма	29
Класически протокол: Пречистване на циркулиращи нуклеинови киселини от 1–5 ml човешка кръвна плазма	35
Контрол на качеството	41
Ограничения	41
Работни характеристики	42
Цитирани източници	43
Ръководство за отстраняване на проблеми	44
Символи	47
Приложение А: Препоръка за разделяне и съхранение на кръвна плазма	50
Приложение В: Общи бележки за работа с РНК	52
Информация за поръчка	53
Хронология на редакциите на документа	54

Предвидена употреба

QIAamp DSP Circulating NA Kit е система, която използва технология със силициева мембрана (технология QIAamp) за ръчно изолиране и пречистване на циркулираща безклетъчна ДНК и РНК от проби от човешка кръвна плазма.

QIAamp DSP Circulating NA Kit е предназначен за ин витро диагностика.

Потребители, за които е предназначен

Продуктът е предвиден за употреба от професионални потребители – например лаборанти и лекари, обучени в техниките на молекулярната биология.

Описание и принцип

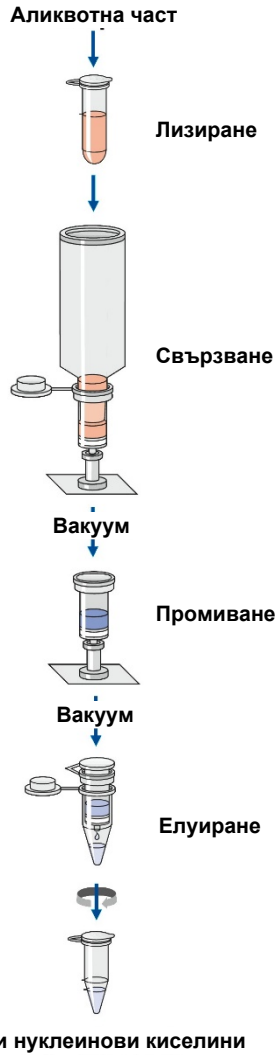
Процедурата на QIAamp DSP Circulating NA включва 4 стъпки (лизиране, свързване, промиване и елуиране) и се извършва с помощта на колони QIAamp Mini на системата QIAvac. Стабилната процедура помага да се сведе до минимум кръстосаното замърсяване между пробите и повишава безопасността на потребителите при работа с потенциално инфекциозни проби.

Простата процедура е подходяща за едновременна обработка на до 24 проби за по-малко от 2 часа.

Обеми на аликвотната част

Колоните QIAamp Mini свързват фрагментирани нуклеинови киселини, които са около 20 nt къси, но добивът зависи от обема на аликвотната част и концентрацията на циркулиращите нуклеинови киселини в пробата (обикновено 1–100 ng/ml в плазмата). Процедурата QIAamp DSP Circulating NA е оптимизирана за обеми на аликвотната част до 5 ml.

**Процедура на QIAamp
DSP Circulating NA Kit**



Фигура 1. Общ преглед на процедурата на QIAamp DSP Circulating NA Kit.

Лизиране на аликуотните части

Свободно циркулиращите нуклеинови киселини в биологичните течности обикновено са свързани с протеини или обвити във везикули, което изисква ефективна стъпка на лизиране за освобождаване на нуклеинови киселини за селективно свързване към колоната QIAamp Mini. Следователно, аликуотните части се лизират в силно денатурирано състояние при завишени температури в присъствието на протеиназа K и Buffer ACL, което осигурява инактивиране на ДНази и РНази и освобождаване на нуклеинови киселини от свързани протеини, липиди и везикули.

Адсорбция с мембраната на колоната QIAamp Mini

За да се позволи оптимално свързване на циркулиращите нуклеинови киселини към мембраната, условията на свързване се регулират чрез добавяне на Buffer ACB към лизата. След това лизатите се прехвърлят в колона QIAamp Mini и голям обем от циркулиращите нуклеинови киселини се адсорбират на силициевата мембрана, докато лизатът се изтегля чрез вакуумно налягане. Солеността и pH се регулират, така че повечето протеин и други замърсители, които могат да инхибират PCR и други ензимни реакции надолу по веригата, не се задържат на мембраната на колоната QIAamp Mini.

За протокола са необходими вакуумен колектор (напр. QIAvac 24 Plus със системата QIAvac Connecting System) и вакуумна помпа, способна да произведе вакуум от ~800–900 mbar (напр. QIAGEN® Vacuum Pump). Трябва да се използва Vacuum Regulator (част от системата QIAvac Connecting System) за лесно наблюдение на вакуумното налягане и удобно освобождаване на вакуума.

Отстраняване на остатъчни замърсители

Нуклеиновите киселини остават свързани с мембраната, докато замърсителите ефикасно се отмиват по време на 3-те стъпки за промиване.

Елуиране на пречистени нуклеинови киселини

Елуирането се извършва с Buffer AVE. На една единствена стъпка силно пречистените циркулиращи нуклеинови киселини се елуират в Buffer AVE, temperиран до стайна температура. Може да се приложи гъвкав обем на елуиране от 50–150 μl . Ако са необходими по-високи концентрации на нуклеинови киселини, елуирацията обем може да бъде намален до 20 μl . Обем на елуиране, по-малък от 50 μl , води до по-високо концентрирани елуати на нуклеинова киселина, но може да доведе до по-нисък общ добив.

Възстановеният обем на елуата може да бъде с до 5 μl по-малък от обема на елуирация буфер, нанесен върху колоната.

Добив и големина на нуклеиновите киселини

Добивите на свободно циркулиращи нуклеинови киселини, изолирани от биологични проби, обикновено са под 1 μg и следователно са трудни за определяне със спектрофотометър. Абсолютният добив на циркулираща ДНК и РНК, получени от аликвотна част с помощта на QIAamp DSP Circulating NA Kit, варира между аликвотните части от различни лица и също така зависи от други фактори (напр. определени болестни състояния). Освен това носещата РНК, присъстваща в извлечените нуклеинови киселини, вероятно ще доминира в показанията на UV абсорбцията (вижте страница 27). За определянето на получените количества е препоръчително да се използват количествени методи за амплификация.

Разпределението на размера на циркулиращите нуклеинови киселини, пречистени с помощта на QIAamp DSP circulating NA Kit, може да бъде проверено чрез електрофореза в агарозен гел или хибридизация на специфична за целта етикетирани сонда (1), или разтвор за микрофлуидна електрофореза (напр. Agilent® Bioanalyzer).

Описание на протоколите

В този наръчник са предоставени два различни протокола.

- Протоколът „Протокол Breeze: Пречистване на циркулиращи нуклеинови киселини от 1–5 ml човешка кръвна плазма“ (стр. 29) е за обработка на до 5 ml плазма на стъпки от по 1 ml и е оптимизиран за кратко време за обработка и получаване на резултата.
- Протоколът „Класически протокол: Пречистване на циркулиращи нуклеинови киселини от 1–5 ml човешка кръвна плазма“ (стр. 35) е за обработка на до 5 ml плазма на стъпки от по 1 ml и представлява непроменен протокол на *Наръчника за QIAamp DSP Circulating NA Kit* версия 1, редакция 3 (R3).

Кратко изложение и обяснение

Свободно циркулиращите нуклеинови киселини присъстват в човешката плазма обикновено като къси фрагменти, <1000 bp (ДНК), <1000 nt (РНК) или къси до 20 nt (миРНК). Концентрацията на свободно циркулиращи нуклеинови киселини в човешката кръвна плазма обикновено е ниска и варира значително между отделните лица в интервала 1–100 ng/ml за аликвотни части от човешки проби (2–6).

QIAamp DSP Circulating NA Kit позволява ефективно пречистване на циркулиращи нуклеинови киселини от човешка плазма. Аликвотните части могат да бъдат пресни или замразени. Удължителите за епруветки и вакуумната обработка на QIAvac 24 Plus позволяват начални обеми на аликвотната част до 5 ml, а гъвкавите обеми на елуиране между 20 и 150 µl позволяват концентрация на видове нуклеинови киселини, които присъстват в ниски концентрации.

Елуираната свободно циркулираща геномна ДНК или РНК е готова за използване в приложения надолу по веригата или подходяща за съхранение. Потребителят трябва да оптимизира началния обем на плазмата и обема на елуиране според тяхната специфична цел и приложение надолу по веригата в дадената лаборатория.

Предоставени материали

Съдържание на набора

QIAamp DSP Circulating NA Kit	(50)
Каталожен №	61504
Брой подготовки	50

	Идентичност	Символи	Количество
QIAamp Mini	QIAamp Mini columns with Wash Tubes (Колони QIAamp Mini с епруветки за промиване) (WT) (2 ml)	COL	50
EXT	Column Extenders (Удължители за колони) (20 ml)	COL EXT	2 x 25
WT	Wash Tubes (Епруветки за промиване) (2 ml)	WASH TUBE	50
ET	Elution Tubes (Епруветки за елуиране) (1,5 ml)	ELU TUBE	50
VC	VacConnectors	VAC CON	50
ACL*	Lysis Buffer (Лизиращ буфер)*	LYS BUF	220 ml
ACB*	Binding Buffer (Свързващ буфер)* (концентрат)	BIND BUF CONC	300 ml
ACW1*	Wash Buffer 1 (Промиващ буфер 1)* (концентрат)	WASH BUF 1 CONC	19 ml
ACW2†	Wash Buffer 2 (Промиващ буфер 2)† (концентрат)	WASH BUF 2 CONC	13 ml
AVE†	Elution Buffer (Елуиращ буфер (пилави капачки))†	ELU BUF	5 x 2 ml
PROTK	QIAGEN Proteinase K	PROTK	4 x 7 ml
Carrier	Carrier RNA (Носеща РНК) (червени капачки)	CAR RNA	310 µg
QIAamp Mini	QIAamp Mini columns with Wash Tubes (Колони QIAamp Mini с епруветки за промиване) (WT) (2 ml)	COL	50
	Наръчник	H B	1

* Съдържа хаотропна сол. Вижте страница 14 за информация относно Предупреждения и предпазни мерки.

