

september 2019

QIAamp[®] DSP Circulating NA Kit Navodila za uporabo (priročnik)

Različica 1



50

IVD

CE

REF

61504



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden, NEMČIJA

R4 MAT

1118364SL

Vsebina

Namen uporabe.....	4
Pregled in razlaga	4
Načela postopka.....	5
Prostornine vzorcev	5
Vzorci liziranja	7
Adsorpcija na membrano kolone QIAamp Mini	7
Odstranjevanje ostankov nečistoč.....	7
Elucija čistih nukleinskih kislin	8
Izkoristek in velikost nukleinskih kislin.....	8
Opis protokolov	9
Potrebna oprema, ki je vključena v dobavo	10
Vsebina kompleta.....	10
Potrebna oprema, ki ni vključena v dobavo	11
Opozorila in previdnostni ukrepi	12
Shranjevanje in ravnanje z reagenti	15
Shranjevanje vzorca in ravnanje z njim	16
Postopek	17
Priprava pufrov in reagentov	24
Breeze protokol: Čiščenje cirkulacijskih nukleinskih kislin iz 1–5 ml človeške krvne plazme.....	27
Klasični protokol: Čiščenje cirkulacijskih nukleinskih kislin iz 1–5 ml plazme človeške krvi	32
Kontrola kakovosti	37
Omejitve	37

Simboli.....	38
Reference.....	40
Kontaktne podatki.....	40
Navodila za odpravljanje težav.....	41
Dodatek A: Priporočilo za odvajanje in shranjevanje krvne plazme.....	43
Dodatek B: Splošne opombe glede ravnanja z RNA.....	45
Informacije za naročanje.....	46
Priročnik zgodovine revizij.....	47

Namen uporabe

Komplet QIAamp DSP Circulating NA Kit je sistem, ki uporablja tehnologijo silicijeve membrane (tehnologija QIAamp) za izolacijo in čiščenje cirkulacijske DNA in RNA brez celic iz vzorcev plazme človeške krvi.

Izdelek je namenjen za uporabo s strani profesionalnih uporabnikov, npr. tehnikov in zdravnikov, ki so usposobljeni glede molekularnih bioloških tehnik.

Komplet QIAamp DSP Circulating NA Kit je namenjen za in vitro diagnostično uporabo.

Pregled in razlaga

Prosto cirkulacijske nukleinske kisline so v človeški plazmi običajno prisotne v kratkih delcih, <1000 bp (DNA), <1000 nt (RNA) ali majhni kot 20 nt (miRNAs). Koncentracija prosto cirkulacijskih nukleinskih kislin v plazmi človeške krvi je običajno nizka in se med posamezniki močno spreminja v razponu od 1 do 100 ng/ml v človeških vzorcih (1–5).

Komplet QIAamp DSP Circulating NA Kit omogoča učinkovito čiščenje cirkulacijskih nukleinskih kislin iz človeške plazme. Vzorci so lahko sveži ali zamrznjeni. Razširitvene epruvete in vakuumaska obdelava na QIAvac 24 Plus omogočajo začetne prostornine vzorcev do 5 ml, prilagodljivi elucijski volumni med 20–150 µl pa dovoljujejo koncentracijo vrst nukleinskih kislin, ki so prisotne v nizkih koncentracijah.

Eluirana prosto cirkulacijska genomska DNA ali RNA je pripravljena za uporabo v zaključnih postopkih ali primerna za skladiščenje. Komplet QIAamp DSP Circulating NA Kit zagotavlja učinkovito odstranjevanje proteinov, nukleaz ali drugih nečistoč.

Načela postopka

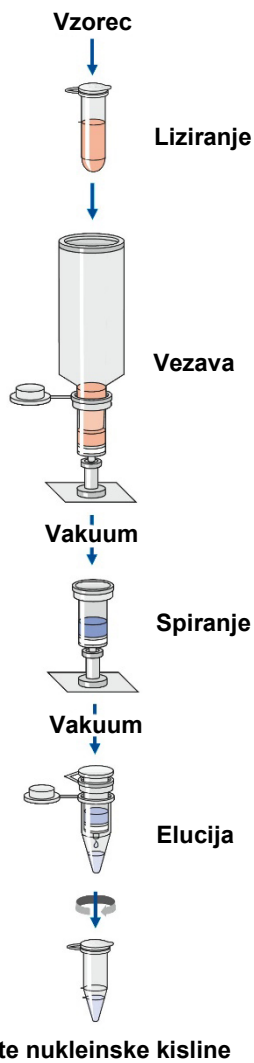
Postopek QIAamp DSP Circulating NA združuje 4 korake (liziranje, vezava, spiranje in elucija) in se izvede z uporabo kolon QIAamp Mini na sistemu QIAvac. Robusten postopek pomaga zmanjšati navzkrižno onesnaženje od vzorca do vzorca ter povečuje varnost uporabnika pri rokovanju s potencialno kužnimi vzorci.

Enostaven postopek je primeren za istočasno obdelavo do 24 vzorcev v manj kot dveh urah.

Prostornine vzorcev

Kolone QIAamp Mini vežejo fragmentirane nukleinske kisline, ki so kratke do 20 nt, vendar pa je rezultat odvisen od prostornine vzorca in koncentracije cirkulacijskih nukleinskih kislin v vzorcu (običajno 1–100 ng/ml v plazmi). Postopek QIAamp DSP Circulating NA je bil optimiziran za prostornine vzorcev do 5 ml.

