

QIAamp[®] DSP DNA Blood Mini Kit használati útmutató (kézikönyv)



3. verzió



In vitro diagnosztikai használatra

A QIAamp DSP DNA Blood Mini Kittel való használatra



61104



QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NÉMETORSZÁG



1127543HU

Tartalom

Alkalmazási terület	4
Felhasználói célcsoport.....	4
Leírás és működési elv.....	5
A vérszuszpenzió tisztítása	5
A genomiális DNS bekötése a QIAamp Mini spin oszlop membránjára	5
A visszamaradt szennyeződések eltávolítása	6
A tiszta genomiális DNS eluálása	6
A genomiális DNS hozama és minősége	7
Automatikus tisztítás QIAcube Connect MDx készülék alkalmazásával	7
Összefoglalás és magyarázat	10
Szállított anyagok	11
A kit tartalma	11
A kit összetevői	12
Szükséges, de nem biztosított anyagok	13
Kiegészítő reagensek.....	13
Fogyóeszközök	13
Eszközök.....	13
Kizárólag vákuumos eljárás esetén szükséges anyagok	13
Kizárólag automatizált eljárás esetén szükséges anyagok	14
Figyelmeztetések és óvintézkedések	15
Biztonsági információk	15
Óvintézkedések.....	16

Ártalmatlanítás	17
A reagensek tárolása és kezelése	18
Felbontás után stabilitás	18
Mintavétel, -tárolás és -kezelés	19
Fontos megjegyzések	21
A protokoll megkezdése előtt figyelembe veendő fontos szempontok	21
A reagensek és a pufferek előkészítése	22
A QIAamp Mini spin oszlopok kezelése	23
A QIAvac 24 Plus vákuumrendszer összeállítása	24
Eljárás	26
Protokoll: Genomiális DNS vérmintákból történő izolálása és tisztítása mikrocentrifuga / QIAcube Connect MDx készüléken végzett automatizált tisztítás segítségével	26
Protokoll: Genomiális DNS vérmintákból történő izolálása és tisztítása vákuumrendszer segítségével	31
Minőség-ellenőrzés	36
Korlátozások	37
Teljesítményjellemzők	38
Hibaelhárítási útmutató	39
Szimbólumok	42
Rendelési információk	45
A dokumentum átdolgozási előzményei	48

Alkalmazási terület

A QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit rendszer szilikagélmembrán-technológiát (QIAamp technológia) alkalmaz a genomiális DNS biológiai mintákból történő izolálásához és tisztításához.

A QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit kizárólag in vitro diagnosztikai használatra szolgál.

Felhasználói célcsoport

A termék csak a molekuláris biológiai technikák területén járatos, szakképzett szakemberek, pl. labortechnikusok és orvosok általi használatra készült.

Leírás és működési elv

Minden QIAamp DSP DNA Blood Mini eljárás 4 lépésből áll:

- A vérmintában található sejtek lizálása
- A sejtlyázumban található genomiális DNS bekötése a QIAamp Mini spin oszlop membránjára
- A membrán átmosása
- A genomiális DNS eluálása a membránról

A jelen kézikönyv 2 alternatív QIAamp DSP DNA Blood Mini eljárás protokollját tartalmazza: a spin oszlopos eljárását, amelyhez centrifugára van szükség, illetve automatizált eljárásként végezhető a QIAcube® Connect MDx készüléken (1. ábra), valamint a vákuumos eljárását, amelyhez centrifugára és vákuumrendszerre van szükség (lásd 9. oldal, folyamatábra).

A vérsejtek lizálása

A minták lizálása denaturáló körülmények között, magas hőmérsékleten történik. A lízis QIAGEN® Protease (QP) és lízispuffer (AL) jelenlétében megy végbe.

A genomiális DNS bekötése a QIAamp Mini spin oszlop membránjára

A genomiális DNS QIAamp Mini spin oszlop membránjához való kötődésének optimalizálása érdekében először etanolot kell adni a lizátumhoz. Ezt követően minden lizátumot felvisznek a QIAamp Mini spin oszlopra, ahol a vákuumnyomás vagy a centrifugális erő átszívja a szilikagélmembránon a lizátumot, ezáltal adszorbeálva a genomiális DNS-t.

A visszamaradt szennyeződések eltávolítása

Míg a genomiális DNS kötve marad a QIAamp Mini spin oszlop membránjához, a szennyeződések hatékonyan kimoshatók először az 1. mosópuffer (AW1), majd a 2. mosópuffer (AW2) alkalmazásával.

A tiszta genomiális DNS eluálása

A genomiális DNS QIAamp Mini spin oszlop membránjáról való eluálása 50–200 µl eluáló puffer (AE) segítségével történik. Az eluált DNS készen áll a további downstream assay-k során való felhasználásra, beleértve további különféle downstream in vitro diagnosztikai assay-eket is. Az oszlopra való felvitel előtt hagyni kell szoba-hőmérsékletűre (15–25 °C) melegedni az eluáló puffert (AE).

Mivel az eluáló puffer egy része a spin oszlop membránjában marad a centrifugálás után, a visszanyert eluátum térfogata kevesebb lehet, mint az oszlopra felvitt eluáló pufferé (AE). A visszanyert eluátum térfogata függ a minta jellegétől. Az eluált DNS az elúciós csőben (ET) gyűlik össze, és legfeljebb 4 héten át tárolható 2–8 °C-on. Hosszú távú tároláshoz –20 °C-on való tárolást javasolunk.

Megjegyzés: Az eluátum stabilitása több tényezőtől is nagymértékben függ, és az adott downstream alkalmazáshoz kapcsolódik. A QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit készlettel nyert eluátum stabilitását szabályszerűen elvégzett downstream alkalmazásokkal együtt végezve értékelték. A felhasználó felelőssége, hogy elolvassa a laboratóriumban használt adott downstream alkalmazás használati útmutatóját, és/vagy validálja a teljes munkafolyamatot a megfelelő tárolási feltételek megállapításához.

A genomiális DNS hozama és minősége

A DNS-hozam a mintától és a kiindulási anyag minőségétől függ. A kisebb térfogatokkal végzett eluálás növeli a végső DNS-koncentrációt, de kissé csökkenti a teljes DNS-hozamot. A tervezett későbbi („downstream”) alkalmazáshoz megfelelő elúciós térfogat használatát javasoljuk.

Az izolált genomiális DNS hozama és minősége alkalmassá teszi a molekuláris diagnosztikában alkalmazott downstream kimutatási eljárások (pl. PCR) elvégzésére. A diagnosztikai assay-eket a gyártó utasításainak megfelelően kell elvégezni.

Automatikus tisztítás QIAcube Connect MDx készülék alkalmazásával

A QIAcube Connect MDx készülék a nukleinsavak automatizált izolálására és tisztítására szolgál. Futtatásonként legfeljebb 12 minta feldolgozására képes.

A QIAcube Connect MDx alkalmazása esetén a minta-előkészítés lépései megegyeznek a manuális eljárás során alkalmazott lépésekkel (tehát lizálás, kötés, mosás és eluálás) – ez lehetővé teszi a QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit további használatát jó minőségű DNS tisztítása céljából.

A QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit felhasználásával QIAcube Connect MDx készüléken történő automatizálás esetén előfordulhat, hogy kevesebb mint 50 minta feldolgozása lehetséges a holtterek, a párolgás, valamint a reagensek automatikus pipettázás következtében fellépő többletfelhasználása miatt. A QIAGEN 50 minta feldolgozását csak a QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit manuális felhasználása esetén garantálja.



1. ábra: A QIAcube Connect MDx készülék.

Összefoglalás és magyarázat

A QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit jól kidolgozott technológiát alkalmaz a genomiális DNS 200 µl teljes vérből történő gyors és egyszerű izolálására és tisztítására.

A több vérminta párhuzamosan történő feldolgozására szolgáló QIAamp DSP DNA Blood Mini eljárások eredményeképp használtra kész, tisztított DNS keletkezik. Az eljárások friss vagy fagyasztott teljes véren, továbbá citráttal vagy EDTA-val kezelt véren is elvégezhetők.

Nincs szükség a fehérvérsejtek előzetes elválasztására. Az eljárások során nincs szükség sem fenol/kloroform extrakciójára, sem alkohol precipitációjára, továbbá azok minimális közreműködést igényelnek a felhasználó részéről, ami lehetővé teszi a potenciálisan fertőző minták biztonságos kezelését. Az eljárásokat úgy fejlesztették ki, hogy minimalizálják a minták közötti keresztszennyeződés esélyét. A tisztított DNS készen áll a PCR vagy más alkalmazással történő felhasználásra, vagy hosszú távon tárolható $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on.

Az egyszerű QIAamp DSP spin oszlopos vagy vákuumos eljárások alkalmasak több minta párhuzamos feldolgozására. A standardizálás javítása és a használat megkönnyítése érdekében a QIAcube Connect MDx készüléken egyes QIAamp spin oszlopos eljárások teljes mértékben automatizálhatók (7. oldal).