† Съдържа натриев азид като консервант.

Компоненти на набора

По-долу са обяснени основните компоненти на набора.

Таблица 1. Активни съставки в предоставените реактиви

Реактив		Активна съставка	Концентрация
Символ	Име		
ACL	Lysis Buffer (Лизиращ буфер)	Гуанидин тиоцианат	≥30 – <50% тегл./тегл.
ACB	Binding Buffer (Свързващ буфер) (концентрат)	Гуанидин тиоцианат	≥30 – <50% тегл./тегл.
ACW1	Wash Buffer 1 (Промиващ буфер 1) (концентрат)	Гуанидин хидрохлорид	≥30 – <60% тегл./тегл.
ACW2	Wash Buffer 2 (Промиващ буфер 1) (концентрат)	Няма	–
AVE	Elution Buffer (Елуиращ буфер) (лилави капачки)	Няма	–
PROTK	QIAGEN Proteinase K	Протеиназа К	≥1 – <3% тегл./тегл.
Carrier	Carrier RNA (Носеща РНК) (червени капачки)	Няма	–

Контроли и калибратори

За да се сведе до минимум рискът от отрицателно въздействие върху диагностичните резултати, генерирани след изолиране на нуклеинова киселина, трябва да се използват подходящи контроли за последващите приложения по веригата.

Необходими, но непредоставени материали

Допълнителни реактиви

- Етанол (96 – 100%)*
- Изопропанол (100%)
- Натрошен лед (само за „Класически протокол: Пречистване на циркулиращи нуклеинови киселини от 1–5 ml човешка кръвна плазма“.)
- Някои аликвотни части може да изискват разреждане с фосфатно буфериран физиологичен разтвор (Phosphate Buffered Saline, PBS)

Консумативи

- Пипети (регулируеми)
- Стерилни накрайници за пипети (препоръчват се накрайници за пипети с аерозолни бариери за предотвратяване на кръстосано замърсяване)
- 1,5 или 2 ml микроепруветки без нуклеаза
- епруветки за центрофугиране от по 50 ml

* Не използвайте денатуриран спирт, който съдържа други вещества като метанол или метилетилкетон.

Оборудване

- Водна баня или нагревателен блок за епруветки за центрофугиране от по 50 ml при 56°C или 60°C*
- Нагревателен блок или подобно устройство при 56°C за епруветки за промиване от по 2 ml (само за Класическия протокол)*
- Вортекс
- Микроцентрофуга (с ротор за 2-ml епруветки)*
- QIAvac 24 Plus vacuum manifold (кат. № 19413)
- QIAvac Connecting System (кат. № 19419) или еквивалентна система
- Vacuum Pump (кат. № 84010 [САЩ или Канада], 84000 [Япония] или 84020 [за другите държави]) или еквивалентна помпа с възможност за създаване на подналягане от -800 до -900 mbar
- По избор: VacValves (кат. № 19408)

* Апаратите задължително трябва да се проверяват и калибрират по препоръките на производителя.

Предупреждения и предпазни мерки

Обръщаме ви внимание, че може да се наложи да докладвате на производителя и регулаторния орган в страната по местожителство на потребителя и/или пациента за сериозни инциденти, възникнали във връзка с изделието.

За ин витро диагностика

Информация за безопасността

При работа с химикали винаги носете подходяща лабораторна престилка, ръкавици за еднократна употреба и защитни очила. За повече информация вижте съответните информационни листове за безопасност (Safety Data Sheets, SDS). Тези листове можете да намерите онлайн в удобен и компактен PDF формат на www.qiagen.com/safety, където можете да намерите, прегледате и разпечатате SDS за всеки набор на QIAGEN и компонент на набора.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ Опасност от телесни повреди



НЕ наливайте белина или киселинни разтвори направо в отпадъците от подготовката на аликвотните части.

Buffer ACL, Buffer ACB и Buffer ACW1 съдържат гуанидинови соли, които може да образуват силно реактивни съединения с белината.

Ако се разлее течност, съдържаща такива буфери, я почистете с подходящ лабораторен детергент и вода. Ако разлятата течност съдържа потенциално инфекциозни агенти, първо почистете замърсената област с лабораторен детергент и вода, а след това с 1% (по обем) натриев хипохлорит.

- Пробите и аликвотните части са потенциално заразни. Изхвърлете аликвотната част и отпадъка от анализа в съответствие с местните процедури за безопасност.

Информация за спешни случаи

CHEMTREC

В САЩ и Канада 1-800-424-9300

Извън САЩ и Канада +1 703-527-3887

Предпазни мерки

Следните предупреждения за опасност и предпазни мерки се отнасят за компонентите на QIAamp DSP Circulating NA Kit.

Buffer ACB



Съдържа: гуанидин тиоцианат. Опасно! Вреден при поглъщане. Може да бъде вреден при поглъщане, контакт с кожата или вдишване. Причинява тежки изгаряния на кожата и сериозно увреждане на очите. Вреден за водните организми, с дълготраен ефект. При контакт с киселини отделя силно токсичен газ. Използвайте предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице. ПРИ КОНТАКТ С ОЧИТЕ: Промивайте внимателно с вода в продължение на няколко минути. Свалете контактните лещи, ако има такива и доколкото това е възможно. Продължете с изплакването. Незабавно се обадете в ЦЕНТЪР ПО ТОКСИКОЛОГИЯ или на лекар.

Buffer ACL



Съдържа: гуанидин тиоцианат. Опасно! Вреден при поглъщане. Може да бъде вреден при поглъщане, контакт с кожата или вдишване. Причинява тежки изгаряния на кожата и сериозно увреждане на очите. Вреден за водните организми, с дълготраен ефект. При контакт с киселини отделя силно токсичен газ. Използвайте предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице. ПРИ КОНТАКТ С ОЧИТЕ: Промивайте внимателно с вода в продължение на няколко минути. Свалете контактните лещи, ако има такива и доколкото това е възможно. Продължете с изплакването. Незабавно се обадете в ЦЕНТЪР ПО ТОКСИКОЛОГИЯ или на лекар.

Buffer ACW1



Съдържа: гуанидин хидрохлорид. Предупреждение! Вреден при поглъщане или вдишване. Предизвиква дразнене на кожата. Предизвиква сериозно дразнене на очите. Използвайте предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице. Съблечете замърсените дрехи и ги изперете, преди да ги използвате отново. Съдържанието/съдът да се изхвърли в одобрено съоръжение за изхвърляне на отпадъци.

Протеиназа К



Съдържа: Протеиназа К. Опасно! Предиизвиква леко дразнене на кожата. При вдишване може да предизвика алергия, симптоми на астма или затруднено дишане. Избягвайте вдишване на прах/пушек/газ/дим/изпарения/аерозоли. Използвайте предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице. Носете дихателна защита. При явна или предполагаема експозиция: Обадете се в ЦЕНТЪР ПО ТОКСИКОЛОГИЯ или на лекар. Изведете пострадалия на чист въздух и го поддържайте в удобно положение, за да може да диша. Съдържанието/съдът да се изхвърли в одобрено съоръжение за изхвърляне на отпадъци.

Изхвърляне

Отпадъците съдържат аликвотни части и реактиви. Тези отпадъци може да съдържат токсичен или инфекциозен материал и трябва да се изхвърлят по подходящ начин. Вижте местните разпоредби за безопасност относно правилните процедури за изхвърляне.

За повече информация вижте съответните информационни листове за безопасност (Safety Data Sheets, SDS). Те са достъпни онлайн в PDF формат на www.qiagen.com/safety, където можете да намерите, прегледате и отпечатате информационния лист за безопасност (Safety Data Sheet, SDS) за всеки набор QIAGEN и неговите компоненти.

Съхранение и боравене с реактиви

Колоните QIAamp Mini трябва да се съхраняват сухи при температура от 2–8°C. Всички буфери трябва да се съхраняват на стайна температура (15–25°C). Колоните и буферите QIAamp Mini могат да се съхраняват при тези условия до изтичане на срока на годност върху кутията на набора, без да се наблюдава намаляване на ефективността им.

Лиофилизираната носеща РНК трябва да се съхранява при стайна температура (15–25°C) до изтичане на срока на годност върху етикета на набора. Носещата РНК може да се разтваря само в Buffer AVE; разтворената носеща РНК трябва незабавно да се прибавя в Buffer ACL, както е описано на страница 30, за „Breeze протокола“ и на страница 36 за Класическия протокол. Този разтвор трябва да е прясно приготвен. Неизползваните части носеща РНК, разтворени в Buffer AVE, трябва да бъдат замразени на аликвотни части при -30°C – -15°C.

Наборът QIAamp DSP Circulating NA Kit съдържа готов за употреба разтвор на протеиназа К, който е разтворен в специално разработен буфер за съхранение. Протеиназа К е стабилна до изтичане на срока на годност върху етикета на компонента, когато се съхранява при стайна температура (15 – 25 °C).