Postopek kompleta QIAamp DSP Circulating NA Kit



Slika 1. Pregled postopka kompleta QIAamp DSP Circulating NA Kit

Vzorci liziranja

Prosto cirkulacijske nukleinske kisline v bioloških tekočinah se običajno vežejo na beljakovine ali se ovijejo v vezikle, kar zahteva učinkovit korak lize, da se sprostijo nukleinske kisline za selektivno vezavo na kolono QIAamp Mini. Zato se vzorci lizirajo v visoko denaturirajočih pogojih pri povišanih temperaturah v prisotnosti proteinaze K in Buffer ACL, kar zagotavlja inaktivacijo DNaz in RNaz ter sproščanje nukleinskih kislin iz vezanih proteinov, lipidov in veziklov.

Adsorpcija na membrano kolone QIAamp Mini

Da se omogoči optimalna vezava cirkulacijskih nukleinskih kislin na membrano, se pogoji vezave prilagodijo z dodajanjem Buffer ACBlizatu. Lizati se nato prenesejo na kolono QIAamp Mini in cirkulacijske nukleinske kisline se adsorbirajo iz velike prostornine na membrano silicijevega dioksida, ko vakuumski tlak povleče lizat skozi. Pogoji soli in pH zagotavljajo, da se večina beljakovin in drugih nečistoč, ki lahko zavirajo verižno reakcijo s polimerazo in druge zaključne encimske reakcije, ne zadrži na membrani kolone QIAamp Mini.

Za protokol sta potrebna vakuumski sklop (npr. QIAvac 24 Plus s sistemom QIAvac Connecting System) in vakuumska črpalka, ki lahko ustvari vakuum približno 800–900 mbar (npr. vakuumska črpalka QIAGEN® Vacuum Pump). Za enostavno spremljanje tlaka vakuuma in priročno sproščanje vakuuma je treba uporabiti Vacuum Regulator (del sistema QIAvac Connecting System).

Odstranjevanje ostankov nečistoč

Nukleinske kisline ostanejo vezane na membrano, medtem ko se nečistoče v treh korakih pranja učinkovito izperejo.

Elucija čistih nukleinskih kislin

Elucija se izvaja z uporabo Buffer AVE. V enem koraku se v Buffer AVE eluirajo visoko čiste cirkulacijske nukleinske kisline, ki so ogrete na sobno temperaturo. Uporabimo lahko prilagodljiv elucijski volumen od 50 do 150 µl. Če so potrebne višje koncentracije nukleinske kisline, lahko elucijski volumen zmanjšamo na 20 µl. Elucijski volumni, manjši od 50 µl, vodijo do višje koncentrirane nukleinske kisline, vendar lahko pride do nižjega skupnega izkoristka.

Pridobljen volumen eluata je lahko za približno 5 µl manjši od volumna elucijskega pufra, danega v kolono.

Izkoristek in velikost nukleinskih kislin

Izkoristek prosto cirkulacijskih nukleinskih kislin, izoliran iz bioloških vzorcev, je običajno pod 1 µg in ga je zato težko določiti s spektrofotometrom. Absolutni izkoristek cirkulacijske DNA in RNA, dobljen iz vzorca z uporabo kompleta QIAamp DSP Circulating NA Kit, se razlikuje med vzorci različnih posameznikov in je odvisen tudi od drugih dejavnikov (npr. nekaterih bolezenskih stanj). Poleg tega bo verjetno nosilec RNA, ki je prisoten v ekstrahiranih nukleinskih kislinah, prevladal nad odčitki absorpcije UV žarkov (glej stran 25). Za določitev izkoristka priporočamo kvantitativne metode amplifikacije.

Porazdelitev velikosti cirkulacijskih nukleinskih kislin, očiščenih s pomočjo kompleta QIAamp DSP circulating NA Kit, je mogoče preveriti z elektroforezo z agaroznim gelom ali hibridizacijo na ciljno specifično označeno sondo⁵ ali raztopino mikrofluidne elektroforeze (npr. Agilent Bioanalyzer).

Opis protokolov

V tem priročniku sta opisana dva različna protokola.

»Breeze protokol: Čiščenje cirkulacijskih nukleinskih kislin iz 1–5 ml človeške krvne plazme« (stran 27) je namenjen obdelavi do 5 ml plazme v korakih po 1 ml in je bil optimiziran tako, da zahteva manj aktivne udeležbe in zagotavlja hitrejšo obdelavo.

»Klasični protokol: Čiščenje cirkulacijskih nukleinskih kislin iz 1–5 ml plazme človeške krvi« (Stran 32) je namenjen obdelavi do 5 ml plazme v korakih po 1 ml in predstavlja nespremenjen protokol priročnika QIAamp DSP circulating NA Kit Handbook Revision 3 (R3).

Potrebna oprema, ki je vključena v dobavo

Vsebina kompleta

QIAamp DSP Circulating NA Kit			(50)
Kataloška številka			61504
Število pripravkov			50
QIAamp Mini	QIAamp Mini columns with Wash Tubes (kolone QIAamp Mini z epruветami za spiranje (WT) (2 ml))	COL	50
EXT	Column Extenders (podaljški kolon (20 ml))	COL EXT	2 × 25
WT	Wash Tubes (epruветe za spiranje (2 ml))	WASH TUBE	50
ET	Elution Tubes (epruветe za elucijo (1,5 ml))	ELU TUBE	50
VC	VacConnectors	VAC CON	50
ACL*	Lysis Buffer* (pufer za lizo)	LYS BUF	220 ml
ACB*	Binding Buffer* (concentrate) (vezalni pufer (koncentrat))	BIND BUF CONC	300 ml
ACW1*	Wash Buffer 1* (concentrate) (pufer za spiranje 1 (koncentrat))	WASH BUF 1 CONC	19 ml
ACW2†	Wash Buffer 2† (concentrate) (pufer za spiranje 2 (koncentrat))	WASH BUF 2 CONC	13 ml
AVE†	Elution Buffer† (purple caps) (elucijski pufer (vijolični pokrovčki))	ELU BUF	5 × 2 ml
PROTK	QIAGEN Proteinase K (QIAGEN proteinaza K)	PROTK	4 × 7 ml
Carrier (nosilec)	Carrier RNA (red caps) (nosilec RNA (rdeči pokrovčki))	CAR RNA	310 µg
	Priročnik	H B	1

* Vsebuje kaotropično sol. Glejte stran 12 za Opozorila in previdnostni ukrepi.