A vákuumos eljárás esetében a protokoll kivitelezéséhez egy vákuum-elosztócső (pl. a QIAvac 24 Plus a QIAvac Connecting System csatlakoztatórendszerrel) és kb. 800–900 mbar vákuum létrehozására képes vákuumszivattyú (pl. a QIAGEN Vacuum Pump) szükséges. A vákuumnyomás könnyű monitorozásához és az egyszerű vákuumcsökkentéshez Vacuum Regulator használandó (a QIAvac Connecting System csatlakoztatórendszer része).

Szállított anyagok

A kit tartalma




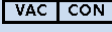
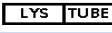
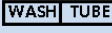

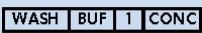





QIAamp DSP DNA Blood Mini kit

Katalógusszám

61104

Elvégezhető preparálások száma

50

	Megnevezés	Szimbólumok	Mennyiség
5	QIAamp Mini Spin Columns with Wash Tubes (QIAamp Mini Spin Columns mosócsövekkel) (WT) (2 ml)		50
ET	Elution Tubes (elúciós csövek) (1,5 ml)	 	50
VC	VacConnectors		50
LT	Lysis Tubes (líziscsövek) (1,5 ml)		50
WT	Wash Tubes (mosócsövek) (2 ml)		3 × 50
AL	Lysis Buffer (Lízispuffer)*		12 ml
AW1	Wash Buffer 1 [†] (1. mosópuffer) (koncentrátum)		19 ml
AW2	Wash Buffer 2 [†] (2. Mosópuffer) (koncentrátum)		13 ml
AE	Elution Buffer [‡] (eluáló puffer)		25 ml
PS	Protease Solvent [‡] (proteáz oldószer)		2 ml
QP	QIAGEN Protease [§]		1 üveg
-	Használati útmutató (kézikönyv)		1

* A QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit felhasználásával QIAcube Connect MDx készüléken történő automatizálás esetén előfordulhat, hogy kevesebb mint 50 minta feldolgozása lehetséges a holtterek, a párolgás, valamint a reagensek automatikus pipettázás következtében fellépő többletfelhasználása miatt. A QIAGEN 50 minta feldolgozását csak a QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit manuális felhasználása esetén garantálja.

[†] Guanidin-hidrokloridot tartalmaz. Hipót tartalmazó fertőtlenítőkkel együtt nem használható. További információért lásd Biztonsági információk, 15. oldal.

[‡] Tartósítószerként nátrium-azidot tartalmaz.

[§] Reszuszpenziós térfogat: 1,2 ml. Lásd „A reagensek és a pufferek előkészítése”, 22. oldal.

A kit összetevői

Az aktív összetevőket tartalmazó fő komponensek magyarázata alább olvasható.

Reagens	Hatóanyagok	Koncentráció (m/m) [%]
QIAGEN Protease	Szubtilizin	≥ 0 és ≤ 100 között
AL	Guanidin-hidroklorid Maleinsav	≥ 30 és < 50 között $\geq 0,1$ és < 1 között
AW1	Guanidin-hidroklorid	≥ 50 és < 70 között

Szükséges, de nem biztosított anyagok

Kiegészítő reagensek

- Etanol (96–100%-os)*

Fogyóeszközök

- Pipetták† és pipettahegyek (a keresztszennyeződés megelőzése érdekében erősen javasolt aeroszol elleni gáttal ellátott pipettahegyek használata)
- Egyszer használatos kesztyű

Eszközök

- Fűtőblokk† a minták 56 °C-on (1,5 ml mikrotesztcsövekben) végzett lizálásához
- Mikrocentrifuga†
- Mérőhenger (50 ml)
- Vortex keverő

Kizárólag vákuumos eljárás esetén szükséges anyagok

- QIAvac 24 Plus (katalógusszám: 19413) vagy ezzel egyenértékű† vákuumrendszer
- VacValves vákuumszelepek (katalógusszám: 19408)
- QIAvac Connecting System csatlakozórendszer (katalógusszám: 19419)
- Vacuum Pump vákuumszivattyú (katalógusszám: 84020)
- Vacuum Regulator vákuumszabályozó (katalógusszám: 19530)

* Ne használjon denaturált alkoholt; a denaturált alkohol más anyagokat, például metanolt vagy metil-etil-ketont is tartalmaz.

† Annak biztosítása érdekében, hogy a minták QIAamp DSP DNA Blood Mini eljárással történő feldolgozása megfelelően menjen végbe, hangsúlyozottan ajánlott az eszközök (pl. pipetták és fűtőblokkok) ellenőrzése és kalibrálása a gyártó ajánlásai szerint.

Kizárólag automatizált eljárás esetén szükséges anyagok

- QIAcube Connect MDx készülék (katalógusszám: 9003070)*
- Rotor Adapter rotoradapterek (katalógusszám: 990394)
- Rotor Adapter Holder rotoradapter-tartó (katalógusszám: 990392)
- Sample Tubes CB mintacsövek (katalógusszám: 990382; mintabeviteli cső)
- Shaker Rack Plug csatlakozók rázógéptartóállványhoz (katalógusszám: 9017854)
- Reagent Bottles reagenspalackok, 30 ml (katalógusszám: 990393)
- Filter Tips szűrős pipettahegyek, 1000 µl (katalógusszám: 990352)
- Filter Tips szűrős pipettahegyek, 200 µl (katalógusszám: 990332)
- SafeSeal Tube cső, 1,5 ml (Sarstedt[®], katalógusszám: 72.706)

* Annak biztosítása érdekében, hogy a minták QIAamp DSP DNA Blood Mini eljárással történő feldolgozása megfelelően menjen végbe, hangsúlyozottan ajánlott az eszközök (pl. pipetták és fűtőblokkok) ellenőrzése és kalibrálása a gyártó ajánlásai szerint.

Figyelmeztetések és óvintézkedések


Tartsa szem előtt, hogy szükséges lehet a vonatkozó helyi előírásoknak megfelelően az eszközzel összefüggésben fellépő súlyos balesetek jelentése a gyártó és/vagy hivatalos képviselője, valamint a felhasználó és/vagy a beteg tartózkodási helye szerinti illetékes szabályozó hatóság felé.

In vitro diagnosztikai használatra.

A kit használata előtt figyelmesen olvassa el az összes utasítást.

Biztonsági információk

Vegyszerhasználat során mindig viseljen megfelelő laboratóriumi köpenyt, egyszer használatos kesztyűt és védőszemüveget. További információkat a megfelelő biztonsági adatlapok (Safety Data Sheets, SDS) tartalmazzák. Ezek elérhetők online, a www.qiagen.com/safety weboldalon, jól kezelhető, kompakt PDF formátumban; a weboldalon megtalálható, megtekinthető és kinyomtatható az egyes QIAGEN kitek és kitekben található összetevők biztonsági adatlapja.

FIGYELEM 	SOHA NE adjon hipót vagy savat tartalmazó oldatot közvetlenül a minta-előkészítés hulladékához.
--	---

- A lízispuffer (AL) és az 1. mosópuffer (AW1) guanidin-hidrokloridot tartalmaz, amely hipóval keverve rendkívül reakcióképes vegyületeket képezhet. Ha ilyen puffereket tartalmazó folyadék ömlik ki, takarítsa fel megfelelő laboratóriumi tisztítószerrel és vízzel. Ha potenciálisan fertőző anyagot tartalmazó folyadék ömlik ki, először tisztítsa meg az érintett felületet laboratóriumi tisztítószerrel és vízzel, majd 1%-os (v/v) nátrium-hipoklorittal. Ha a pufferes palackok megsérülnek vagy tartalmuk szivárog, a palackok ártalmatlanítása során az Önt és másokat fenyegető személyi sérülések elkerülése érdekében viseljen kesztyűt és védőszemüveget.

- A QIAGEN nem vizsgálta, hogy a QIAamp DSP DNA Blood Mini eljárások során keletkező folyékony hulladék tartalmaz-e fertőző anyagmaradványt. A folyékony hulladék fertőző anyagmaradvánnyal való szennyeződése valószínűtlen, de teljes mértékben nem kizárható esemény. Ebből kifolyólag a folyékony hulladék fertőző anyagnak tekintendő, így kezelése és ártalmatlanítása során a helyi biztonsági előírásoknak megfelelően kell eljárni.
- A vizsgálati minták potenciálisan fertőzők. A mintákat és az assay során képződő hulladékokat a helyi biztonsági eljárásoknak megfelelően kell ártalmatlanítani.

Vészhelyzeti információk

CHEMTREC

USA és Kanada: 1-800-424-9300

Az USA-n és Kanadán kívül: +1 703-527-3887

Óvintézkedések

A QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit összetevőire az alábbi H és P mondatok vonatkoznak.

Buffer AL



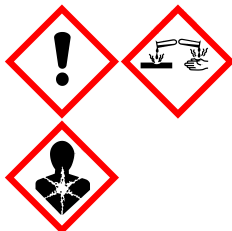
Guanidin-hidrokloridot és maleinsavat tartalmaz. Vigyázat! Lenyelve vagy belélegezve ártalmas lehet. Bőrirritáló hatású. Allergiás bőrreakciót válthat ki. Súlyos szemirritációt okoz. Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő használata kötelező. Rosszullét esetén forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ vagy orvoshoz. Bőrirritáció vagy kiütések megjelenése esetén: orvosi ellátást kell kérni. A szennyezett ruhát le kell vetni és az újbóli használat előtt ki kell mosni. Az anyagot és a tartályát hulladékként, jóváhagyott hulladékkezelő létesítményben kell elhelyezni.