Стабилност при употреба

Наборът може да се използва 12 месеца след първата употреба или до изтичане на срока на годност, което се случи по-рано.

Съхранение и работа с проби

Съхранение и работа с кръвни проби

За да се избегне разграждането на безклетъчни и освобождаването на клетъчни нуклеинови киселини, препоръчваме съхранение на цяла кръв за максимум 6 часа при температура от 2–8°C (напр. EDTA аликвотни части). Ако използвате стабилизирани епруветки за вземане на кръв, моля спазвайте условията за съхранение, предоставени от производителя. Препоръчваме да валидирате тези условия за съхранение в комбинация с конкретното приложение и цел надолу по веригата.

Съхранение и работа с плазмени проби

Препоръчва се отделянето на плазмата и изолирането на нуклеинови киселини да се извършва веднага след кръводаряването, като се използва EDTA като антикоагулант. Това важи особено за РНК. За краткосрочно съхранение плазмата може да се съхранява до 24 часа при температура от 2–8°C.

За по-дългосрочно съхранение, аликвотите от плазмени проби от стабилизирани и нестабилизирани епруветки за взимане на кръв могат да се съхраняват при температура от -20°C или на -80°C до 12 месеца (само за ДНК като цел) или при температура от -80°C за 4 седмици (за РНК като цел).

Съхраняване на елуирани нуклеинови киселини

Елуираните нуклеинови киселини се събират в 1,5-ml епруветки за елуиране (включени в доставката). Пречистените циркулиращи нуклеинови киселини могат да се съхраняват до 24 часа при температура от 2–8°C. За периоди на съхранение, по-дълги от 24 часа, се препоръчва съхранение при температура от -30°C до -15°C за приложение надолу по веригата на ДНК и от -90°C до -60°C за РНК.

Процедура

Важни моменти преди да започнете

QIAvac 24 Plus

Системата QIAvac 24 Plus е проектирана за бърза и ефективна вакуумна обработка на до 24 успоредни центрофугиращи колони QIAGEN. Аликвотните части и разтворите за промиване се изтеглят през мембраните на колоната с помощта на вакуум вместо центрофугиране, осигурявайки по-голяма скорост и намалено време за обработка, необходимо за процедурите на пречистване.

В комбинация със системата QIAvac Connecting System, QIAvac 24 Plus може да се използва като проточна система. Протичащата аликуотна част се събира в отделен съд за отпадъци.

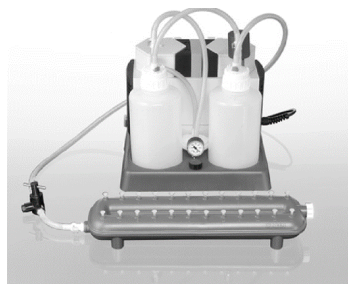
За поддръжка на системата QIAvac 24 Plus вижте указанията за работа в *Наръчника за QIAvac 24 Plus*.

Обработка на колони QIAamp Mini на QIAvac 24 Plus

Колоните QIAamp Mini се обработват на QIAvac 24 Plus с помощта на VacConnectors за еднократна употреба и VacValves за многократна употреба. VacValves (по избор) се вкарват директно в луер гнездата на колектора QIAvac 24 Plus и осигуряват постоянен дебит, улеснявайки паралелната обработка на различни обеми на аликуотната част. Те трябва да се използват, ако дебитите на аликуотните части се различават значително, за да се осигури постоянен вакуум. VacConnectors представляват конектори за еднократна употреба, които са разположени между колоните QIAamp Mini и VacValves или между колоните QIAamp Mini и луер гнездата на QIAvac 24 Plus. Те предотвратяват директния контакт между въртящата се колона и VacValve по време на пречистване, като по този начин се избягва кръстосаното замърсяване между аликуотните части. VacConnectors се изхвърлят след еднократна употреба. Поради големите използвани обеми на разтвора е необходима система QIAvac Connecting System (или подобен уред със съдове за отпадъци) (вижте Фигура 2).

Указания за работа с QIAvac 24 Plus

- Винаги поставяйте QIAvac 24 Plus върху здрав плот или работна зона. Ако бъде изпуснат, колекторът QIAvac 24 Plus може да се спуска.
- Винаги съхранявайте QIAvac 24 Plus в чисто и сухо състояние. За процедурите за почистване вижте *Наръчника за QIAvac 24 Plus*.
- Компонентите на QIAvac 24 Plus не са устойчиви на определени разтворители (Таблица 2). Ако тези разтворители се разляят върху уреда, изплакнете го обилно с вода.
- За да осигурите постоянна ефективност, не нанасяйте силиконова или вакуумна грес върху частите на колектора QIAvac 24 Plus.
- Винаги бъдете внимателни и носете предпазни очила, когато работите близо до вакуумен колектор под налягане.
- Свържете се с отдела за техническо обслужване на QIAGEN или с местния дистрибутор за информация относно ремонтните дейности или резервните части.
- Вакуумното налягане представлява диференциалното налягане между вътрешността на вакуумния колектор и атмосферата (стандартно атмосферно налягане от 1013 mbar или 760 mmHg) и може да бъде измерено с помощта на системата QIAvac Connecting System (вижте Фигура 2). Протоколите изискват вакуумна помпа, способна да произвежда вакуум или налягане от -800 до -900 mbar (напр. QIAGEN Vacuum Pump). Трябва да се избягва по-високо вакуумно налягане. Използването на по-ниско от препоръчаното вакуумно налягане може да намали добива и чистотата на нуклеиновата киселина и да увеличи риска от запушване на мембраните.



Фигура 2. QIAvac 24 Plus, QIAvac Connecting System и вакуумна помпа.

Таблица 2. Характеристики на химическата устойчивост на QIAvac 24 Plus

Устойчивост към		Неустойчивост към
Оцетна киселина	Хаотропни соли	Бензен
Хромна киселина	Концентрирани алкохоли	Фенол
Натриев додецил сулфат (SDS)	Натриев хлорид	Хлороформ
Tween™ 20	Урея	Толуен
Хлорно избелващо средство	Солна киселина	Етери
Натриев хидроксид		

Настройка на колектора QIAvac 24 Plus vacuum manifold

1. Свържете QIAvac 24 Plus към източник на вакуум. Ако използвате системата QIAvac Connecting System, свържете я към колектора и източника на вакуум, както е описано в Приложение А на *Наръчника за QIAvac 24 Plus*.
2. Поставете VacValve (по избор) във всяко луер гнездо на QIAvac 24 Plus, което ще се използва (вижте Фигура 3). Затворете неизползваните луер гнезда с луер тапи или затворете поставения VacValve.
VacValves трябва да се използват, ако дебитите на аликвотните части се различават значително, за да се осигури постоянен вакуум.
3. Поставете VacConnector във всеки VacValve (вижте Фигура 3).
Изпълнете тази стъпка директно преди да започнете пречистването, за да избегнете излагането на VacConnectors на потенциални замърсители във въздуха.
4. Поставете колоните QIAamp Mini във VacConnectors на колектора (вижте Фигура 3).
Забележка: Запазете епруветката за промиване от блистерната опаковка за използване в протокола за пречистване.
5. Поставете удължител за колона (20 ml) във всяка колона QIAamp Mini (вижте Фигура 3).

Забележка: Уверете се, че удължителят на колоната е здраво фиксиран в колоната QIAamp Mini, за да избегнете изтичане на аликвотна част.

6. За пречистване на нуклеинова киселина, следвайте инструкциите в протоколите. Изхвърлете VacConnectors по подходящ начин след употреба.

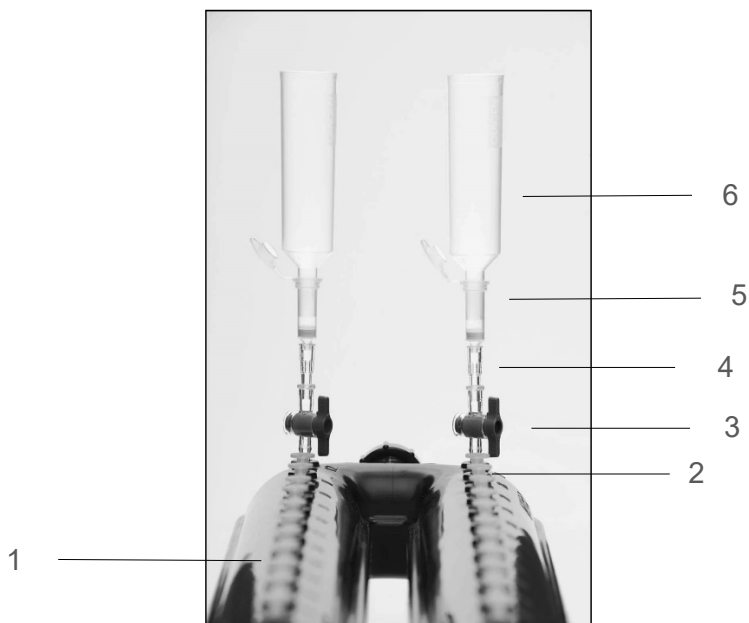
Оставете капака на колоната QIAamp Mini отворен, докато прилагате вакуум.

Изключвайте вакуумната помпа между стъпките, за да гарантирате, че по време на обработката се прилага постоянен, равномерен вакуум. За по-бързо освобождаване на вакуума трябва да се използва Vacuum Regulator (част от системата QIAvac Connecting System).