† Vsebuje konzervans natrijev azid.

Potrebna oprema, ki ni vključena v dobavo

Pri delu s kemikalijami vedno nosite ustrezno laboratorijsko haljo, rokavice za enkratno uporabo in zaščitna očala. Več informacij poiščite v ustreznih varnostnih listih (safety data sheets, SDS), ki so na voljo pri dobavitelju izdelka.

Zagotovite, da so vsi instrumenti preverjeni in kalibrirani v skladu s priporočili proizvajalca.

Za vse protokole

- Pipete (prilagodljive)
- Sterilne konice pipet (konice pipet z aerosolnimi ovirami se priporočajo za preprečevanje navzkrižnega onesnaženja)
- Vodna kopel ali grelni blok, ki lahko drži 50-mililitrske centrifugalne epruvete pri 56 °C ali 60 °C*
- Grelni blok ali podobno pri 56 °C, ki lahko drži 2-mililitrske epruvete za spiranje (samo za klasični protokol)*
- Mikrocentrifuga (z rotorjem za 2-mililitrske epruvete)*
- 50-mililitrske centrifugalne epruvete
- Sklop QIAvac 24 Plus vacuum manifold (kat. št. 19413)
- Sistem QIAvac Connecting System (kat. št. 19419) ali enakovreden sistem
- Vacuum Pump (kat. št. 84010 [ZDA in Kanada], 84000 [Japonska] ali 84020 [preostali svet]) ali enakovredna črpalka, ki je sposobna proizvesti vakuum od -800 do -900 mbar
- Etanol (96- do 100-odstotni)†
- Izopropanol (100-odstotni)
- Zdrobljen led (samo za »Klasični protokol: Čiščenje cirkulacijskih nukleinskih kislin iz 1–5 ml plazme človeške krvi«.)
- Nekateri vzorci morda potrebujejo redčenje z raztopino s fosfatnim pufrom
- Izbirno: VacValves (kat. št. 19408)

* Zagotovite, da so bili instrumenti pregledani in umerjeni v skladu s priporočili proizvajalca.

† Ne uporabljajte denaturiranega alkohola, ki vsebuje druge snovi, kot je metanol ali metiltilketon.

Opozorila in previdnostni ukrepi

Samo za diagnostično uporabo in vitro

Pri delu s kemikalijami vedno nosite ustrezno laboratorijsko haljo, rokavice za enkratno uporabo in zaščitna očala. Več informacij poiščite v ustreznih SDS-jih. Ti so v priročni in kompaktni obliki PDF na voljo na spletu na naslovu **www.qiagen.com/safety**, kjer lahko najdete, preberete in natisnete varnostne liste za vse komplete QIAGEN in njihove sestavne dele.

OPOZORILO

Nevarnost osebnih poškodb



NE dodajajte belila ali kislih raztopin neposredno v odpadke, nastale pri pripravi vzorca.

Buffer ACL Buffer ACBin Buffer ACW1 vsebujejo gvanidinijeve soli, ki lahko v kombinaciji z bellom tvorijo zelo reaktivne spojine.

Če se tekočina, ki vsebuje te pufre, razlije, jo očistite z ustreznim laboratorijskim detergentom in vodo. Če razlita tekočina vsebuje snovi, ki lahko povzročijo okužbe, polito območje očistite najprej z laboratorijskih detergentom in vodo ter nato še z 1-odstotno (v/v) raztopino natrijevega hipoklorita.

Za sestavne dele kompleta QIAamp DSP Circulating NA Kit veljajo naslednji stavki o nevarnosti in previdnostni stavki.

Buffer ACB



Vsebuje: gvanidinijev tiocianat. Nevarnost! Škodljiv v primeru zaužitja. Škodljiv pri stiku s kožo ali vdihavanju. Povzroča hude opekline in okvare oči. Škodljiv za vodne predele z dolgoročnimi učinki. Stik s kislinami sprosti zelo strupen plin. Nositi zaščitne rokavice/zaščitno obleko/zaščito za obraz/oči. PRI STIKU Z OČMI: previdno izpirajte z vodo nekaj minut. Odstranite kontaktne leče, če jih imate in če to lahko storite brez težav. Nadaljujte z izpiranjem. Takoj pokličite CENTER ZA ZASTRUPITVE ali zdravnika.

Buffer ACL



Vsebuje: gvanidinijev tiocianat. Nevarnost! Škodljiv v primeru zaužitja. Škodljiv pri stiku s kožo ali vdihavanju. Povzroča hude opekline in okvare oči. Škodljiv za vodne predele z dolgoročnimi učinki. Stik s kislinami sprosti zelo strupen plin. Nositi zaščitne rokavice/zaščitno obleko/zaščito za obraz/oči. PRI STIKU Z OČMI: previdno izpirajte z vodo nekaj minut. Odstranite kontaktne leče, če jih imate in če to lahko storite brez težav. Nadaljujte z izpiranjem. Takoj pokličite CENTER ZA ZASTRUPITVE ali zdravnika.

Buffer ACW1



Vsebuje: gvanidinijev klorid. Opozorilo Zdravju škodljivo pri zaužitju ali vdihavanju. Povzroča draženje kože. Povzroča hudo draženje oči. Nositi zaščitne rokavice/zaščitno obleko/zaščito za obraz/oči.