Buffer AW1



Guanidin-hidrokloridot tartalmaz. Vigyázat! Lenyelve vagy belélegezve ártalmas. Bőrirritáló hatású. Súlyos szemirritációt okoz. Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő használata kötelező. A szennyezett ruhát le kell vetni és az újbóli használat előtt ki kell mosni. Az anyagot és a tartályát hulladékként, jóváhagyott hulladékkezelő létesítményben kell elhelyezni.

QIAGEN Protease



Szubtilizint tartalmaz. Veszély! Lenyelve ártalmas. Bőrirritáló hatású. Súlyos szemkárosodást okoz. Belélegezve allergiás és asztmás tüneteket, és nehéz légzést okozhat. Légúti irritációt okozhat. Kerülje a por/füst/gáz/köd/gőzök/permet belégzését. Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő használata kötelező. Légzésvédelem használata kötelező. SZEMBE KERÜLÉS ESETÉN: Óvatos öblítés vízzel több percen keresztül. Adott esetben kontaktlencsék eltávolítása, ha könnyen megoldható. Az öblítés folytatása. Expozíció vagy annak gyanúja esetén: Azonnal forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ vagy orvoshoz. Az érintett személyt friss levegőre kell vinni, és olyan nyugalmi testhelyzetbe kell helyezni, hogy könnyen tudjon lélegezni.

Ártalmatlanítás

A hulladék mintákat és reagenseket tartalmaz. A hulladék toxikus és fertőző anyagokat tartalmazhat, ezért ártalmatlanítását megfelelően kell elvégezni. A helyes hulladékkezelési eljárások tekintetében olvassa el a helyi biztonsági előírásokat.

További információkat a megfelelő biztonsági adatlapok (Safety Data Sheets, SDS) tartalmaznak. Ezek PDF-formátumban elérhetők online a www.qiagen.com/safety címen, ahol megtalálhatja, megtekintheti és kinyomtathatja a minden egyes QIAGEN kithoz és annak komponenseihez tartozó biztonsági adatlapokat (Safety Data Sheet, SDS).

A reagensek tárolása és kezelése

Vegye figyelembe a dobozon és az egyes összetevők címkéjén feltüntetett lejárati időt és tárolási körülményeket. Ne használjon lejárt szavatosságú vagy helytelenül tárolt összetevőket.

A QIAamp Mini spin oszlopokat az átvételüktől kezdve 2–8 °C-on kell tárolni, és az oszlopok a kit dobozán feltüntetett lejárati dátumig használhatók.

Megjegyzés: Annak biztosítása érdekében, hogy ne keveredjenek a különböző kitekből származó komponensek, jelölje meg a QIAamp Mini spin oszlopokat a megfelelő kit tételszámával.

Minden puffer szobahőmérsékleten (15–25 °C-on) tárolható a kit dobozán feltüntetett lejárati dátumig.

A liofilizált QIAGEN Protease (QP) szobahőmérsékleten (15–25 °C) tárolható a kit lejárati dátumáig anélkül, hogy romlana a teljesítménye.

Felbontás után stabilitás

A feloldott QIAGEN Protease (QP) 2–8 °C-on tárolva akár 1 évig, de legfeljebb a kit lejárati dátumáig tekinthető stabilnak. A QIAGEN Protease (QP) törzsoldatot nem szabad hosszabb ideig szobahőmérsékleten tartani.

Az előkészített 1. mosópuffer (AW1) és az előkészített 2. mosópuffer (AW2) szobahőmérsékleten (15–25 °C) tárolva legfeljebb 1 évig, vagy a kit lejárati dátumáig tekinthető stabilnak.

Az automatizált eljáráshoz használt pufferek előkészítése során kövesse a *QIAcube Connect MDx* felhasználói kézikönyvben leírt utasításokat (a kézikönyv a www.qiagen.com weboldalon az adott termék oldalának termékdokumentációs lapfűlén érhető el).

Mintavétel, -tárolás és -kezelés

Megjegyzés: A minták stabilitása nagymértékben függ különféle tényezőktől, és összefügg az adott downstream alkalmazással. Ezt szabályszerűen elvégzett downstream alkalmazásokkal értékelték. A felhasználó felelőssége, hogy elolvassa a laboratóriumban használt adott downstream alkalmazás használati útmutatóját, és/vagy validálja a teljes munkafolyamatot a megfelelő tárolási feltételek megállapításához.

Az általános mintavételi, -szállítási és -tárolási javaslatokat lásd a jóváhagyott CLSI MM13-A irányelvben: „Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods” (Molekuláris módszerekhez használandó minták levétele, szállítása, előkészítése és tárolása). Ezenkívül a minták előkészítése, tárolása, szállítása és általános kezelése során be kell tartani a kiválasztott mintavételi eszközre vonatkozó gyártói utasításokat. A vérvételi cső gyártójának utasításaitól függetlenül a vénás teljes vérből végzett genomiális DNS-extrakció során figyelembe kell venni az ISO 20186-2:2019 (E) szabvány utasításait.

Megjegyzés: Az ISO 20186-2:2019(E) értelmében a vérvételi csövekből származó heparin befolyásolhatja az izolált nukleinsavak tisztaságát, és az eluátumba való esetleges átkerülése néhány downstream alkalmazás esetében gátlást eredményezhet. Ezért az EDTA vagy citrát antikoagulánsal kezelt vérminták használatát javasoljuk.

Friss vérminták elsődleges csövekben történő alkalmazása esetén keverje össze alaposan a vérmintákat (pl. a csövek többszöri megfordításával) a minta átvitele előtt. A (legfeljebb 3 fagyasztási/felolvasztási ciklusnak kitett) fagyasztott mintákat az eljárás megkezdése előtt 37 °C-os vízfürdőben gyorsan ki kell olvasztani, eközben az alapos elkeveredés érdekében enyhe mozgatás szükséges, majd a mintákat szobahőmérsékletre kell hozni (15–25 °C). Ne használjon több mint 3-szor lefagyasztott és felolvasztott vérmintát. A megbízható mintaátvitel érdekében kerülje a hab kialakulását a mintacsövekben. Próbálja meg elkerülni a vérrögök kialakulását a mintákban, és a mintát vérrögök nélkül mérje át. A fagyasztott minták kiolvasztása során képződő krioprecipitátumok eltömítik a QIAamp Mini spin oszlop membránját, vagy problémát okozhatnak a QIAcube Connect MDx készüléken végzett automatizált eljárás során. Nem szabad felszívni a látható krioprecipitátumokat.

A hozam és a tisztított DNS minősége a vér tárolási körülményein múlik. A frissebb vérminták jobb eredményeket hozhatnak. Legfeljebb 10 napos, rövid távú tároláshoz 2–8 °C-os hőmérséklet javasolt. Azonban a maximális fragmentumméretet igénylő alkalmazásokhoz, mint például a southern blot eljárás, csupán legfeljebb 3 napig javasoljuk a 2–8 °C-on történő tárolást, mivel ezt követően kismértékű DNS-bomlás lép fel. Hosszú távú tároláshoz (több mint 10 nap) a vért standard antikoagulánst (lehetőség szerint EDTA-t, ha nagy molekulatömegű DNS-re van szükség) tartalmazó csövekbe gyűjtse, és tárolja –20 °C-on vagy –80 °C-on.

Fontos megjegyzések

A protokoll megkezdése előtt figyelembe veendő fontos szempontok

- A kit átvételét követően ellenőrizze a kit összetevőinek épségét. Ha a buborékcsomagolások vagy a pufferes palackok sérültek, lépjen kapcsolatba a QIAGEN műszaki ügyfélszolgálatával vagy a helyi forgalmazóval. Folyadék kiömlése esetén lásd „Biztonsági információk” (15. oldal). Tilos felhasználni a kit sérült összetevőit, mivel a használatuk csökkentheti a kit teljesítőképességét.
- Az egyes folyadékátvitel között mindig cseréljen pipettahegyet. A keresztszennyeződés esélyének minimalizálása érdekében aeroszol elleni gáttal ellátott pipettahegyek használata javasolt.
- A teljes eljárás alatt használjon egyszer használatos kesztyűket, és rendszeresen ellenőrizze, hogy nem szennyeződtek-e mintaanyaggal. A szennyezett kesztyűket dobja el.
- A keresztszennyeződés esélyének minimalizálása érdekében egyszerre csak egy tesztcsövet nyisson ki.
- Az összes pulzáló vortexelési lépés végrehajtását követően a fedelek belső felületén található cseppek eltávolításához röviden centrifugálja a mikrocentrifuga-csőveket. A felhasználónak ügyelnie kell arra, hogy a minták nyomon követhetősége a teljes eljárás során megmaradjon.
- Minden centrifugálási lépés szobahőmérsékleten (15–25 °C-on) végzendő.
- Az aktuálisan használt kittel ne használjon más kitből származó összetevőket, hacsak nem egyezik meg a két kit tételszáma.
- Kerülje a kit reagenseinek mikrobiális szennyeződését.
- A potenciálisan fertőző anyagok által okozott fertőzési kockázat minimalizálása érdekében a minták lizálási lépésének befejezéséig javasolt lamináris légáramlás mellett dolgozni.
- A kitet csak az in vitro diagnosztikai laboratóriumi gyakorlat terén képzett személyzet használhatja.