Забележка: Всеки VacValve може да бъде затворен поотделно, когато аликвотната част е напълно изтеглена през въртящата се колона, което позволява паралелна обработка на аликвотни части с различни обеми или вискозитет.

7. След обработка на аликвотните части почистете QIAvac 24 Plus (вижте „Почистване и обеззаразяване на QIAvac 24 Plus“ в *Наръчника за QIAvac 24 Plus*).

Забележка: Буферите ACL, ACB и ACW1 не са съвместими с дезинфектанти, съдържащи белина. Вижте страница 14 за информацията относно Предупреждения и предпазни мерки.

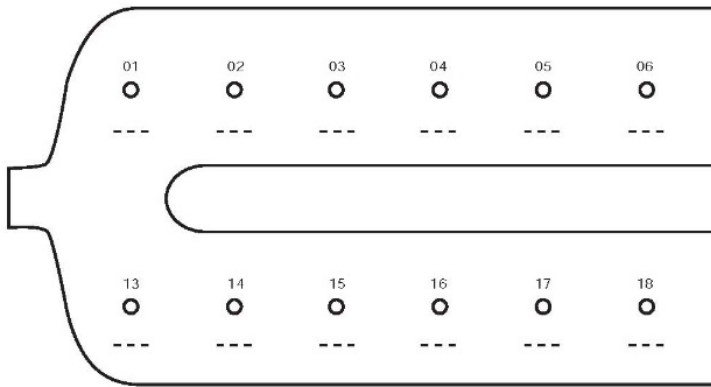


Фигура 3. Настройка на QIAvac 24 Plus с колони QIAamp Mini с помощта на VacValves, VacConnectors и удължители на колони.

- | | | | |
|----------|---|----------|---------------------|
| 1 | QIAvac 24 Plus vacuum manifold | 4 | VacConnector |
| 2 | Луер гнездо на QIAvac 24 Plus (затворено с луер тапа) | 5 | Колонa QIAamp Mini |
| 3 | VacValve* | 6 | Удължител за колонa |

За избягване на смесване на аликвотни части, препоръчваме етикетиране на епруветките и колоните QIAamp Mini за употреба с вакуумната система QIAvac 24 Plus, съгласно схемата, показана на Фигура 4. Тази фигура може да бъде фотокопирана и обозначена с имената на аликвотните части.

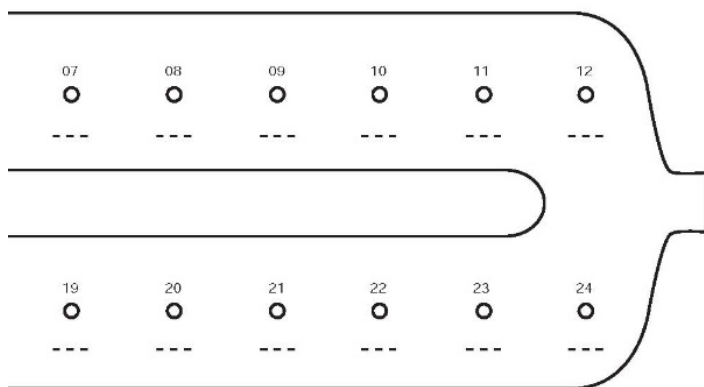
* Закупува се отделно.



Дата: _____

Оператор: _____

Идентификатор за изпълнение: _____



Фигура 4. Схема за етикетиране на епруветки и колони QIAamp Mini за употреба с вакуумната система QIAvac 24 Plus.

Приготвяне на буфери и реактиви

Buffer ACB

Преди употреба добавете 200 ml изопропанол (100%) към 300 ml концентрат на Buffer ACB, за да получите 500 ml Buffer ACB. Разбъркайте добре след добавяне на изопропанол.

Buffer ACW1*

Преди употреба добавете 25 ml етанол (96–100%) към 19 ml концентрат на Buffer ACW1, за да получите 44 ml Buffer ACW1. Разбъркайте добре след добавяне на етанол.

Buffer ACW2†

Преди употреба добавете 30 ml етанол (96–100%) към 13 ml концентрат на Buffer ACW2, за да получите 43 ml Buffer ACW2. Разбъркайте добре след добавяне на етанол.

Добавяне на носеща РНК към Buffer ACL*

Носещата РНК служи за 2 цели: първо, тя подобрява свързването на вирусните нуклеинови киселини с мембраната QIAamp Mini, особено ако в аликвотната част има много малко молекули от прицелната нуклеинова киселина. Второ, прибавянето на големи количества носеща РНК намалява риска от разграждане на РНК в редките случаи, когато молекулите на рибонуклеазите не се денатурират от хаотропните соли и детергенти в Buffer ACL.

* Съдържа хаотропна сол. Вижте страница 14 за информация относно Предупреждения и предпазни мерки.

† Съдържа натриев азид като консервант.

Предоставеното количество лиофилизирана носеща РНК е достатъчно за обема на Buffer ACL, предоставен с набора. Препоръчителната концентрация на носеща РНК е коригирана така, че протоколът на QIAamp DSP Circulating NA да може да се използва като генерична система за пречистване, съвместима с много различни системи за амплификация, и да е подходящ за широк спектър от прицелни РНК и ДНК.

Ефективността на различните системи за амплификация може да зависи от общото количество нуклеинови киселини, присъстващо в реакцията. Елуатите от този набор съдържат както циркулиращи нуклеинови киселини, така и носеща РНК и количествата носеща РНК в повечето случаи ще бъдат много по-големи от количествата циркулиращи нуклеинови киселини. Следователно, количественото определяне на изолирани циркулиращи нуклеинови киселини чрез отчитане на абсорбцията на UV няма да бъде адекватно, тъй като резултатите от такива измервания се определят от присъствието на носеща РНК.

За да се постигнат възможно най-високи нива на чувствителност при реакциите за амплификация, може да е необходимо да се намали прибавеното количество носеща РНК в Buffer ACL.

За амплификационни системи, включващи Oligo dT праймери, не е необходимо добавянето на носеща РНК по време на изолирането на свободно циркулиращи нуклеинови киселини.

Прибавете 1550 µl Buffer AVE* в епруветката с 310 µg лиофилизирана носеща РНК, за да се получи разтвор с концентрация от 0,2 µg/µl. Разтворете напълно носещата РНК и я разпределете на удобни аликвотни части, след което я съхранявайте при температура от -30°C до -15°C. Не замразявайте и размразявайте многократно аликвотните части на носещата РНК.

*Съдържа натриев азид като консервант.

Имайте предвид, че носещата РНК не се разтваря в Buffer ACL. Тя трябва първо да се разтвори в Buffer AVE и след това да се прибави в Buffer ACL.

Изчислете обема на сместа на Buffer ACL с носещата РНК, необходима за дадената партида от аликвотни части според таблиците в протоколите. Изберете броя на аликвотните части, които да бъдат обработени едновременно.

Разбъркайте внимателно, като обърнете епруветката или съда 10 пъти. Не разбърквайте на вортекса, за да не се образува пяна.

Забележка: Процедурата за подготовка на аликвотни части е оптимизирана за максимум 1,0 µg носеща РНК на всяка аликвотна част. Ако е установено, че за системата ви за амплификация е по-добре да се използва по-малко количество носеща РНК, прехвърлете само необходимото количество разтворена носеща РНК в епруветките с Buffer ACL. За всеки микрограм носеща РНК, необходим за всяка аликвотна част, прибавете по 5 µl разтворена в Buffer ACL носеща РНК. (Използване на по-малко от 1,0 µg носеща РНК на всяка аликвотна част може да окаже положително въздействие и трябва да се валидира за всеки конкретен вид аликвотна част и анализ надолу по веригата.)

Протокол Breeze: Пречистване на циркулиращи нуклеинови киселини от 1–5 ml човешка кръвна плазма

Този протокол е за пречистване на циркулираща ДНК и РНК от 1–5 ml човешка кръвна плазма и е оптимизиран за кратко време за обработка и получаване на резултата. За съществуващи валидирани от потребителя работни потоци, използващи QIAamp DSP Circulating NA Kit версия 1/R3, моля, вижте „Класически протокол: Пречистване на циркулиращи нуклеинови киселини от 1–5 ml човешка кръвна плазма“ (страница 35).

Важни моменти преди да започнете

- Всички стъпки за центрофугиране се извършват при стайна температура (15–25 °C).
- Изключвайте вакуумната помпа между стъпките, за да гарантирате, че при изпълнението на стъпките от протокола се прилага постоянно, еднакво подналягане.
Забележка: Налягането на Vacuum Pump трябва да бъде между –800 и –900 mbar.
- Темперирайте аликвотните части до стайна температура.
- Използвайте буферирани физиологичен разтвор (Phosphate Buffered Saline, PBS), за да получите обем на аликвотната част до най-близкия точен обем (1 до 5 ml).
- Настройте QIAvac 24 Plus, както е описано на страница 21.
- Загрейте водна баня или нагревателен блок до 56°C за използване с епруветки за центрофугиране от 50 ml в стъпка 3.
- Темперирайте центрофугиращите колони QIAamp Mini за поне 1 час на стайна температура преди употреба.
- Уверете се, че буферите Buffer ACB, Buffer ACW1 и Buffer ACW2 са приготвени (с добавен изопропанол или етанол) съгласно инструкциите на страница 26.
- Добавете носеща РНК, разтворена в Buffer AVE, към Buffer ACL, съгласно инструкциите в Таблица 3.