Proteinaza K



Vsebuje: proteinazo K. Nevarnost! Povzroča blago draženje kože. Lahko povzroči simptome alergije ali astme ali težave z dihanjem pri vdihavanju. Ne vdihavati prahu/dima/plina/meglice/hlapov/razpršila. Nositi zaščitne rokavice/zaščitno obleko/zaščito za obraz/oči. Nositi zaščito za dihala. V primeru IZPOSTAVLJENOSTI ALI ZASKRBLJENOSTI: pokličite CENTER ZA ZASTRUPITVE ali zdravnika. Osebo premaknite na svež zrak in jo ohranjajte v udobnem položaju za dihanje.

Shranjevanje in ravnanje z reagenti

Kolone QIAamp Mini hranite na 2–8 °C v suhem prostoru. Vsi pufri se hranijo pri sobni temperaturi (15–25 °C). Kolone QIAamp Mini in pufri se lahko hranijo pod temi pogoji do izteka roka uporabe, ki je naveden na škatli kompleta, ne da bi pri tem kazali znake zmanjšane učinkovitosti.

Liofilizirani nosilec RNA je treba hraniti pri sobni temperaturi (15–25 °C) do roka uporabe, ki je naveden na etiketi sestavnega dela. Nosilec RNA je treba raztopiti v Buffer AVE. Raztopljen nosilec RNA je treba takoj dodati v Buffer ACL, kot je opisano na strani 28 za Breeze protokol in na strani 33 za klasični protokol. To raztopino je treba pripraviti svežo in je pri temperaturi 2–8 °C stabilna do 48 ur. Neuporabljene dele nosilca RNA, raztopljenega v Buffer AVE, je treba zamrzniti v alikvotih pri temperaturi od –30 do –15 °C.

Komplet QIAamp DSP Circulating NA Kit vsebuje raztopino proteinaze K, ki je že pripravljena za uporabo in razredčena v posebej pripravljenem pufri za shranjevanje. Proteinaza K je stabilna do izteka roka uporabe, navedenega na etiketi sestavine, če se hrani pri sobni temperaturi (15–25 °C).

Shranjevanje vzorca in ravnanje z njim

Shranjevanje krvi in ravnanje z njo

Da bi se izognili razgradnji nukleinskih kislin brez celic in sproščanju celičnih nukleinskih kislin, priporočamo hranjenje krvi največ 6 ur pri temperaturi 2–8 °C (npr. vzorci EDTA). Če uporabljate stabilizirane epruvete za kri, upoštevajte pogoje shranjevanja, ki jih je zagotovil proizvajalec. Priporočamo, da te pogoje shranjevanja uporabljate v kombinaciji z vašimi zaključnimi postopki in glede na ciljno enoto.

Shranjevanje in ravnanje s plazmo

Priporočljivo je, da se pri uporabi EDTA kot antikoagulant, zlasti za RNA, plazma loči in nukleinska kislina izolira takoj po odvzemu krvi. Za kratkotrajno shranjevanje lahko plazmo hranite do 24 ur pri 2–8 °C.

Za daljše shranjevanje lahko alikvote plazme iz stabiliziranih in nestabiliziranih epruвет za kri hranite pri –20 °C (samo za ciljanje DNA) ali –80 °C (ciljanje DNA in RNA) vsaj štiri tedne.

Shranjevanje eluiranih nukleinskih kislin

Eluirane nukleinske kisline se zbirajo v 1,5-mililitrskih epruветah za elucijo (priloženo). Prečiščene cirkulacijske nukleinske kisline se lahko hranijo do 24 ur pri 2–8 °C. Za obdobja shranjevanja, daljša od 24 ur, je priporočljivo shranjevanje pri –30 do –15 °C za DNA in –90 do –60 °C za zaključne postopke z RNA.

Postopek

Pomembno pred začetkom

QIAvac 24 Plus

QIAvac 24 Plus je zasnovan za hitro in učinkovito vakuumsko obdelavo do 24 QIAGEN kolon za centrifugiranje hkrati. Vzorci in raztopine za spiranje se skozi membrane kolon namesto centrifugiranja vlečejo z vakuumom, kar zahteva krajši čas aktivne udeležbe in omogoča krajše postopke čiščenja.

QIAvac 24 Plus se lahko v kombinaciji s sistemom QIAvac Connecting System uporablja kot pretočni sistem. Pretok vzorca se zbira v ločeni steklenički.

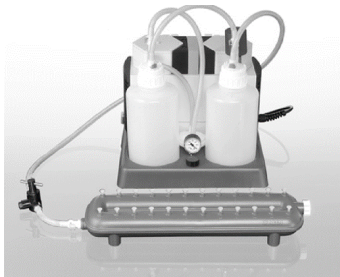
Za vzdrževanje QIAvac 24 Plus glejte smernice za ravnanje v *priročniku QIAvac 24 Plus*.

Obdelava kolon QIAamp Mini na QIAvac 24 Plus

Kolone QIAamp Mini se na QIAvac 24 Plus obdelujejo z uporabo VacConnectors za enkratno uporabo in VacValves za večkratno uporabo. VacValves (izbirno) se vstavijo neposredno v reže luerja sklopa QIAvac 24 Plus in zagotavljajo enakomeren pretok, kar omogoča vzporedno obdelavo različnih prostornin vzorcev. Uporabiti jih je treba, če se hitrosti pretoka vzorcev bistveno razlikujejo, da se zagotovi konsistenten vakuum. VacConnectors so priključki za enkratno uporabo, ki se prilegajo med kolone QIAamp Mini in VacValves ali med kolone QIAamp Mini in reže luerja QIAvac 24 Plus. Preprečujejo neposreden stik med kolono za centrifugiranje in VacValve med čiščenjem, s čimer se izognejo navzkrižnem onesnaženju med vzorci. VacConnectors se zavržejo po enkratni uporabi. Zaradi velike količine uporabljenih raztopin je potreben sistem QIAvac Connecting System (ali podoben sistem z odpadnimi stekleničkami) (glejte Slika 2).