A reagensek és a pufferek előkészítése

- A QIAGEN Protease előkészítése

A liofilizált QIAGEN Protease (QP) tartalmú üveghez adjon 1,2 ml proteáz oldószert (PS), és óvatosan keverje őket össze. A habképződés elkerülése érdekében az üveg többszöri átfordításával végezze a keverést. Gondoskodjon arról, hogy a QIAGEN Protease (QP) teljesen feloldódjon.

Fontos: Ne adjon QIAGEN Protease (QP) enzimet közvetlenül a lízispufferhez (AL).

- A 1. mosópuffer előkészítése

Egy mérőhenger segítségével adjon 25 ml (96–100%-os) etanolt a 19 ml 1. mosópuffer (AW1) koncentrátumot tartalmazó üveghez. Az előkészített 1. mosópuffert (AW1) szobahőmérsékleten (15–25 °C) tárolja.

Fontos: Az eljárás megkezdése előtt a palackot többször átfordítva mindig keverje össze az előkészített 1. mosópuffert (AW1).

- A 2. mosópuffer előkészítése

Egy mérőhenger segítségével adjon 30 ml (96–100%-os) etanolt a 13 ml 2. mosópuffer (AW2) koncentrátumot tartalmazó üveghez. Az előkészített 2. mosópuffert (AW2) szobahőmérsékleten (15–25 °C) tárolja.

Fontos: Az eljárás megkezdése előtt a palackot többször átfordítva mindig keverje össze az előkészített 2. mosópuffert (AW2).

- Az eluáló puffer előkészítése

A kithoz egy palack eluáló puffer (AE) tartozik. Az eluáló puffer (AE) szennyeződésének megelőzése érdekében az eluáló puffer (AE) palackból való kipipettázása során javasolt aeroszol elleni gáttal ellátott pipettahegyeket használni, majd utána azonnal visszahelyezni a palack kupakját.

Fontos: Az eluáló puffer (AE) nátrium-azid tartósítószeret tartalmaz, amely 260 nm-en mutat abszorbanciát. Emiatt amikor az eluátumban lévő DNS mennyiségi meghatározását végzik abszorbanciaméréssel 260 nm-en, amikor az eluátumban lévő DNS tisztaságának meghatározását végzik abszorbanciaméréssel 260 nm-en vagy 280 nm-en, vagy amikor az abszorbanciát vizsgálják a 220 nm és 350 nm közötti tartományban, akkor biztosítani kell, hogy a vakminta az eluátummal azonos koncentrációban tartalmazzon nátrium-azidot. Ha például az eluátum abszorbanciamérésekhez való előkészítése során 50 µl eluátumot 100 µl vízzel hígítanak, a vakminta előkészítése során 50 µl eluáló puffert (AE) 100 µl vízzel kell hígítani. Hígításhoz friss desztillált vizet használjon.

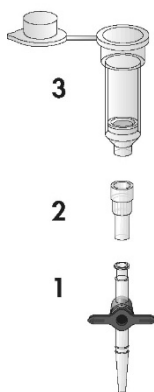
A QIAamp Mini spin oszlopok kezelése

A nukleinsav-amplifikációs technológiák szenzitivitása miatt az alábbi óvintézkedések szükségesek a QIAamp Mini spin oszlopok kezelésekor az előkészített minták közötti keresztszennyeződés elkerülése érdekében:

- Óvatosan vigye fel a mintát vagy az oldatot a QIAamp Mini spin oszlopra. Pipettázza a mintát a QIAamp Mini spin oszlopra anélkül, hogy benedvesítené az oszlop peremét.
- Ne érjen a pipetta hegyével a QIAamp Mini spin oszlop membránjához.
- Egyszerre csak egy QIAamp Mini spin oszlopot nyisson ki, és ügyeljen arra, hogy ne képződjenek aeroszol részecskék.

A QIAvac 24 Plus vákuumrendszer összeállítása

Gondoskodjon a QIAamp Mini spin oszlop, a VacConnector vákuumos csatlakozó (VC) és a VacValve vákuumszelep megfelelő összeállításáról (lásd 2. ábra).



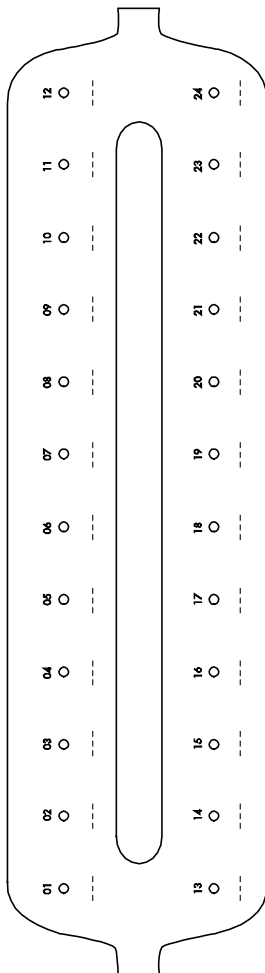
2. ábra: A QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit összetevőinek összeszerelése a minták vákuumos feldolgozásához. (1) VacValve vákuumszelep, (2) VacConnector vákuumos csatlakozó (VC) és (3) QIAamp Mini spin oszlop.

A vákuumos eljárás QIAvac 24 Plus vákuumrendszerrel történő elvégzése esetén a minták felcserélésének elkerülése érdekében javasolt az 3. ábrán bemutatott séma alapján elvégezni a líziscsövek (LT), az elúciós csövek (ET) és a QIAamp Mini spin oszlopok címkézését. Ez az ábra lefénymásolható, és felírható rá a minták nevei. A spin oszlopos eljárás vagy más vákuumrendszerek alkalmazása esetén hasonló séma alkalmazása javasolt.

Dátum: _____

Kezelő: _____

Futtatási azonosító: _____



3. ábra: A liziscövek (LT), az elúciós csövek (ET) és a QIAamp Mini spin oszlopok feliratozási sémája a QIAvac 24 Plus vákuumrendszeren való használathoz.

Eljárás

Protokoll: Genomiális DNS vérmintákból történő izolálása és tisztítása mikrocentrifuga / QIAcube Connect MDx készüléken végzett automatizált tisztítás segítségével

Genomiális DNS 200 µl, EDTA-val vagy citráttal kezelt teljes vérből történő izolálásához és tisztításához mikrocentrifuga, vagy automatizált izolálásához és tisztításához QIAcube Connect MDx készülék használatával.

A kezdés előtt figyelembe veendő fontos szempontok


- Az alábbi eljárás egyetlen vérmintára vonatkozó utasításokat tartalmaz. Ugyanakkor több minta párhuzamos feldolgozása is elvégezhető; e minták maximális száma az alkalmazott mikrocentrifuga kapacitásától függ.
- 2–10 vagy 12 minta automatizált feldolgozása végezhető a QIAcube Connect MDx készüléken.
- Az automatizáláshoz kövesse a felhasználói felületen (QIAcube Connect MDx) megjelenő utasításokat, és olvassa el a *QIAcube Connect MDx felhasználói kézikönyvet* (a kézikönyv www.qiagen.com weboldalon az adott termék oldalának termékdokumentációs lapjúlén érhető el).




Teendők az eljárás megkezdése előtt

- Hagyja a vérmintákat szoba-hőmérsékletűre melegedni, és gondoskodjon arról, hogy jól össze legyenek keverve.
- Gondoskodjon arról, hogy minden reagens és a (lezárt buborékcsomagolásban lévő) QIAamp Mini spin oszlopok szobahőmérsékletre melegedjenek.

- Állítsa be az egyik fűtőblokkot 56 °C-ra a 4. lépésben történő felhasználáshoz (manuális eljárás esetén, illetve ha automatizált eljárást használ a készüléken kívül végrehajtott manuális lízissel).
- Gondoskodjon arról, hogy az 1. mosópuffer (AW1), a 2. mosópuffer (AW2) és a QIAGEN Protease (QP) a következőkben foglalt utasításoknak megfelelően legyen előkészítve: „A reagensek és a pufferek előkészítése”, 22. oldal.
- Ha precipitátum képződött a lízispufferben (AL), 56 °C-on inkubálva oldja fel.
- A minőség-ellenőrzési eljárás részeként a QIAGEN a forgalomba hozatal előtt mindegyik kit-tételnél funkcionális vizsgálatokat végez. Emiatt nem szabad a különböző kit-tételekhez tartozó reagenseket összekeverni, vagy a különböző reagenstételekhez tartozó reagenseket kombinálni.