Таблица 3. Обем на Buffer ACL и носеща РНК (разтворена в Buffer AVE), необходимо за обработка на 1–5 ml проби от човешка кръвна плазма

Настройка за ml плазма	A	Б	В	Г	Д	
	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	
Брой на алиquotните части	Buffer ACL (ml)					Носеща РНК в Buffer AVE (µl)
1	0,9	1,8	2,6	3,5	4,4	5,6
2	1,8	3,5	5,3	7,0	8,8	11,3
3	2,6	5,3	7,9	10,6	13,2	16,9
4	3,5	7,0	10,6	14,1	17,6	22,5
5	4,4	8,8	13,2	17,6	22,0	28,1
6	5,3	10,6	15,8	21,1	26,4	33,8
7	6,2	12,3	18,5	24,6	30,8	39,4
8	7,0	14,1	21,1	28,2	35,2	45,0
9	7,9	15,8	23,8	31,7	39,6	50,6
10	8,8	17,6	26,4	35,2	44,0	56,3
11	9,7	19,4	29,0	38,7	48,4	61,9
12	10,6	21,1	31,7	42,2	52,8	67,5
13	11,4	22,9	34,3	45,8	57,2	73,1
14	12,3	24,6	37,0	49,3	61,6	78,8
15	13,2	26,4	39,6	52,8	66,0	84,4
16	14,1	28,2	42,2	56,3	70,4	90,0
17	15,0	29,9	44,9	59,8	74,8	95,6
18	15,8	31,7	47,5	63,4	79,2	101,3
19	16,7	33,4	50,2	66,9	83,6	106,9
20	17,6	35,2	52,8	70,4	88,0	112,5
21	18,5	37,0	55,4	73,9	92,4	118,1
22	19,4	38,7	58,1	77,4	96,8	123,8
23	20,2	40,5	60,7	81,0	101,2	129,4
24	21,1	42,2	63,4	84,5	105,6	135,0

Процедура: Протокол Breeze

1. Пипетирайте QIAGEN Proteinase K, плазма и Buffer ACL **в този ред** в епруветка за центрофугиране от 50 ml (не е предоставена).

Настройки	А	Б	В	Г	Д
ProtK (µl)	100	200	300	400	500
Плазма (ml)	1	2	3	4	5
ACL (ml)	0,8	1,6	2,4	3,2	4

2. Затворете капачката и разбъркайте импулсно на вортекса за 5 x 2 s.

Уверете се, че в епруветката се образува характерното завихряне. За да се осигури ефикасно лизиране, е задължително аликвотната част и Buffer ACL да бъдат разбъркани напълно до получаване на хомогенен разтвор.

Забележка: Не прекъсвайте процедурата в този момент. Преминете направо към стъпка 3, за да започнете инкубирането с цел лизиране.

3. Инкубирайте при температура от 56°C (±1°C) за 15 (±1) минути.
4. Поставете епруветката обратно на плота в лабораторията и развийте капачката.
5. Добавете Buffer ACB към лизата в епруветката. Изберете силата на звука според настройката от стъпка 1.

Настройки	А	Б	В	Г	Д
ACB (ml)	1,8	3,6	5,4	7,2	9

6. Затворете капачката и разбъркайте щателно чрез импулсно вортексиране за 5 x 2 s.

Уверете се, че в епруветката се образува характерното завихряне. За да се осигури ефикасно лизиране, е задължително лизатът и Buffer ACB да бъдат разбъркани напълно до получаване на хомогенен разтвор.

7. Инкубирайте сместа между лизат и Buffer ACB в епруветката за 5 (\pm 1) минути при стайна температура.
8. Вмъкнете колоната QIAamp Mini във VacConnector на QIAvac 24 Plus (вижте „Настройка на колектора QIAvac 24 Plus vacuum manifold“, страница 21). Поставете удължител за колона от 20 ml в отворената колона QIAamp Mini. Уверете се, че удължителят на колоната е здраво фиксиран в колоната QIAamp Mini, за да избегнете изтичане на аликвотна част.
Забележка: Запазете епруветката за промиване за сухото центрофугиране на стъпка 13.
9. Внимателно нанесете лизата от стъпка 7 в удължителя на колоната QIAamp Mini. Включете вакуумната помпа. Когато всички лизати са изтеглени напълно през колоните, изключете вакуумната помпа и освободете налягането до 0 mbar. Внимателно отстранете и изхвърлете удължителя на колоната.
Моля, обърнете внимание, че големи обеми лизат на аликвотната част (приблизително 18 ml, когато се започне с аликвотна част от 5 ml) може да се нуждаят от до 20 минути, за да преминат през мембраната QIAamp Mini с помощта на вакуума.
За бързо и удобно освобождаване на вакуума трябва да се използва Vacuum Regulator (част от системата QIAvac Connecting System).
Забележка: За да избегнете кръстосано замърсяване, внимавайте да не кръстосват съседни колони QIAamp Mini, докато удължителите за колони са премахнати.
10. Въведете 600 μ l Buffer ACW1 в колоната QIAamp Mini. Оставете капака на колоната отворен и включете вакуумната помпа. След като Buffer ACW1 бъде напълно изтеглен през колоната QIAamp Mini, изключете вакуумната помпа и освободете налягането до 0 mbar.

11. Въведете 750 µl Buffer ACW2 в колоната QIAamp Mini. Оставете капака на колоната отворен и включете вакуумната помпа. След като Buffer ACW2 бъде напълно изтеглен през колоната QIAamp Mini, изключете вакуумната помпа и освободете налягането до 0 mbar.
12. Въведете 750 µl етанол (96–100%) в колоната QIAamp Mini. Оставете капака на колоната отворен и включете вакуумната помпа. След като етанолът бъде напълно изтеглен през колоната, изключете вакуумната помпа и освободете налягането до 0 mbar.
13. Затворете капака на колоната QIAamp Mini. Извадете го от вакуумния колектор и изхвърлете VacConnector. Поставете колоната QIAamp Mini в чиста епруветка за промиване от 2 ml (от стъпка 8) и центрофугирайте при пълна скорост (20 000 x g; 14 000 об./мин) за 3 (±0,5) минути.
14. Поставете колоната QIAamp Mini в нова 2-ml епруветка за промиване. Отворете капака и инкубирайте модула при стайна температура за 3 минути, за да изсъхне напълно мембраната.
15. Поставете колоната QIAamp Mini в чиста 1,5-ml епруветка за елуиране (предоставена) и изхвърлете 2-ml епруветка за промиване от стъпка 14. Внимателно нанесете 20–150 µl Buffer AVE в центъра на мембраната на колоната QIAamp Mini. Затворете капачето и инкубирайте при стайна температура за 3 (±0,5) минути.

Важно: Уверете се, че буферът за елуиране Buffer AVE е темперирен до стайна температура (15–25°C). Ако се елуират малки обеми (< 50 µl), буферът за елуиране трябва да се накапе в центъра на мембраната за пълно елуиране на свързаните нуклеинови киселини.

Обемът за елуиране може да се адаптира според изискванията на приложенията надолу по веригата.

Елуирането с по-малки обеми Buffer AVE води до по-високи концентрации на нуклеинова киселина, но може да доведе до по-нисък общ добив.

Възстановеният обем на елуата може да бъде до 5 µl по-малък от обема на елуирането, приложен към мембраната на колоната QIAamp Mini.

Забележка: За очаквани ниски добиви на нуклеинова киселина се препоръчва използването на епруветка със слабо свързване за елуиране (не е предоставена).

16. Центрофугирайте в микроцентрифуга на пълна скорост (приблизително 20 000 x g, или 14 000 об./мин) в продължение на 1 минута, за да елуирате нуклеиновите киселини.

Забележка: Ориентируйте капците на елуиращите епруветки така, че да сочат в посока, обратна на въртенето на ротора (напр. ако роторът се върти по посока на часовниковата стрелка, ориентируйте капците обратно на часовниковата стрелка).

Класически протокол: Пречистване на циркулиращи нуклеинови киселини от 1–5 ml човешка кръвна плазма

Този протокол представлява непроменен протокол на *Наръчника за QIAamp DSP Circulating NA Kit*, редакция 3 (R3), за използване с, например, съществуващи валидирани от потребителя работни потоци за 1–5 ml човешка плазма.

Важни моменти преди да започнете

- Всички стъпки за центрофугиране се извършват при стайна температура (15–25 °C).
- Изключвайте вакуумната помпа между стъпките, за да гарантирате, че при изпълнението на стъпките от протокола се прилага постоянно, еднакво подналягане.
Забележка: Налягането на Vacuum Pump трябва да бъде между -800 и -900 mbar.
- Темперирайте аликвотните части до стайна температура.
- Използвайте буферирани физиологичен разтвор (Phosphate Buffered Saline, PBS), за да получите обем на аликвотната част до най-близкия точен обем (1 до 5 ml).
- Настройте QIAvac 24 Plus, както е описано на страница 21.
- Загрейте водна баня или нагревателен блок до 60°C за използване с епруветки за центрофугиране от 50 ml в стъпка 3.
- Загрейте водна баня или нагревателен блок до 56°C за използване с епруветки за промиване от 2 ml в стъпка 14.
- Темперирайте центрофугиращите колони QIAamp Mini за поне 1 час на стайна температура преди употреба.
- Уверете се, че буферите Buffer ACB, Buffer ACW1 и Buffer ACW2 са приготвени (с добавен изопропанол или етанол) съгласно инструкциите на страница 26.
- Добавете носеща РНК, разтворена в Buffer AVE, към Buffer ACL, съгласно инструкциите в Таблица 4.