Smernice za uporabo QIAvac 24 Plus

- QIAvac 24 Plus vedno namestite na zaščiteno mizo ali delovno površino. Če pade, lahko sklop QIAvac 24 Plus poči.
- QIAvac 24 Plus vedno shranjujte očiščenega in suhega. Za postopke čiščenja glejte priročnik QIAvac 24 Plus.
- Sestavni deli QIAvac 24 Plus niso odporni na določena topila (Preglednica 1). Če se topila razlijejo po enoti, jo temeljito sperite z vodo.
- Za zagotovitev konstantne učinkovitosti ne nanašajte silikonskih ali vakuumskih maščob na noben del sklopa QIAvac 24 Plus.
- Pri delu v bližini vakuumskega sklopa pod tlakom bodite vedno previdni in nosite zaščitna očala.
- Za informacije o rezervnih ali nadomestnih delih se obrnite na tehnično službo QIAGEN ali na vašega lokalnega distributerja.
- Vakuumski tlak je diferenčni tlak med notranjostjo vakuumskega sklopa in atmosfero (standardni atmosferski tlak 1013 milibarov ali 760 mm Hg) in ga je mogoče izmeriti s sistemom QIAvac Connecting System (glej Slika 2). Za protokole se zahteva vakuumška črpalka, ki je sposobna ustvariti vakuum od -800 do -900 mbar (npr. vakuumška črpalka QIAGEN Vacuum Pump). Višjim vakuumskim tlakom se je treba izogibati. Uporaba vakuumskih tlakov, nižjih od priporočenih, lahko zmanjša izkoristek in čistost nukleinske kisline in poveča tveganje zamažitve membran.



Slika 2. QIAvac 24 Plus, sistem QIAvac Connecting System, in vakuumška črpalka

Preglednica 1. Lastnosti kemične odpornosti QIAvac 24 Plus

Odpornost na		Ni odporno na
Ocetna kislina	Kaotropične cevi	Benzen
Kromova kislina	Koncentrirani alkoholi	Fenol
SDS	Natrijev klorid	Kloroform
Tween® 20	Sečnina	Toluen
Klorovo belilo	Hidrokloridna kislina	Etri
Natrijev hidroksid		

Nastavitev vakuumskega sklopa QIAvac 24 Plus vacuum manifold

1. Priključite QIAvac 24 Plus na vakuumski vir. Če uporabljate sistem QIAvac Connecting System, sistem priključite na sklop in vakuumski vir, kot je opisano v dodatku *A priročnika QIAvac 24 Plus*.
2. V vsako režo luerja QIAvac 24 Plus, ki bo uporabljena, vstavite VacValve (izbirno) (glej Slika 3). Neuporabljene reže luerja zaprite s čepi luerja ali zaprite vstavljeno VacValve. Če se hitrost pretoka vzorcev bistveno razlikuje, je treba uporabiti VacValves, da se zagotovi stalen vakuum.
3. V vsak VacValve vstavite VacConnector (glejte Slika 3).
Ta postopek izvedite neposredno pred čiščenjem, da se izognete izpostavljenosti VacConnectors morebitnim nečistočam v zraku.
4. Kolone QIAamp Mini postavite v VacConnectors na sklopu (glejte Slika 3).
Opomba: Epruveto za spiranje iz pretisnega omota shranite za uporabo v protokolu za čiščenje.
5. V vsako kolono QIAamp Mini vstavite podaljšek kolone (20 ml) (glejte Slika 3).
Opomba: Prepričajte se, da je podaljšek kolone trdno vstavljen v kolono QIAamp Mini, da ne pride do uhajanja vzorca.
6. Za čiščenje nukleinskih kislin upoštevajte navodila v protokolih. Po uporabi ustrezno zavržite VacConnectors.

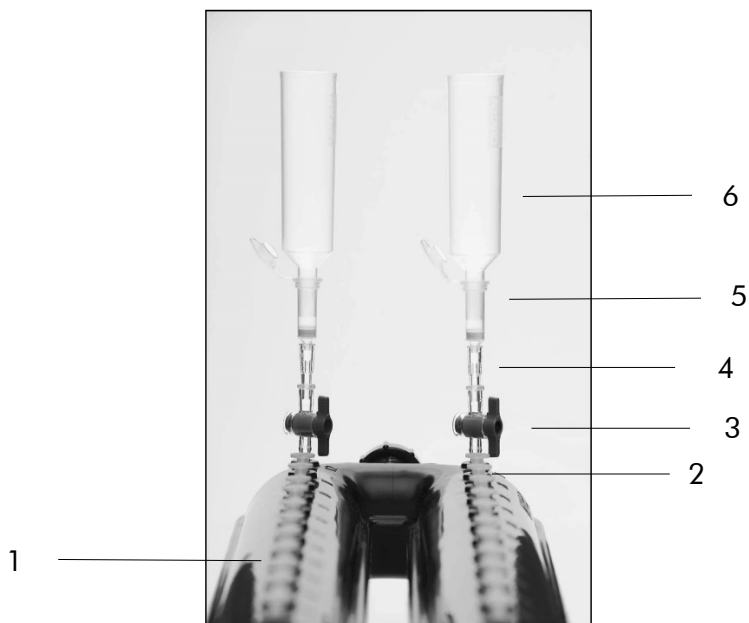
Med uporabo vakuuma pustite pokrov kolone QIAamp Mini odprt.

Med koraki izključite vakuum, da zagotovite, da se med obdelavo uporablja enakomeren vakuum. Za hitrejše sproščanje vakuuma je treba uporabiti Vacuum Regulator (del sistema QIAvac Connecting System).

Opomba: Vsak VacValve je mogoče zapreti posamično, ko je ves vzorec v celoti speljan skozi kolono za centrifugiranje, kar omogoča vzporedno obdelavo vzorcev različnih prostornin ali viskoznosti.