Eljárás

- A mikrocentrifugával végzett manuális eljáráshoz kövesse az 1–15. lépést.
 - Ez az eljárás 3 különböző módon automatizálható:
 - Elúciós térfogat: 100 µl, teljesen automatizált (az automatizálás az 1. lépésnél kezdődik)
 - Elúciós térfogat: 200 µl, teljesen automatizált (az automatizálás az 1. lépésnél kezdődik)
 - Manuális lízálás: részben automatizált, készüléken kívül végrehajtott manuális lízissel, 10 µl-es lépésekben alkalmazott 100–200 µl elúciós térfogattal (az automatizálás az 5. lépés után kezdődik)
1. Pipetázzon 20 µl QIAGEN Protease (QP) enzimet egy líziscsőbe (LT).
 -  Felhasználás előtt ellenőrizze az előkészített proteáz lejárati dátumát.
 2. Mérjen 200 µl vérmintát a líziscsőbe (LT).
 3. Adjon 200 µl lízispuffert (AL) a líziscsőhöz (LT), zárja le a fedelét, majd pulzáló vortexeléssel keverje \geq 15 másodpercig.

-  A hatékony lízis biztosítása érdekében elengedhetetlen, hogy a minta és a lízispuffer (AL) alaposan elkeveredjen, és homogén oldatot képezzen.
-  Mivel a lízispuffer (AL) magas viszkozitású folyadék, óvatos pipettázással vagy alkalmas pipetta használatával biztosítsa a megfelelő térfogatú lízispuffer (AL) hozzáadását.
-  Ne adjon QIAGEN Protease (QP) enzimet közvetlenül a lízispufferhez (AL).

4. Inkubálja 56 °C-on 10 percig.


5. A fedél belső felületére került cseppek eltávolításához maximális sebességgel centrifugálja a líziscövet (LT) ≥ 5 másodpercig.

-  Ha a manuális lízis (1–5. lépés) a készüléken kívül került végrehajtásra, az alábbi lépések (6–15. lépés) a manuális lízisre vonatkozó protokoll szerint automatizálhatók a QIAcube Connect MDx készüléken.


6. Adjon 200 μ l (96–100%-os) etanolt a líziscsőhöz (LT), zárja le a fedelét, majd pulzáló vortexeléssel keverje ≥ 15 másodpercig.

7. A fedél belső felületére került cseppek eltávolításához maximális sebességgel centrifugálja a líziscövet (LT) ≥ 5 másodpercig.

8. A perem benedvesítése nélkül óvatosan vigye fel a 7. lépés során keletkezett lízátnak teljes mennyiségét a QIAamp Mini spin oszlopra. Ne érjen a pipetta hegyével a QIAamp Mini spin oszlop membránjához.

-  Több minta párhuzamos feldolgozása esetén egyszerre csak egy líziscövet (LT) nyisson ki.

9. Zárja le a QIAamp Mini spin oszlop fedelét, és körülbelül 6000 x g mellett centrifugálja 1 percig. Helyezze a QIAamp Mini spin oszlopot egy tiszta mosócsőbe (WT), és dobja el a filtrátumot tartalmazó csövet.

-  Ha a lízátnak 6000 x g (8000 rpm) mellett végzett centrifugálás esetén nem szívódott át teljesen a membránon, maximális sebességgel (legfeljebb 20 800 x g) ismétlje meg a centrifugálást 1 percig.



Ha a lizátum a centrifugálás során sem szívódik át a membránon, dobja el a mintát, majd a 27. oldalon található 1. lépéstől kezdve ismételve meg az izolálási és tisztítási lépéseket egy új mintával.

10. Óvatosan nyissa fel a QIAamp Mini spin oszlop fedelét, és a perem benedvesítése nélkül vigyen fel 500 µl 1. mosópuffert (AW1). Ne érjen a pipetta hegyével a QIAamp Mini spin oszlop membránjához.
11. Zárja le a QIAamp Mini spin oszlop fedelét, és körülbelül 6000 x g mellett centrifugálja 1 percig. Helyezze a QIAamp Mini spin oszlopot egy tiszta mosócsőbe (WT), és dobja el a filtrátumot tartalmazó csövet.
12. Óvatosan nyissa fel a QIAamp Mini spin oszlop fedelét, és a perem benedvesítése nélkül vigyen fel 500 µl 2. mosópuffert (AW2). Ne érjen a pipetta hegyével a QIAamp Mini spin oszlop membránjához.
13. Zárja le a QIAamp Mini spin oszlop fedelét, és maximális sebességgel (kb. 20 000 x g vagy 14 000 rpm) centrifugálja 1 percig. Helyezze a QIAamp Mini spin oszlopot egy tiszta mosócsőbe (WT), és dobja el a filtrátumot tartalmazó csövet.

A membrán teljes megszáritásához maximális sebességgel (kb. 20 000 x g vagy 14 000 rpm) centrifugálja 3 percig.



A szárazra centrifugálás lépésének elmulasztása a további assay-k gátlásához vezethet.

14. Helyezze a QIAamp Mini spin oszlopot egy új elúciós csőbe (ET), és dobja el a filtrátumot tartalmazó mosócsövet (WT). Óvatosan nyissa fel a QIAamp Mini spin oszlop fedelét, és vigyen fel 50–200 µl eluáló puffert (AE) a membrán közepére.



Fontos az új elúciós cső használata, mivel a maradék mosópufferek okozta szennyeződés a downstream assay gátlásához vezethet.



Kis elúciós térfogatok esetében különösen fontos, hogy az eluáló puffert (AE) a membrán közepére adagolja, mert ezáltal garantálható a nukleinsavak és az eluáló puffer (AE) optimális kinyerése.

15. Zárja le a fedelet, majd szobahőmérsékleten inkubálja 1 percig. A DNS eluálásához centrifugálja 1 percig körülbelül 6000 x g (8000 rpm) mellett.



Az elúciós csövek kupakjait a rotor forgásával ellentétes irányba állítsa be (pl. ha a rotor az óramutató járásával megegyező irányban forog, a kupakokat az óramutató járásával ellentétes irányba állítsa).



A teljes eljárás automatizálása esetén a futtatás befejezését követően azonnal távolítsa el az eluátumokat a készülékből, majd tárolja őket megfelelően.

Protokoll: Genomiális DNS vérmintákból történő izolálása és tisztítása vákuumrendszer segítségével

Genomiális DNS 200 µl, EDTA-val vagy citráttal kezelt teljes vérből történő izolálásához és tisztításához a QIAvac 24 Plus vákuumrendszerhez hasonló vákuumrendszer használatával.





A kezdés előtt figyelembe veendő fontos szempont

Az alábbi eljárás egyetlen vérmintára vonatkozó utasításokat tartalmaz. Ugyanakkor akár 24 minta feldolgozása is elvégezhető egyszerre a QIAvac 24 Plus vákuumrendszer segítségével.

Teendők az eljárás megkezdése előtt

- Hagyja a vérmintákat szoba-hőmérsékletűre melegedni, és gondoskodjon arról, hogy jól össze legyenek keverve.
- Gondoskodjon arról, hogy minden reagens és a (lezárt buborékcsomagolásban lévő) QIAamp Mini spin oszlopok szobahőmérsékletre melegedjenek.
- A 4. lépésnél leírt művelethez állítson egy fűtőblokkot 56 °C-ra.
- Gondoskodjon arról, hogy az 1. mosópuffer (AW1), a 2. mosópuffer (AW2) és a QIAGEN Protease (QP) a következőkben foglalt utasításoknak megfelelően legyen előkészítve: „A reagensek és a pufferek előkészítése”, 22. oldal.
- Ha precipitátum képződött a lízispufferben (AL), 56 °C-on inkubálva oldja fel.
- A keresztszennyeződés esélyének minimalizálása érdekében vezessen egy VacConnector vákuumos csatlakozót (VC) a vákuumrendszer minden Luer-záras adapterébe.
- Győződjön meg arról, hogy a vákuumrendszer hulladékgyűjtő palackja üres, és hogy minden csatlakozó megfelelően csatlakozik.
- A vákuumrendszer működtetésével, elsősorban a karbantartással kapcsolatos részletek a mellékelt kézikönyvben találhatóak.
- A minőség-ellenőrzési eljárás részeként a QIAGEN a forgalomba hozatal előtt mindegyik kit-tételnél funkcionális vizsgálatokat végez. Emiatt nem szabad a különböző kit-tételekhez tartozó reagenseket összekeverni, vagy a különböző reagenstételekhez tartozó reagenseket kombinálni.

Eljárás


1. Pipetázzon 20 µl QIAGEN Protease (QP) enzimet egy líziscsőbe (LT).
 -  Felhasználás előtt ellenőrizze az előkészített proteáz lejárati dátumát.
2. Mérjen 200 µl vérmintát a líziscsőbe (LT).
3. Adjon 200 µl lízispuffert (AL) a líziscsőhöz (LT), zárja le a fedelét, majd pulzáló vortexeléssel keverje ≥ 15 másodpercig.
 -  A hatékony lízis biztosítása érdekében elengedhetetlen, hogy a minta és a lízispuffer (AL) alaposan elkeveredjen, és homogén oldatot képezzen.
 -  Mivel a lízispuffer (AL) magas viszkozitású folyadék, óvatos pipetázással vagy alkalmas pipetta használatával biztosítsa a megfelelő térfogatú lízispuffer (AL) hozzáadását.
 -  Ne adjon QIAGEN Protease (QP) enzimet közvetlenül a lízispufferhez (AL).
4. Inkubálja 56 °C-on 10 percig.
5. A fedél belső felületére került cseppek eltávolításához maximális sebességgel centrifugálja a líziscsövet (LT) ≥ 5 másodpercig.
6. Adjon 200 µl (96–100%-os) etanolt a líziscsőhöz (LT), zárja le a fedelét, majd pulzáló vortexeléssel keverje ≥ 15 másodpercig.
7. A fedél belső felületére került cseppek eltávolításához maximális sebességgel centrifugálja a líziscsövet (LT) ≥ 5 másodpercig.