Таблица 4. Обем на Buffer ACL и носеща PHK (разтворена в Buffer AVE), необходимо за обработка на 1–5 ml проби от човешка кръвна плазма

Настройка за ml плазма	A	Б	В	Г	Д	
	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	
Брой на алиquotните части	Buffer ACL (ml)					Носеща PHK в Buffer AVE (µl)
1	0,9	1,8	2,6	3,5	4,4	5,6
2	1,8	3,5	5,3	7,0	8,8	11,3
3	2,6	5,3	7,9	10,6	13,2	16,9
4	3,5	7,0	10,6	14,1	17,6	22,5
5	4,4	8,8	13,2	17,6	22,0	28,1
6	5,3	10,6	15,8	21,1	26,4	33,8
7	6,2	12,3	18,5	24,6	30,8	39,4
8	7,0	14,1	21,1	28,2	35,2	45,0
9	7,9	15,8	23,8	31,7	39,6	50,6
10	8,8	17,6	26,4	35,2	44,0	56,3
11	9,7	19,4	29,0	38,7	48,4	61,9
12	10,6	21,1	31,7	42,2	52,8	67,5
13	11,4	22,9	34,3	45,8	57,2	73,1
14	12,3	24,6	37,0	49,3	61,6	78,8
15	13,2	26,4	39,6	52,8	66,0	84,4
16	14,1	28,2	42,2	56,3	70,4	90,0
17	15,0	29,9	44,9	59,8	74,8	95,6
18	15,8	31,7	47,5	63,4	79,2	101,3
19	16,7	33,4	50,2	66,9	83,6	106,9
20	17,6	35,2	52,8	70,4	88,0	112,5
21	18,5	37,0	55,4	73,9	92,4	118,1
22	19,4	38,7	58,1	77,4	96,8	123,8
23	20,2	40,5	60,7	81,0	101,2	129,4
24	21,1	42,2	63,4	84,5	105,6	135,0

Процедура: Класически протокол

1. Пипетирайте QIAGEN Proteinase K, плазма и Buffer ACL в този ред в епруветка за центрофугиране от 50 ml (не е предоставена).

Настройки	А	Б	В	Г	Д
ProtK (µl)	100	200	300	400	500
Плазма (ml)	1	2	3	4	5
ACL (ml)	0,8	1,6	2,4	3,2	4

2. Затворете капачката и разбъркайте импулсно на вортекса за 30 s.

Уверете се, че в епруветката се образува характерното завихряне. За да се осигури ефикасно лизиране, е задължително аликвотната част и Buffer ACL да бъдат разбъркани напълно до получаване на хомогенен разтвор.

Забележка: Не прекъсвайте процедурата в този момент. Преминете направо към стъпка 3, за да започнете инкубирането с цел лизиране.

3. Инкубирайте при температура от 60°C (±1°C) за 30 (±2) минути.
4. Поставете епруветката обратно на плота в лабораторията и развийте капачката.
5. Добавете Buffer ACB към лизата в епруветката. Изберете силата на звука според настройката от стъпка 1.

Настройки	А	Б	В	Г	Д
ACB (ml)	1,8	3,6	5,4	7,2	9

6. Затворете капачката и разбъркайте щателно чрез импулсно вортексиране за 30 s.
Уверете се, че в епруветката се образува характерното завихряне. За да се осигури ефикасно лизиране, е задължително лизатът и Buffer ACB да бъдат разбъркани напълно до получаване на хомогенен разтвор.
7. Инкубирайте сместа между лизат и Buffer ACB в епруветката за 5 (±1) минути върху лед.

8. Вмъкнете колоната QIAamp Mini във VacConnector на QIAvac 24 Plus (вижте „Настройка на колектора QIAvac 24 Plus vacuum manifold“, страница 21). Поставете удължител за колона от 20 ml в отворената колона QIAamp Mini. Уверете се, че удължителят на колоната е здраво фиксиран в колоната QIAamp Mini, за да избегнете изтичане на алиquotна част.
- Забележка:** Запазете епруветката за промиване за сухото центрофугиране на стъпка 13.
9. Внимателно нанесете лизата от стъпка 7 в удължителя на колоната QIAamp Mini. Включете вакуумната помпа, прилагайки налягане от –800 до –900 mbar. Когато всички лизати са изтеглени напълно през колоните, изключете вакуумната помпа и освободете налягането до 0 mbar. Внимателно отстранете и изхвърлете удължителя на колоната.
- Моля, обърнете внимание, че големи обеми лизат на алиquotната част (приблизително 18 ml, когато се започне с алиquotна част от 5 ml) може да се нуждаят от до 20 минути, за да преминат през мембраната QIAamp Mini с помощта на вакуума.
- За бързо и удобно освобождаване на вакуума трябва да се използва Vacuum Regulator (част от системата QIAvac Connecting System).
- Забележка:** За да избегнете кръстосано замърсяване, внимавайте да не кръстосват съседни колони QIAamp Mini, докато удължителите за колони са премахнати.
10. Въведете 600 µl Buffer ACW1 в колоната QIAamp Mini. Оставете капака на колоната отворен и включете вакуумната помпа. След като Buffer ACW1 бъде напълно изтеглен през колоната QIAamp Mini, изключете вакуумната помпа и освободете налягането до 0 mbar.
11. Въведете 750 µl Buffer ACW2 в колоната QIAamp Mini. Оставете капака на колоната отворен и включете вакуумната помпа. След като Buffer ACW2 бъде напълно изтеглен през колоната QIAamp Mini, изключете вакуумната помпа и освободете налягането до 0 mbar.

12. Въведете 750 μl етанол (96–100%) в колоната QIAamp Mini. Оставете капака на колоната отворен и включете вакуумната помпа. След като етанолът бъде напълно изтеглен през колоната, изключете вакуумната помпа и освободете налягането до 0 mbar.
13. Затворете капака на колоната QIAamp Mini. Извадете го от вакуумния колектор и изхвърлете VacConnector. Поставете колоната QIAamp Mini в чиста епруветка за промиване от 2 ml (от стъпка 8) и центрофугирайте при пълна скорост (20 000 x g; 14 000 об./мин) за 3 ($\pm 0,5$) минути.
14. Поставете колоната QIAamp Mini в нова 2-ml епруветка за промиване. Отворете капака и инкубирайте модула при 56°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) за 10 (± 1) минути, за да изсъхне напълно мембраната.
15. Поставете колоната QIAamp Mini в чиста 1,5-ml епруветка за елуиране (предоставена) и изхвърлете 2-ml епруветка за промиване от стъпка 13. Внимателно нанесете 20–150 μl Buffer AVE в центъра на мембраната на колоната QIAamp Mini. Затворете капачето и инкубирайте при стайна температура за 3 ($\pm 0,5$) минути.

Важно: Уверете се, че буферът за елуиране Buffer AVE е темперирен до стайна температура (15–25°C). Ако се елуират малки обеми (< 50 μl), буферът за елуиране трябва да се накапе в центъра на мембраната за пълно елуиране на свързаните нуклеинови киселини.

Обемът за елуиране може да се адаптира според изискванията на приложенията надолу по веригата.

Елуирането с по-малки обеми Buffer AVE води до по-високи концентрации на нуклеинова киселина, но може да доведе до по-нисък общ добив.

Възстановеният обем на елуата може да бъде до 5 μl по-малък от обема на елуирането, приложен към колоната QIAamp Mini.

Забележка: За очаквани ниски добиви на нуклеинова киселина се препоръчва използването на епруветка със слабо свързване за елуиране (не е предоставена).

16. Центрофугирайте в микроцентрифуга на пълна скорост (приблизително 20 000 x g, или 14 000 об./мин) в продължение на 1 минута, за да елуирате нуклеиновите киселини.

Забележка: Ориентирайте капците на елуиращите епруветки така, че да сочат в посока, обратна на въртенето на ротора (напр. ако роторът се върти по посока на часовниковата стрелка, ориентирайте капците обратно на часовниковата стрелка).

Контрол на качеството

В съответствие със сертифицираната по ISO Система за управление на качеството на QIAGEN всяка производствена партида на QIAamp DSP Circulating NA Kit се тества по предварително определени спецификации, за да се осигури постоянно качество на продуктите.

Ограничения

Ефективността на системата за изолиране на циркулиращи безклетъчни нуклеинови киселини е установена с помощта на проби от човешка плазма, генерирани от следните епруветки за вземане на кръв:

- K2-EDTA (Beckton Dickinson and Company, кат. № 367525)
- PAXgene® Blood ccfDNA Tube (PreAnalytiX, кат. № 768115)
- Cell-Free DNA BCT (Streck, кат. № 218962)

Потребителят носи отговорността да валидира работните характеристики на системата за всички процедури в неговата лаборатория, които не са включени в проучвания на работните характеристики на QIAGEN.

За да се сведе до минимум рискът от отрицателно отражение върху диагностичните резултати, трябва да се използват адекватни контроли за по-нататъшните приложения. За допълнително валидиране се препоръчва да се използват указанията на International Conference on Harmonisation of Technical Requirements (Международната конференция за хармонизиране на техническите изисквания) (ICH) в ICH Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Test and Methodology (Валидиране на аналитични процедури: тестване и методика).