7. Po obdelavi vzorcev očistite QIAvac 24 Plus (glejte »Čiščenje in dekontaminacija QIAvac 24 Plus« v *priročniku QIAvac 24 Plus*).

Opomba: Pufri ACL, ACB in ACW1 niso združljivi z razkužilnimi sredstvi, ki vsebujejo belilo. Glejte stran 12 za Opozorila in previdnostni ukrepi.

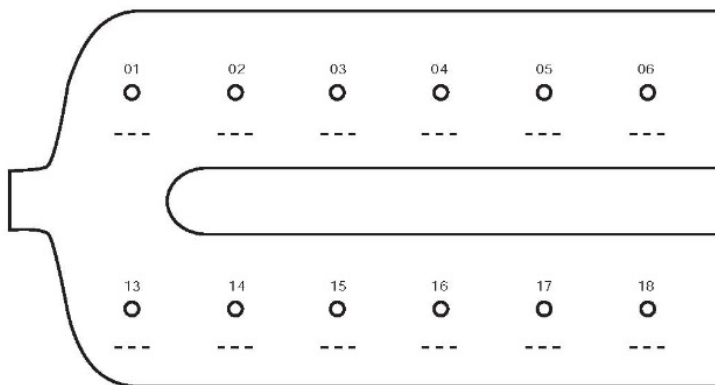


Slika 3. Nastavitev QIAvac 24 Plus s kolonami QIAamp Mini z uporabo VacValves, VacConnectors in podaljškov kolon.

- | | |
|---|-----------------------------|
| 1 Vakuumski sklop QIAvac 24 Plus vacuum manifold | 4 VacConnector |
| 2 Reža luerja QIAvac 24 Plus (zaprta s čepom luerja) | 5 Kolona QIAamp Mini |
| 3 VacValve** | 6 Column Extender |

Za uporabo na vakuumskem sistemu QIAvac 24 Plus priporočamo označevanje epruвет in kolon QIAamp Mini po shemi na Slika 4. To sliko lahko fotokopirate in označite z imeni vzorcev.

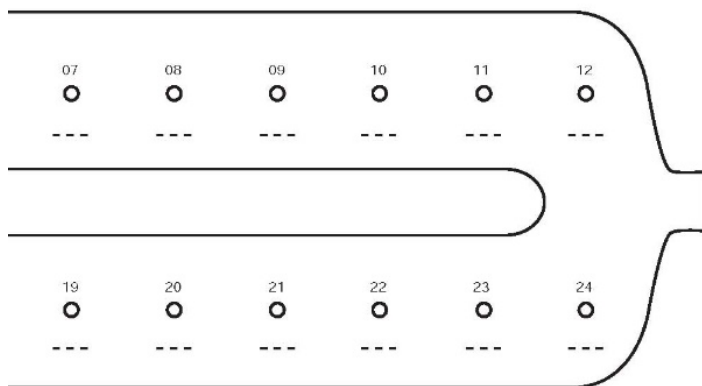
* Kupiti ločeno.



Datum: _____

Upravljavec: _____

ID št. poteka: _____



Slika 4. Shema označevanja epruvet in kolon QIAamp Mini za uporabo na vakuumskem sistemu QIAvac 24 Plus

Priprava pufrov in reagentov

Buffer ACB

Pred uporabo dodajte 200 ml izopropanola (100%) v 300 ml koncentrata Buffer ACB, da dobite 500 ml Buffer ACB. Po dodajanju izopropanola dobro premešajte.

Buffer ACW1*

Pred uporabo dodajte 25 ml etanola (96–100%) v 19 ml koncentrata Buffer ACW1 da dobite 44 ml Buffer ACW1. Po dodajanju etanola dobro premešajte.

Buffer ACW2†

Pred uporabo dodajte 30 ml etanola (96–100%) v 13 ml koncentrata Buffer ACW2 da dobite 43 ml Buffer ACW2. Po dodajanju etanola dobro premešajte.

Dodajanje nosilca RNA v Buffer ACL.*

Nosilec RNA ima 2 namena: prvič, poveča vezavo nukleinskih kislin na membrano QIAamp Mini, še posebej, če je v vzorcu zelo malo ciljnih molekul. Drugič, dodajanje večjih količin nosilca RNA zmanjšuje možnost razgradnje RNA v redkem primeru, ko se molekule RNaze izogonejo denaturaciji s pomočjo kaotropnih soli in detergentov v Buffer ACL.

Količina liofiliziranega nosilca RNA zadošča za količino Buffer ACL, ki je priložen kompletu. Priporočena koncentracija nosilca RNA je bila prilagojena tako, da se lahko protokol QIAamp DSP Circulating NA uporablja kot generični sistem za čiščenje, združljiv z več različnimi ojačevalnimi sistemi in je primeren za širok razpon ciljnih enot RNA in DNA.

* Vsebuje kaotropno sol. Za opozorila in previdnostne ukrepe glejte stran 12-13.

† Vsebuje konzervans natrijev azid.

Različni ojačevalni sistemi se razlikujejo po učinkovitosti, odvisno od skupne količine nukleinskih kislin, prisotnih v reakciji. Eluati iz kompleta vsebujejo tako cirkulacijske nukleinske kisline kot nosilec RNA, količina nosilca RNA pa bo v večini primerov močno preseгла količino cirkulacijskih nukleinskih kislin. Zato količinska opredelitev izoliranih cirkulacijskih nukleinskih kislin z odčitavanjem UV-absorpcije ne bo ustrezna, saj rezultate takšnih meritev določa prisotnost nosilca RNA.

Za doseganje najvišje stopnje občutljivosti pri reakcijah za ojačitev bo morda treba zmanjšati količino nosilca RNA, dodanega v Buffer ACL.