8. Helyezze be a QIAamp Mini spin oszlopot a vákuumrendszer VacConnector vákuumos csatlakozójába (VC). Gondoskodjon arról, hogy a (vákuumrendszer és a vákuumos elosztócső között található) fő vákuumszelep és a (vákuumos elosztócsövön található) csavaros kupak szelepe zárva legyen. Kapcsolja be a vákuumszivattyút.

Dobja el a mosócsövet (WT) (2 ml), amelyben a QIAamp Mini spin oszlop megtalálható volt a buborékcsomagolásban.


A vákuum kizárólag a csatlakozórendszerre hat (ha használnak ilyet), a vákuumos elosztócsövére nem.


9. A perem benedvesítése nélkül óvatosan vigye fel a 7. lépés során keletkezett lizátum teljes mennyiségét a QIAamp Mini spin oszlopra. Ne érjen a pipetta hegyével a QIAamp Mini spin oszlop membránjához.


 Több minta párhuzamos feldolgozása esetén egyszerre csak egy líziscövet (LT) nyisson ki.

10. Nyissa ki a fő vákuumszelepet. Miután a lizátum átszívódott a QIAamp Mini spin oszlopon, zárja le a fő vákuumszelepet, és az elosztócsőben lévő vákuum megszüntetéséhez nyissa ki a vákuumos elosztócsövön lévő csavaros kupak szelepét. Miután a vákuum megszűnt az elosztócsőben, zárja le a csavaros kupak szelepét.

A fő vákuumszelep elzárását követően a vákuum kizárólag a csatlakozórendszerre hat (ha használnak ilyet), a vákuumos elosztócsőre nem.

 A vákuumos elosztócsövön található csavaros kupak szelepével gyorsan megszüntethető a vákuum.

 Több QIAamp Mini spin oszlop párhuzamos feldolgozása esetén a vákuumos lépés időtartamának csökkentése érdekében javasolt elzárni minden egyes oszlop VacValve vákuumszelepét a lizátum átszívódását követően.

 Ha a lizátum 10 perc elteltével sem szívódik át teljes mértékben a membránon, helyezze a QIAamp Mini spin oszlopot egy tiszta mosócsőbe (WT), zárja le a fedelét, és centrifugálja 6000 x g (8000 rpm) mellett 3 percig vagy a lizátum teljes átszívódásáig. Helyezze a QIAamp Mini spin oszlopot egy másik tiszta mosócsőbe (WT), és folytassa a protokoll 33. oldalán található 10. lépésével.



Ha a lizátum a centrifugálás során sem szívódik át a membránon, dobja el a mintát, majd a 32. oldalon található 1. lépéstől kezdve ismétlje meg az izolálási és tisztítási lépéseket egy új mintával.

11. A perem benedvesítése nélkül vigyen fel 750 µl 1. mosópuffert (AW1) a QIAamp Mini spin oszlopra. Ne érjen a pipetta hegyével a QIAamp Mini spin oszlop membránjához. Hagyja nyitva az oszlop fedelét, és nyissa ki a fő vákuumszelepet. Miután az 1. mosópuffer (AW1) áthatolt a QIAamp Mini spin oszlopon, zárja le a fő vákuumszelepet, és az elosztócső átszellőztetéséhez nyissa ki a csavaros kupak szelepet. Miután a vákuum megszűnt az elosztócsőben, zárja le a csavaros kupak szelepet.
12. A perem benedvesítése nélkül vigyen fel 750 µl 2. mosópuffert (AW2) a QIAamp Mini spin oszlopra. Ne érjen a pipetta hegyével a QIAamp Mini spin oszlop membránjához. Hagyja nyitva az oszlop fedelét, és nyissa ki a fő vákuumszelepet. Miután a 2. mosópuffer (AW2) áthatolt a QIAamp Mini spin oszlopon, zárja le a fő vákuumszelepet, és az elosztócső átszellőztetéséhez nyissa ki a csavaros kupak szelepet. Miután a vákuum megszűnt az elosztócsőben, zárja le a csavaros kupak szelepet.
13. Zárja le a QIAamp Mini spin oszlop fedelét, távolítsa el a vákuumrendszerből, majd dobja el a VacConnector vákuumos csatlakozót (VC). Helyezze a QIAamp Mini spin oszlopot egy tiszta mosócsőbe (WT), és a membrán teljes megszáritásához maximális sebességgel (kb. 20 000 x g vagy 14 000 rpm) centrifugálja 3 percig.



A szárazra centrifugálás lépésének elmulasztása a további assay-k gátlásához vezethet.

14. Helyezze a QIAamp Mini spin oszlopot egy új elúciós csőbe (ET), és dobja el a filtrátumot tartalmazó mosócsövet (WT). Óvatosan nyissa fel a QIAamp Mini spin oszlop fedelét, és vigyen fel 50–200 µl eluáló puffert (AE) a membrán közepére.



Fontos az új elúciós cső (ET) használata, mivel a maradék mosópufferek okozta szennyeződés a downstream assay gátlásához vezethet.

- ① Kis elúciós térfogatok esetében különösen fontos, hogy az eluáló puffert (AE) a membrán közepére adagolja, mert ezáltal garantálható a nukleinsavak és az eluáló puffer (AE) optimális kinyerése.

15. Zárja le a fedelet, majd szobahőmérsékleten inkubálja 1 percig. A DNS eluálásához centrifugálja 1 percig 6000 x g (8000 rpm) mellett.

- ① Az elúciós csövek (ET) kupakjait a rotor forgásával ellentétes irányba állítsa be (pl. ha a rotor az óramutató járásával megegyező irányban forog, a kupakokat az óramutató járásával ellentétes irányba állítsa).

- ① A protokoll befejezését követően végezze el a vákuumrendszerre vonatkozó karbantartási eljárást (további részletek a vákuumrendszerhez mellékelt kézikönyvben találhatóak).

Minőség-ellenőrzés

A QIAGEN ISO-minősített minőségirányítási rendszerének megfelelően minden QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit gyártási tétel esetében ellenőrizzük az előre meghatározott specifikációknak való megfelelést, ezzel biztosítva az állandó termékminőséget.

Korlátozások

A rendszer teljesítménye genomiális DNS teljes vérből történő izolálása során került meghatározásra.

A QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit használatára vonatkozó információkat lásd: „Leírás és működési elv” fejezet. Az automatizált eljárás részletes leírását lásd: „Protokoll: Genomiális DNS vérmintákból történő izolálása és tisztítása mikrocentrifuga / QIAcube Connect MDx készüléken végzett automatizált tisztítás segítségével” fejezet.

A felhasználó felelőssége, hogy validálja a rendszer teljesítményét az adott laboratóriumban alkalmazott bármely olyan eljárásra, amely nem része a QIAGEN teljesítményértékelő vizsgálatoknak.

A diagnosztikai eredményeket negatívan befolyásoló hatások kockázatának minimalizálása érdekében a további alkalmazásokhoz megfelelő kontrollokat kell használni. További validáláshoz javasoljuk az International Conference on Harmonization of Technical Requirements (ICH, Műszaki Követelmények Nemzetközi Harmonizációs Konferenciája) által az ICH Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (Analitikai eljárások validálása: szöveg és módszertan) szerinti irányelveket.

A kapott diagnosztikai eredményeket mindig az egyéb klinikai vagy laboratóriumi leletekkel összefüggésben kell értelmezni.

Teljesítményjellemzők

A vonatkozó teljesítményjellemzők a www.qiagen.com webhelyen, az adott termék oldalának termékdokumentációs lapfűlén érhetők el.

Hibaelhárítási útmutató

Ez a hibaelhárítási útmutató bármely felmerülő hiba esetén segíthet a megoldásban. További információkért kérjük, olvassa el műszaki támogatási oldalunkon a gyakran ismételt kérdéseket: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. A QIAGEN műszaki ügyfélszolgálat kutató szakemberei örömmel állnak rendelkezésére, ha bármilyen kérdése van akár ennek a kézikönyvnek a tartalmával és/vagy a benne szereplő protokollokkal kapcsolatban, akár a mintafeldolgozási és assay módszerekkel kapcsolatban (az elérhetőség a következő címen található: www.qiagen.com).