Всички получени диагностични резултати трябва да се интерпретират заедно с другите клинични или лабораторни констатации.

Работни характеристики

Приложимите работни характеристики могат да бъдат намерени в раздела Resource (Ресурси) на продуктовата страница на www.qiagen.com.

Цитирани източници

1. Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
2. Levy, B. (2019) *Prenatal Diagnosis*. *Methods in Molecular Biology*. 2nd ed. New York: Humana Press.
3. Hahn, S. and Zimmermann, B.G. (2010) Cell-free DNA in maternal plasma: has the size-distribution puzzle been solved? *Clin Chem*. **56**, 1210-1211.
4. Anfossi, S., Babayan, A., Pantel, K., and Calin, G. (2018) Clinical utility of circulating non-coding RNAs - an update. *Nat Rev Clin Oncol* **15**, 541-563.
5. Babayan, A. and Pantel, K. (2018) Advances in liquid biopsy approaches for early detection and monitoring of cancer. *Genome Med* **10**, 21.
6. Terrinoni, A., et al (2019) The circulating miRNAs as diagnostic and prognostic markers. *Clin Chem Lab Med*. **57**, 932-953.

Ръководство за отстраняване на проблеми

Това ръководство за отстраняване на проблеми може да бъде полезно за отстраняване на евентуално възникнали проблеми. За повече информация вижте и страницата „Често задавани въпроси“ (Frequently Asked Questions, FAQ) в нашия Център за техническа поддръжка: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Учените в „Технически услуги“ на QIAGEN винаги с радост ще отговорят на всички Ваши въпроси относно информацията и/или протоколите в този наръчник или относно аликвотните части и технологиите на анализ (за информация за контакти посетете www.qiagen.com).

Коментари и предложения

Малко количество или липса на нуклеинова киселина в елуата

- | | |
|---|--|
| a) Използване на нестабилизирана плазма | Нестабилизираните плазмени проби могат да доведат до ускорено разграждане на ДНК. Препоръчваме да следвате CEN/TS 16835-3:2015. Повторете процедурата за пречистване с нови аликвотни части. |
| b) Удължено време между вземането на кръв и приготвянето на плазмата | Ядрените кръвни клетки могат да се разпаднат и да освободят геномна ДНК в плазмата, разреждайки целевата нуклеинова киселина. |
| c) Аликвотни части, замразени и размразени повече от веднъж | Многократното замразяване и размразяване трябва да се избягва, тъй като това може да доведе до разграждане на ДНК. Винаги използвайте пресни аликвотни части или аликвотни части, размразени само веднъж. |
| d) Ниска концентрация на целева ДНК в аликвотните части | Плазмените проби са били оставени да престоят на стайна температура твърде дълго. Повторете процедурата за пречистване с нови аликвотни части
Забележка: Някои лица може да имат ниска концентрация на безклетъчна нуклеинова киселина в плазмата; тук трябва да се избере увеличен обем на аликвотната част и нисък обем на елуата. |
| e) Неефективно лизиране на аликвотната част в Buffer ACL | Ако QIAGEN Proteinase K е била подложена на повишена температура за продължително време, тя може да загуби своята активност. Повторете процедурата, като използвате нови аликвотни части и прясна QIAGEN Proteinase K. |
| f) Сместа между Buffer ACL и носещата РНК не е достатъчно добре смесена | Смесете Buffer ACL с носещата РНК, като внимателно обърнете епруветката със сместа между Buffer ACL и носещата РНК поне 10 пъти. |

Коментари и предложения

- | | | |
|----|--|--|
| g) | Използва се нисък процент етанол вместо 96–100% | Повторете процедурата за пречистване с нови алиquotни части и 96–100% етанол. Не използвайте денатуриран спирт, който съдържа други вещества като метанол или метилетилкетон. |
| h) | Buffer ACB е приготвен неправилно | Проверете дали концентратът на Buffer ACB е разтворен с правилния обем изопропанол (не етанол, вижте страница 26). |
| i) | Buffer ACW1 или Buffer ACW2 са приготвени неправилно | Проверете дали концентратите на Buffer ACW1 и Buffer ACW2 са разредени с правилния обем етанол (вижте страница 26). Повторете процедурата за пречистване с нови алиquotни части. |
| j) | Buffer ACW1 или Buffer ACW2 са приготвени със 70% етанол | Проверете дали концентратите на Buffer ACW1 и Buffer ACW2 са разредени с 96–100% етанол (вижте страница 26). Повторете процедурата за пречистване с нови алиquotни части. |

ДНК или РНК не са достатъчно ефективни при ензимни реакции надолу по веригата

- | | | |
|----|---|--|
| a) | Малко или липса на ДНК в елуата | Вижте „Малко количество или липса на нуклеинова киселина в елуата“ по-горе за възможните причини. Увеличете количеството елуат, добавен към реакцията, ако е възможно. |
| b) | Използван неподходящ обем на елуирание | Определете максималния обем елуат, подходящ за приложението надолу по веригата. Намалете или увеличете съответно обема на елуата, добавен към приложението надолу по веригата. Обемът на елуирание може да се адаптира пропорционално.
Забележка: Елуирането с по-малки обеми Buffer AVE води до по-високи концентрации на нуклеинова киселина, но може да доведе до по-нисък общ добив. |
| c) | Буферите не са смесени добре | Компонентите на солта и етанола на буфера за промиване Buffer ACW2 може да са се разделили, след като са били оставени да престоят за дълъг период между циклите. Винаги смесвайте добре буферите преди всеки цикъл. |
| d) | Интерференция, дължаща се на носещата РНК | Ако наличието на носеща РНК в елуата пречи на ензимната реакция надолу по веригата, може да се наложи да се намали количеството на носещата РНК или да се пропусне напълно. |

Обща работа











- | | | |
|----|-----------------------------|--|
| a) | Запушена колона QIAamp Mini | Ако скоростта на дебата се намали, времето за подаване на вакуум може да се удължи.
Като алтернатива затворете VacValve, ако се използва, и внимателно отстранете сглобката между удължителя за колона, VacConnector и VacValve от колоната QIAamp Mini, без да губите количество от лизата в удължителя за колоната.
Извадете колоната QIAamp Mini от вакуумния колектор, поставете я в 2-ml епруветка за промиване и я завъртете на пълна скорост, докато алиquotната част премине напълно през мембраната. Сменете сглобката между удължителя за колони, VacConnector и VacValve, съдържаща останалия лизат. Включете вакуумната помпа, отворете VacValve и продължете да зареждате останалия лизат.
Повторете горната процедура, ако колоната QIAamp Mini продължава да се запушва. |
|----|-----------------------------|--|

Коментари и предложения

- Криопреципитатите може да са се образували в плазмата поради многократно замразяване и размразяване. Те може да запушат колоната QIAamp Mini. Не използвайте плазма, която е била замразявана и размразявана повече от веднъж.
- В случай, че се виждат криопреципитати, изчистете алиquotната част чрез центрофугиране за 5 минути при 16 000 x g.
- b) Променливи обеми на елуиране Различните алиquotни части могат да повлияят на обема на крайния елуат. Възстановеният обем на елуата може да бъде до 5 µl по-малък от обема на елуирането, приложен към колоната QIAamp Mini.
- c) Не се достига вакуумното налягане от -800 до -900 mbar Вакуумният колектор не е плътно затворен. Натиснете надолу капака на вакуумния колектор, след като вакуумът е включен. Проверете дали е достигнато вакуумно налягане.
- Уплътнението на капака на QIAvac е износено. Проверете визуално уплътнението на колектора и го сменете, ако е необходимо.
- VacValves са износени. Отстранете всички VacValves и поставете VacConnectors директно в луер разширенията. Поставете колоните QIAamp Mini във VacConnectors, затворете капака на колоните и включете вакуума. Проверете дали е достигнато вакуумно налягане. Сменете VacValves, ако е необходимо.
- Има теч във връзката към вакуумната помпа. Затворете всички луер разширения с луер тапи и включете вакуумната помпа. Проверете дали вакуумното налягане е стабилно, след като помпата е включена (и вентилът на Vacuum Regulator е затворен). Сменете връзките между помпата и вакуумния колектор, ако е необходимо.
- Ако вакуумното налягане все още не е достигнато, сменете вакуумната помпа с по-мощна.

Символи

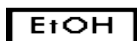
Следните символи се фигурират в инструкциите за употреба или на опаковката и етикетите:

Символ	Описание на символа
 Σ <N>	Съдържа достатъчно реактиви за <N> реакции
	Използвайте до
	Този продукт отговаря на изискванията на Европейски регламент 2017/746 за медицински изделия за инвитро диагностика.
	Медицинско изделие за инвитро диагностика
	Каталожен номер
	Партиден номер
	Номер на материала (т.е., етикет на компонента)
	Компоненти
	Съдържа
	Номер

Символ	Описание на символа
	Глобален номер на търговска единица
Rn	„R“ означава редакция на Инструкциите за употреба, а „n“ е номерът на редакцията
	Температурни ограничения
	Производител
	Направете справка с инструкциите за употреба
	Пазете от слънчева светлина
	Предупреждение/внимание
	След получаване
	Отворено при доставка; съхранявайте колоните QIAamp Mini Spin при 2–8°C
	Обем
	Добавяне

Символ**Описание на символа**

Запишете днешната дата след прибавянето на етанол в шишето



Етанол



Запишете днешната дата след прибавянето на изопропанол в шишето



Изопропанол

→

Води до



Гуанидин тиоцианат



Гуанидин хидрохлорид



BRIJ 58



Протеиназа К



Уникален идентификатор на изделието

Приложение А: Препоръка за разделяне и съхранение на кръвна плазма

За стабилизирани епруветки за взимане на кръв (напр. епруветки PAXgene ccfDNA Tube или Streck Cell-Free DNA Tube), моля, следвайте инструкциите на производителя за разделяне и съхранение на плазмата. Препоръчваме да валидирате тези условия за съхранение в комбинация с конкретното приложение и цел надолу по веригата.