Pri ojačevalnih sistemih, ki vključujejo oligo dT primerje, se nosilec RNA ne sme dodati med izolacijo cirkulacijskih nukleinskih kislin.

V epruveto, ki vsebuje 310 µg liofiliziranega nosilca RNA, dodajte 1550 µl Buffer AVE*, da dobite raztopino koncentracije 0,2 µg/µl. Nosilec RNA temeljito raztopite, razdelite na alikvote ustrezne velikosti in shranite pri temperaturi od –30 do –15 °C. Alikvotov nosilca RNA ne zamrznete in odmrznite več kot 3-krat.

Upoštevajte, da se nosilec RNA ne raztopi v Buffer ACL. Najprej ga moramo raztopiti v Buffer AVE in nato dodati v Buffer ACL.

Izračunajte prostornino mešanice Buffer ACLin nosilca RNA, ki je potrebna za serijo vzorcev, v skladu s tabelami v protokolih. Izberite število vzorcev, ki jih je treba obdelati hkrati.

Nežno premešajte tako, da 10-krat obrnete epruveto ali stekleničko. Da bi se izognili penjenju, ne vrtinčite.

*Vsebuje konzervans natrijev azid.

Opomba: Postopek priprave vzorca je optimiziran za največ 1,0 µg nosilca RNA na vzorec. Če se je izkazalo, da je za vaš ojačevalni sistem primernejša uporaba manjše količine nosilca RNA, prenesite samo potrebno količino raztopljenega nosilca RNA v epruvete, ki vsebujejo Buffer ACL. Za vsak mikrogram nosilca RNA, potrebnega za pripravo, dodamo 5 µl raztopljenega nosilca RNA v Buffer ACL. (Uporaba manj kot 1,0 µg nosilca RNA na vzorec je lahko koristna in jo je treba potrditi za vsako posamezno vrsto vzorca in vsak zaključni test.)

Breeze protokol: Čiščenje cirkulacijskih nukleinskih kislin iz 1–5 ml človeške krvne plazme

Ta protokol je namenjen čiščenju cirkulacijske DNA in RNA iz 1–5 ml človeške krvne plazme in je bil optimiziran tako, da zahteva manj aktivne udeležbe in zagotavlja hitrejšo obdelavo. Za obstoječe delovne tokove, potrjene s strani uporabnika, z uporabo različice 1/R3 kompleta QIAamp DSP circulating Kit, glejte „Klasični protokol: Čiščenje cirkulacijskih nukleinskih kislin iz 1–5 ml plazme človeške krvi“ (stran 32).

Pomembno pred začetkom

- Vsi koraki centrifugiranja se izvajajo pri sobni temperaturi (15–25 °C).
- Med koraki izklopite vakuum, da zagotovite, da se v korakih protokola uporablja dosleden, enakomeren vakuum.
- **Opomba:** Tlak vakuumske črpalke mora biti od –800 do –900 mbar.
- Pustite, da se vzorci ogrejejo na sobno temperaturo.
- Uporabite fiziološko raztopino s fosfatom, da dobite najbližji natančen volumen vzorca (1 ml do 5 ml).
- Nastavite QIAvac 24 Plus, kot je opisano na strani 19.
- Vodno kopel ali ogrevalni blok segrejte na 56°C za uporabo s 50-mililitrskimi centrifugalnimi epruветami v koraku 3.
- Pred uporabo pustite kolone za centrifugiranje QIAamp Mini na sobni temperaturi vsaj 1 uro.
- Prepričajte se, da so Buffer ACB, Buffer ACW1in Buffer ACW2 pripravljeni (dodajanje izopropanola ali etanola) po navodilih na strani 24.
- Dodajte v Buffer AVE rekonstituiran nosilec RNA, v Buffer ACLv skladu z navodili v Preglednica 2.

Preglednica 2. Prostornina Buffer ACL in nosilca AVE (raztopljenega v Buffer AVE), potrebna za obdelavo 1–5 ml vzorcev človeške krvne plazme

Nastavitev za ml plazme	A	B	C	D	E	Nosilec RNA in Buffer AVE (µl)
	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	
Število vzorcev	Buffer ACL(ml)					
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

Postopek: Breeze protokol

1. Pipetirajte QIAGEN Proteinase K, plazmo in Buffer ACL **v tem zaporedju** v 50-mililitrsko centrifugalno epruveto (ni priložena).

Namestitev	A	B	C	D	E
ProtK (µl)	100	200	300	400	500
Plazma (ml)	1	2	3	4	5
ACL (ml)	0,8	1,6	2,4	3,2	4

2. Zaprite pokrovček in mešajte s pulznim vrtinčenjem 5 x 2 sekundi.

Prepričajte se, da se v epruveti ustvari vidni vrtinec. Za zagotovitev učinkovitega liziranja je nujno, da se vzorec in Buffer ACL temeljito pomešata, da dobimo homogeno raztopino.

Opomba: V tem času ne prekinjajte postopka. Za začetek inkubacije lize nadaljujte takoj s korakom 3.

3. Inkubirajte 15 (± 1) minut pri 56 °C (± 1°C).
4. Epruveto postavite nazaj na laboratorijsko mizo in odvijte pokrovček.
5. Lizatu v epruveti dodajte Buffer ACB. Prostornino izberite glede na nastavitev iz koraka 1.

Namestitev	A	B	C	D	E
ACB (ml)	1,8	3,6	5,4	7,2	9

6. Zaprite pokrovček in dobro premešajte s pulznim vrtinčenjem 5 x 2 sekundi.
Prepričajte se, da se v epruveti ustvari vidni vrtinec. Za zagotovitev učinkovite lize je nujno, da se lizat in Buffer ACB temeljito pomešata, da dobimo homogeno raztopino.
7. Mešanico lizata in Buffer ACB 5 (± 1) minut inkubirajte v epruveti pri sobni temperaturi.
8. Kolono QIAamp Mini vstavite v VacConnector na QIAvac 24 Plus (glejte „Nastavitev vakuumskega sklopa QIAvac 24 Plus vacuum manifold“, stran 19). Vstavite 20-mililitrski podaljšek kolone v odprto kolono QIAamp Mini.