Megjegyzések és javaslatok

Általános kezelés

- a) A pipettahegyek eldugulása a mintaátvitel során
- A mintaátvitel előtt keverje össze alaposan a vérmintákat (pl. a csövek többszöri megfordításával). A fagyasztott mintákat az eljárás megkezdése előtt 37 °C-os vízfürdőben gyorsan ki kell olvasztani, eközben az alapos elkeveredés érdekében enyhe mozgítás szükséges, majd a mintákat szobahőmérsékletre kell hozni (15–25 °C). Próbálja meg elkerülni a vérrögök kialakulását a mintákban, és a mintát vérrögök nélkül mérje át. A fagyasztott minták kiolvasztása során képződő krioprecipitátumok eltömítik a QIAamp Mini spin oszlop membránját vagy problémát okozhatnak az automatizált eljárás során.
- b) Eltömődött QIAamp Mini spin oszlop
- Spin munkafolyamat:**
- Ha a lizátum 6000 x g (8000 rpm) mellett végzett centrifugálás esetén nem szívódott át teljesen a membránon, maximális sebességgel (legfeljebb 20 800 x g) ismételje meg a centrifugálást 1 percre.
- Ha a lizátum a centrifugálás során sem szívódik át a membránon, dobja el a mintát, majd az 1. lépéstől kezdve ismételje meg az izolálási és tisztítási lépéseket egy új mintával.
- Vákuumos munkafolyamat:**
- Ha az átfolyási ráta csökken, a vákuumszívás ideje megnőhet.
- Alternatív megoldásként zárja el a VacValve vákuumszelepet, ha használta, és óvatosan távolítsa el a VacConnector–VacValve szerelvényt a QIAamp Mini oszlopról anélkül, hogy a lizátumból bármennyit elveszítene.
- Távolítsa el a QIAamp Mini spin oszlopot a vákuumos elosztócsőből, helyezze egy 2 ml-es mosócsőbe, és centrifugálja teljes sebességgel, amíg a minta teljesen át nem hatol a membránon. Helyezze vissza a maradék lizátumot tartalmazó VacConnector–VacValve szerelvényt. Kapcsolja be a vákuumszivattyút, nyissa ki a VacValve vákuumszelepet, és folytassa a maradék lizátum betöltését.
- Ha a QIAamp Mini spin oszlop továbbra is el van dugulva, ismételje meg a fenti eljárást.
- Ha a lizátum a centrifugálás során sem szívódik át a membránon, dobja el a mintát, majd az 1. lépéstől kezdve ismételje meg az izolálási és tisztítási lépéseket egy új mintával.

Megjegyzések és javaslatok

Általános információk

Krioprecipitátumok képződhetnek az ismételt lefagyasztás és felolvasztás miatt. Ezek eltéríthetik a QIAamp Mini spin oszlopot. Ne használjon több mint 3-szor lefagyasztott és felolvasztott vérmintát. A fagyasztott mintákat az eljárás megkezdése előtt 37 °C-os vízfürdőben gyorsan ki kell olvasztani, eközben az alapos elkeveredés érdekében enyhe mozgatás szükséges, majd a mintákat szobahőmérsékletre kell hozni (15–25 °C).

- c) Precipitátum képződött a lízispufferben (AL)
- A feloldáshoz inkubálja a lízispuffert (AL) 56 °C-on.
- d) Változó elúciós térfogatok
- A visszanyert eluátum térfogata függ a minta jellegétől.
- Mivel az eluáló puffer (AE) egy része a spin oszlop membránjában marad a centrifugálás után, a visszanyert eluátum térfogata kevesebb lehet, mint az oszlopra felvitt eluáló pufferé (AE).
- A membrán közepére vigye fel az eluáló puffert (AE). Kis elúciós térfogatok esetében különösen fontos, hogy az eluáló puffert (AE) a membrán közepére adagolja, mert ezáltal garantálható a nukleinsavak és az eluáló puffer (AE) optimális kinyerése.
- e) Nem sikerült elérni a kb. 800–900 mbar vákuumnyomást
- A vákuumos elosztócső nem záródik szorosan. Nyomja le a vákuumos elosztócső fedelét a vákuum bekapcsolása után. Ellenőrizze, hogy sikerült-e elérni a vákuumnyomást. A QIAvac fedél tömítőgyűrűje elhasználódott. Ellenőrizze szabad szemmel, és szükség esetén cserélje ki az elosztócső tömítését.
- A VacValve vákuumszelepek elhasználódtak. Távolítsa el az összes VacValve vákuumszelepet, és közvetlenül a Luer-toldalékokba helyezze be a VacConnector (VC) vákuumcsatlakozókat. Helyezzen be QIAamp Mini spin oszlopokat a VacConnector (VC) vákuumcsatlakozókba, zárja le az oszlopok fedelét, és kapcsolja be a vákuumot. Ellenőrizze, hogy sikerült-e elérni a vákuumnyomást. Szükség esetén cserélje ki a VacValve vákuumszelepeket.
- A vákuumszivattyú csatlakozása szivárog. Dugasolja el az összes Luer-toldalékot Luer-dugókkal, és kapcsolja be a vákuumszivattyút. Ellenőrizze, hogy stabil-e a vákuumnyomás a vákuumszivattyú bekapcsolása után (ha zárva van a Vacuum Regulator szabályozószelepe). Szükség esetén cserélje ki a szivattyú és a vákuumos elosztócső közötti csatlakozóelemeket.
- Ha még így sem sikerült elérni a vákuumnyomást, cserélje ki a vákuumszivattyút egy erősebbre.
- f) Az automatizált munkafolyamatban jelentkező problémák
- Olvassa el a *QIAcube Connect MDx felhasználói kézikönyvet* (a www.qiagen.com weboldalon az adott termék oldalának termékdokumentációs lapján érhető el).

Alacsony DNS-hozam

- a) A minta lízise nem volt teljes
- Ha a QIAGEN Protease (QP) enzimet hosszabb ideig magas hőmérsékletnek tette ki, az veszíthet az aktivitásából. Ismételje meg az eljárást új minták és friss QIAGEN Protease (QP) használatával.
- Gondoskodjon arról, hogy a QIAGEN Protease (QP) enzimet a fenti utasítások szerint oldja fel a proteáz oldószerben (PS). A habképződés elkerülése érdekében az üveg többszöri átfordításával végezze a keverést. Gondoskodjon arról, hogy a QIAGEN Protease (QP) teljesen feloldódjon. Ne adjon QIAGEN Protease (QP) enzimet közvetlenül a lízispufferhez (AL).

Megjegyzések és javaslatok











- A hatékony lízis biztosítása érdekében elengedhetetlen, hogy a minta és a lízispuffer (AL) alaposan elkeveredjen, és homogén oldatot képezzen. Mivel a lízispuffer (AL) magas viszkozitású folyadék, óvatos pipettázással vagy alkalmas pipetta használatával biztosítsa a megfelelő térfogatú lízispuffer (AL) hozzáadását.
- b) Alacsony százaléku etanolt használtak a 96–100%-os töménységű helyett
Ismételje meg a tisztítási eljárást új mintákkal, és 96–100%-os etanollal. Ne használjon denaturált alkoholt; a denaturált alkohol más anyagokat, például metanol vagy metil-etil-ketont is tartalmaz.
- c) A Buffer AW1-et vagy Buffer AW2-t nem megfelelően készítették el
Az eljárás megkezdése előtt győződjön meg arról, hogy a Buffer AW1 és a Buffer AW2 koncentrátumát megfelelő térfogatú 96–100%-os etanollal hígították, és a palack többszöri átfordításával összekeverték.
- d) Nem megfelelően tárolták a vérmintákat
A hozam és a tisztított DNS minősége a vér tárolási körülményein múlik. A frissebb vérminták jobb eredményeket hozhatnak. Legfeljebb 10 napos, rövid távú tároláshoz 2–8 °C-os hőmérséklet javasolt. Azonban a maximális fragmentumméretet igénylő alkalmazásokhoz, mint például a southern blot eljárás, csupán legfeljebb 3 napig javasoljuk a 2–8 °C-on történő tárolást, mivel ezt követően kismértékű DNS-bomlás lép fel. Hosszú távú tároláshoz (több mint 10 nap) a vért standard antikoaguláns (lehetőség szerint EDTA-t, ha nagy molekulatömegű DNS-re van szükség) tartalmazó csövekbe gyűjtse, és tárolja –20 °C-on vagy –80 °C-on.
- e) A fagyasztott vérminták nem voltak jól felkeverve felengedés után
A fagyasztott mintákat az eljárás megkezdése előtt 37 °C-os vízfürdőben gyorsan ki kell olvasztani, eközben az alapos elkeveredés érdekében enyhe mozgítás szükséges, majd a mintákat szobahőmérsékletre kell hozni (15–25 °C).












A kapott DNS nem jól teljesít a downstream reakciókban

- a) Az eluátumban kevés vagy nincs DNS
A lehetséges okokat lásd a fenti „Alacsony DNS-hozam” részben. Ha lehetséges, növelje a reakcióhoz adott eluátum mennyiségét.
- b) Nem megfelelő elúciós térfogatot használt
Határozza meg a downstream alkalmazása számára megfelelő eluátum maximális térfogatát. Ennek megfelelően csökkentse vagy növelje a downstream alkalmazáshoz adott eluátum térfogatát. Az elúciós térfogat arányosan módosítható. A kisebb térfogatú Buffer AE-vel történő elúció koncentráltabb nukleinsav-eluátumokhoz vezet, azonban alacsonyabb teljes hozamot eredményezhet.
- c) Elégtelen DNS-t használtak
Határozza meg a tisztított DNS mennyiségét spektrofotométerrel, a 260 nm-en mért abszorbancia alapján.
- d) Túl sok DNS-t használtak
A túl sok DNS gátolhat bizonyos enzimreakciókat. Határozza meg a tisztított DNS mennyiségét spektrofotométerrel, a 260 nm-en mért abszorbancia alapján.
- e) Lehetséges inhibitor átszennyezés
A downstream assay potenciális gátlásának megelőzése érdekében gondoskodjon arról, hogy száraz centrifugálási lépést végez az elúció előtt. Fontos az új elúciós cső (ET) használata, mivel a maradék mosópufferek okozta szennyeződés a downstream assay gátlásához vezethet.