За нестабилизирани епруветки за взимане на кръв препоръчваме да следвате разпоредбите на ISO 20186-3:2019 Молекулярно изследване за *in vitro* диагностика – Спецификации за преданалитични процедури за вземане на кръв – Част 3: Изолирана ДНК без циркулираща клетка от плазма или CEN/TS 17742 Молекулярно изследване за *in vitro* диагностика – Спецификации за преданалитични процедури за вземане на кръв – Изолирана РНК без циркулираща клетка от плазма.

За изолиране на циркулиращи безклетъчни нуклеинови киселини от кръвни аликвотни части препоръчваме да следвате следващия протокол, който включва стъпка на центрофугиране с висока сила на *g* за отстраняване на клетъчни остатъци, като по този начин се намалява количеството на клетъчна или геномна ДНК и РНК в пробата.

1. Поставете цяла кръв с EDTA в епруветки BD Vacutainer® (или други първични епруветки за кръвни аликвотни части, съдържащи EDTA като антикоагулант) в центрофуга, охладена до 4°C с въртящ се ротор и подходящи кофи.
2. Центрофугирайте кръвните аликвотни части за 10 минути при 1900 x *g* (3000 об./мин) при температура от 4°C.
3. Внимателно аспирирайте плазмения супернатант, без да нарушавате граничния слой между плазмата и клетъчната повърхност. От една 10-ml първична епруветка за кръвни аликвотни части може да се получи приблизително 4–5 ml плазма.

Забележка: На този етап плазмата може да се използва за екстракция на циркулираща нуклеинова киселина. Следващото високоскоростно центрофугиране обаче ще премахне допълнителните клетъчни остатъци и замърсявания на циркулиращите нуклеинови киселини от геномна ДНК и РНК, получени от увредени ядрени кръвни клетки.

4. Аспирираната плазма се прехвърля в нова епруветка за центрофугиране.
5. Центрофугирайте плазмените проби за 10 минути при 16 000 x g (в ротор с фиксиран ъгъл) при температура от 4°C.

Това ще премахне допълнителните клетъчни нуклеинови киселини, прикрепени към клетъчни остатъци.

6. Внимателно отстранете супернатантата и я прехвърлете в нова епруветка, без да нарушавате пелетата.
7. Ако плазмата ще се използва за екстракция на нуклеинова киселина в същия ден, съхранявайте я при 2–8°C до по-нататъшната обработка. За по-дългосрочно съхранение, аликутите от плазмени проби от стабилизирани и нестабилизирани епруветки за взимане на кръв могат да се съхраняват при температура от -20°C (за ДНК като цел) или -80°C (за РНК като цел) за най-малко 4 седмици. Преди да използвате плазмата за екстракция на циркулираща нуклеинова киселина, размразете епруветките с плазма на стайна температура.
8. **По избор:** За да отстраните криопреципитатите, центрофугирайте плазмените проби за 5 минути при 16 000 x g (в ротор с фиксиран ъгъл).

По избор: Прехвърлете супернатантата в нова епруветка и след това започнете да изпълнявате протокола за екстракция на циркулираща нуклеинова киселина.

Приложение В: Общи бележки за работа с РНК

Работа с РНК

Рибонуклеазите са много стабилни и активни ензими, които по принцип не изискват кофактори, за да действат. Тъй като рибонуклеазите трудно се инактивират и дори микроскопични количества са достатъчни, за да унищожат РНК, не използвайте пластмасови или стъклени изделия, преди да елиминирате първо евентуалното замърсяване с рибонуклеази. Много трябва да се внимава за избягване на неволното внасяне на РНazi в алиquotната част с РНК по време на процедурата за пречистване или след нея. За да се създаде и поддържа среда без рибонуклеази, следващите предпазни мерки трябва да се вземат по време на предварителната обработка и употребата на съдове и разтвори за еднократна и многократна употреба, когато се работи с РНК.

Обща работа

Когато се работи с РНК, винаги трябва да се използва подходяща микробиологична асептична техника. Бактерии и плесени може да има по ръцете и праховите частици и затова те са най-честите източници на замърсяване с рибонуклеази. Винаги носете латексови или винилови ръкавици, когато работите с реактиви и алиquotни части с РНК, за да предотвратите замърсяване с рибонуклеази от повърхността на кожата или от прашно лабораторно оборудване. Сменяйте често ръкавиците и дръжте епруветките затворени, когато е възможно. Съхранявайте пречистената РНК върху лед, когато се пипетират алиquotи за приложения надолу по веригата.

Пластмасови изделия за еднократна употреба

По време на процедурата се препоръчва използването на стерилни полипропиленови епруветки без РНazi за еднократна употреба.

Информация за поръчка

Продукт	Съдържание	Кат. №
QIAamp DSP Circulating NA Kit (50)	За 50 подготовки: Колони QIAamp Mini, удължители за колони, VacConnectors, QIAGEN Proteinase K, реактиви, буфери и епруветки за взимане на проби	61504
Акcesoари		
QIAvac 24 Plus vacuum manifold*	Вакуумен колектор за обработка на 1–24 въртящи се колони: Вакуумен колектор QIAvac 24 Plus Vacuum manifold, луер тапи и устройства за бързо съединяване	19413
Vacuum Pump*	Универсална вакуумна помпа	84010 [САЩ и Канада] 84000 [Япония] 84020 [други държави]
QIAvac Connecting System*	Система за свързване на вакуумен колектор с вакуумна помпа: включва табла, съдове за отпадъци, тръби, съединители, кран, манометър и 24 VacValves	19419

* За употреба с вакуумните протоколи.

За актуална информация относно лицензирането и заявления за освобождаване от отговорност за конкретни продукти вижте съответния наръчник или ръководство за потребителя на набора QIAGEN. Наръчниците и ръководствата за потребителя на набори QIAGEN са достъпни на адрес www.qiagen.com или могат да бъдат заявени от отдела за техническо обслужване на QIAGEN или местния ви дистрибутор.

Хронология на редакциите на документа

Редакция

Описание

R1, юни 2022 г.

Набор за IVDR версия 2, издание без промени в протоколите или данните за ефективността в сравнение с версия 1 на набора; добавяне на „ръчна“ изолация към предвидената употреба; незначителни актуализации и корекции

Тази страница умишлено е оставена празна

Тази страница умишлено е оставена празна

Ограничено лицензно споразумение за QIAamp DSP Circulating NA Kit

Употребата на този продукт означава, че всеки купувач или потребител на продукта приема следните условия:

1. Продуктът може да се използва само по протоколите, предоставени с продукта и този наръчник, и само с компонентите, съдържащи се в набора. QIAGEN не предоставя лиценз по никакви права върху своята интелектуална собственост за употребата или включването на приложените компоненти на този набор с компоненти, които не са включени в този набор, освен както е описано в протоколите, предоставени с продукта, този наръчник и допълнителните протоколи, които могат да се изтеглят от адрес www.qiagen.com. Някои от тези допълнителни протоколи са предоставени от потребители на QIAGEN за потребители на QIAGEN. Тези протоколи не са тествани щателно или оптимизирани от QIAGEN. QIAGEN не дава гаранция за тях и не гарантира, че те не нарушават правата на трети страни.
2. Освен изрично посочените лицензи, QIAGEN не дава гаранция, че този набор и/или неговата употреба не нарушават правата на трети страни.
3. Този набор и неговите компоненти се лицензират за еднократна употреба и не могат да се използват повторно, обновяват или препродават.
4. QIAGEN изрично се освобождава от всички други лицензи, изрични или подразбиращи се, с изключение на изрично заявените.
5. Купувачът и потребителят на набора се съгласяват да не предприемат и да не позволяват на други лица да предприемат стъпки, които могат да улеснят или да доведат до някое от действията, забранени по-горе. QIAGEN може да прилага забраните в настоящото Ограничено лицензно споразумение във всеки съд и ще възстанови всички свои разходи за разследване и съдебни разноски, включително адвокатските хонорари, при всяко действие за прилагане на настоящото Ограничено лицензно споразумение или упражняване на всяко от своите права върху интелектуална собственост във връзка с набора и/или неговите компоненти.

Актуалните условия на лиценза ще намерите на www.qiagen.com.

Търговски марки: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, (QIAGEN Group); Agilent® (Agilent Technologies, Inc.); BD™, Vacutainer® (Becton Dickinson and Company); PAXgene® (PreAnalytix GmbH); Tween™ (ICI Americas Inc.). Регистрираните имена, търговските марки и пр., използвани в настоящия документ, дори ако не са изрично обозначени като такива, не се считат за незачитени от закона.

Юни-2022 НВ-3049-001 1127632 © 2022 QIAGEN, всички права запазени.

Поръчки: www.qiagen.com/shop | Техническа поддръжка support.qiagen.com
Уебсайт www.qiagen.com