Szimbólumok

A használati útmutatóban, a csomagoláson és a címkéken a következő szimbólumok szerepelnek:

Szimbólum	Szimbólum definíciója
	<N> reakcióhoz elegendő reagenst tartalmaz
	Lejárat dátum
	Ez a termék megfelel az in vitro diagnosztikai orvostechnikai eszközökre vonatkozó 2017/746 számú európai rendelet követelményeinek.
	In vitro diagnosztikai orvostechnikai eszköz
	Az áru beérkezését követően
	Kézbetűtőkor nyissa ki; a QIAamp Mini spin oszlopokat tárolja 2–8 °C-on
	Katalógusszám
	Tételszám
	Anyagszám (azaz az összetevők címkéje)
	Összetevők

Szimbólum	Szimbólum definíciója
	Tartalom
	Szám
	Globális kereskedelmi áruazonosító szám
Rn	Az R a használati útmutató átdolgozását, az n pedig az átdolgozás számát jelöli
	Hőmérsékleti korlátozás
	Gyártó
	Lásd a használati útmutatót
	Térfogat
	Az etanol palackba töltése után írja rá az aktuális dátumot
	Hozzáadva
	Liofilizált
	Előkészítendő

Szimbólum	Szimbólum definíciója
	Etanol
	Guanidin-hidroklorid
	Szubtilizin
	A következőhöz vezet
	Lásd a használati útmutatót
	Fontos megjegyzés
	Egyedi eszközazonosító

Rendelési információk

Termék	Tartalom	Katalógus-szám
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (50)	50 preparáláshoz: QIAamp Mini Spin oszlopok, pufferek, reagensek, tesztcsövek, VacConnector vákuum-csatlakozók	61104
Kapcsolódó termékek		
QIAcube Connect MDx*	Készülék 1 éves jótállással az alkatrészekre és a kivitelezésre	9003070
Kiegészítők		
QIAvac 24 Plus†	Vákuumos elosztócső 1–24 spin oszlop feldolgozásához: QIAvac 24 Plus Vacuum manifold, Luer-dugók, gyorscsatlakozók	19413
Vacuum Pump (230 V, 50 Hz)†	Univerzális vákuumszivattyú (kapacitás: 34 liter/perc, 8 mbar absz. vákuum)	84020
VacConnectors (500)†	500 db egyszer használatos csatlakozó, QIAamp spin oszlopokhoz és luer-csatlakozókhoz	19407
VacValves (24)	24 szelep a QIAvac 24 és QIAvac 24 Plus készülékekhez	19408
Vacuum Regulator	QIAvac elosztócsövekkel való használatra	19530
QIAvac Connecting System	A vákuumos elosztócsövet és vákuumszivattyút csatlakoztató rendszer tartalma: tálca, hulladékgyűjtő palackok, csövek, csatlakozók, szelep, sablon, 24 db VacValve vákuumszelep	19419

Termék	Tartalom	Katalógus-szám
Rotor Adapters (10 x 24)	240 preparáláshoz: 240 db egyszer használatos rotoradapter és 240 db elúciós cső (1,5 ml); QIAcube Connect MDx készülékkel való használatra	990394
Rotor Adapter Holder	Tartóelem 12 db egyszer használatos rotoradapterhez; QIAcube Connect MDx készülékkel való használatra	990392
Sample Tubes CB (2 ml)	1000 db kúpos aljú, csavaros tetejű, talp nélküli tesztcső (2 ml), QIAcube Connect MDx készülékkel való használatra	990382
Shaker Rack Plugs	Shaker Rack Plug csatlakozók rázógéptartóállványhoz (12 db)	9017854
Reagent Bottles, 30 ml (6)	Reagenspalackok (30 ml) kupakkal; 6-os csomagban; QIAcube Connect MDx készülékkel való használatra	990393
Filter-Tips, 1000 µl (1024)	Egyszer használatos, szűrővel rendelkező hegyek, tartóállványban; (8 x 128). A QIAcube Connect MDx készülékkel való használatra	990352
Filter-Tips, 1000 µl, wide-bore (1024)	Egyszer használatos, széles belső átmérőjű, szűrővel rendelkező hegyek, tartóállványban; (8 x 128); nem szükséges minden protokollhoz. A QIAcube Connect MDx készülékkel való használatra	990452
Filter-Tips, 200 µl (1024)	Egyszer használatos, szűrővel rendelkező hegyek, tartóállványban; (8 x 128). QIAcube Connect MDx és QIASymphony SP/AS készülékkel való használatra	990332

* A QIAcube Connect MDx nem kapható minden országban. További részletekért lépjen kapcsolatba a QIAGEN műszaki ügyfélszolgálatával.

† Vákuumos protokollokkal való használatra.

A licenccel kapcsolatos legfrissebb információk és a termékspecifikus jogi nyilatkozatok a megfelelő QIAGEN kit használati útmutatójában találhatóak. A QIAGEN kitek használati útmutatója a www.qiagen.com webhelyen érhető el, illetve a QIAGEN műszaki ügyfélszolgálatától vagy a területileg illetékes forgalmazótól szerezhető be.

A dokumentum átdolgozási előzményei

Átdolgozás

Leírás

R1, 2022. június

3. verzió, 1. átdolgozás

- Kit 3. verzióra frissítése az IVDR-nek való megfelelés érdekében
- Leírás és működési elv fejezet frissítése
- Szállított anyagok (aktív összetevők hozzáadása) és Szükséges, de nem biztosított anyagok frissítése
- Figyelmeztetések és óvintézkedések fejezet frissítése (vészhelyzeti információk és Ártalmatlanítás rész hozzáadása)
- A reagensek tárolása és kezelése fejezet frissítése
- Mintavétel, -tárolás és -kezelés fejezet frissítése
- Fontos megjegyzések és Eljárás fejezet frissítése
- Korlátozások fejezet frissítése
- Teljesítményjellemzők fejezet frissítése
- Szimbólumok fejezet frissítése
- Rendelési információk frissítése

Ez az oldal szándékosan lett üresen hagyva

Korlátozott licencszerződés a QIAamp DSP DNA Blood Mini Kithez

A termék használatával a termék vásárlója vagy felhasználója elfogadja a következő feltételeket:

1. A terméket kizárólag a hozzá tartozó protokollok és a jelen kézikönyv szerint, valamint a panelhez tartozó összetevőkkel együtt szabad használni. A QIAGEN a szellemi tulajdonát képező termékek egyikének esetében sem engedélyezi, hogy a panelhez tartozó összetevőket a termékhez mellékelte protokollokban, a jelen kézikönyvben és a www.qiagen.com webhelyen elérhető további protokollokban leírtak kivételével más, nem a panelhez tartozó összetevőbe beépítsék vagy azokkal együtt használják. Az említett protokollok némelyikét a QIAGEN felhasználói bocsátják más QIAGEN felhasználók rendelkezésére. A QIAGEN nem végezte el ezeknek a protokolloknak az alapos vizsgálatát és optimalizálását. A QIAGEN nem vállal jótállást ezekért a protokollokért, és nem garantálja azt sem, hogy azok nem sérthetik harmadik felek jogait.
2. Az itt leírt licenccen kívül a QIAGEN nem vállal garanciát arra, hogy ez a panel és/vagy ennek használata nem sérti harmadik felek jogait.
3. A panel és az összetevőinek licence csak egyszeri használatra jogosít; újrafelhasználása, felújítása vagy újraértékesítése tilos.
4. A QIAGEN az itt leírtakon kívül kifejezetten kizár minden más konkrét vagy vélelmezett jogot.
5. A panel vásárlója és felhasználója elfogadja, hogy semmilyen olyan lépést nem tesz, és másnak sem engedélyezi semmilyen olyan lépés megtételét, amely a fentiekben előírtak megszegéséhez vezet vagy azt elősegíti. A QIAGEN jogosult a jelen korlátozott licencszerződésben foglalt tilalmak bármely bíróságon keresztiüli érvényesítésére és a korlátozott licencre vonatkozó jelen szerződés vagy a panellel és/vagy összetevőivel kapcsolatos bármilyen szellemi tulajdonjog érvényesítése céljából indított peres eljárással kapcsolatban felmerülő összes vizsgálati és perköltség követelésére, beleértve az ügyvédi költségeket is.

A legújabb licencceltételekről a www.qiagen.com oldalon tájékozódhat.

Védjegyek: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIAcube® (QIAGEN Group); Sarstedt® (Sarstedt AG and Co. KG).

Jun-2022 HB-3030-001 1127543 © 2022 QIAGEN, minden jog fenntartva.

Rendelés: www.qiagen.com/shop | Műszaki támogatás: support.qiagen.com |
Webhely: www.qiagen.com