Prepričajte se, da je podaljšek kolone trdno vstavljen v kolono QIAamp Mini, da ne pride do uhajanja vzorca.

Opomba: Epruveto za spiranje prihranite za centrifugiranje v koraku 13.

9. Lizat iz koraka 7 previdno nanesite v podaljšek kolone QIAamp Mini. Vključite vakuumsko črpalko. Ko so vsi lizati v celoti povlečeni skozi kolone, izklopite vakuumsko črpalko in sprostite tlak na 0 mbar. Previdno odstranite in zavrzite podaljšek kolone.

Upoštevajte, da lahko velike prostornine lizata vzorca (približno 18 ml, ko začnemo s 5 ml vzorca) rabijo do 20 minut, da s pomočjo vakuumske sile preidejo skozi membrano QIAamp Mini.

Za hitro in priročno sproščanje tlaka vakuumu je treba uporabiti Vacuum Regulator (del sistema QIAvac Connecting System).

Opomba: Da bi se izognili navzkrižnem onesnaženju, bodite pozorni, da ne prekrizate sosednjih kolon QIAamp Mini, medtem ko odstranjujete podaljške kolon.

10. Na kolono QIAamp Mini nanesite 600 µl Buffer ACW1. Pustite pokrov kolone odprt in vključite vakuumsko črpalko. Ko je ves Buffer ACW1 povlečen skozi kolono QIAamp mini, izklopite vakuumsko črpalko in sprostite tlak na 0 mbar.
11. Na kolono QIAamp Mini nanesite 750 µl Buffer ACW2. Pustite pokrov kolone odprt in vključite vakuumsko črpalko. Ko je ves Buffer ACW2 povlečen skozi kolono QIAamp mini, izklopite vakuumsko črpalko in sprostite tlak na 0 mbar.
12. Na kolono QIAamp Mini nanesite 750 µl etanola (96–100%). Pustite pokrov kolone odprt in vključite vakuumsko črpalko. Ko je ves etanol povlečen skozi kolono za centrifugiranje, izklopite vakuumsko črpalko in sprostite tlak na 0 mbar.
13. Zaprite pokrov kolone QIAamp Mini. Odstranite jo iz vakuumskega sklopa in zavrzite VacConnector. Kolono QIAamp Mini postavite v čisto 2-mililitrsko epruveto za spiranje (iz koraka 8) in pri polni hitrosti (20.000 x g; 14.000 vrt./min.) centrifugirajte 3 (± 0.5) minut.
14. Kolono QIAamp Mini postavite v čisto 2-mililitrsko epruveto za spiranje. Odprite pokrov in 3 minute sklop inkubirajte pri sobni temperaturi, da se membrana popolnoma posuši.

-
15. Kolono QIAamp Mini postavite v čisto 1,5-mililitrsko epruveto za elucijo (priložena) in zavržite 2-mililitrsko epruveto za spiranje iz koraka 14. Previdno nanesite 20–150 µl Buffer AVE na sredino membrane kolone QIAamp Mini. Zaprite pokrov in inkubirajte 3 (± 0,5) minute pri sobni temperaturi.

Pomembno: Poskrbite, da je elucijski Buffer AVEogret na sobno temperaturo (15–25 °C). Če elucijo izvajate v majhnih količinah (<50 µl), je za popolno elucijo vezanih nukleinskih kislin treba elucijski pufer spustiti na sredino membrane.

Elucijski volumen je mogoče prilagoditi glede na zahteve zaključnih postopkov.

Elucija z manjšimi količinami Buffer AVEvodi do višjih koncentracij nukleinske kisline, vendar lahko povzroči nižji skupni izkoristek.

Dobljen volumen eluata je lahko do 5 µl manjši od elucijskega volumna, nanesenega na membrano kolone QIAamp Mini.

Opomba: Za pričakovane nizke izkoristke NA se za elucijo priporoča uporaba epruvete z nizko vezavo (ni priložena).

16. Za eluiranje nukleinskih kislin centrifugirajte v mikrocentrifugi pri polni hitrosti (20.000 x g; 14.000 vrt / min) 1 minuto.

Klasični protokol: Čiščenje cirkulacijskih nukleinskih kislin iz 1–5 ml plazme človeške krvi

Ta protokol predstavlja nespremenjen protokol priročnika QIAamp DSP circulating NA Kit Handbook Revision 3 (R3) za uporabo z. npr. obstoječimi delovnimi procesi, ki jih je potrdi uporabnik, za 1-5 ml človeške plazme.

Pomembno pred začetkom

- Vsi koraki centrifugiranja se izvajajo pri sobni temperaturi (15–25 °C).
- Med koraki izklopite vakuum, da zagotovite, da se v korakih protokola uporablja dosleden, enakomeren vakuum.

Opomba: Tlak vakuumske črpalke mora biti od –800 do –900 mbar.

- Pustite, da se vzorci ogrejejo na sobno temperaturo.
- Uporabite fiziološko raztopino s fosfatom, da dobite najbližji natančen volumen vzorca (1 ml do 5 ml).
- Nastavite QIAvac 24 Plus, kot je opisano na strani 19.
- Vodno kopel ali ogrevalni blok segrejte na 60°C za uporabo s 50-mililitrskimi centrifugalnimi epruветami v koraku 3.
- Grelni blok segrejte na 56 °C za uporabo z 2-mililitrskimi epruветami za spiranje v koraku 14.
- Pred uporabo pustite kolone za centrifugiranje QIAamp Mini na sobni temperaturi vsaj 1 uro.
- Prepričajte se, da so Buffer ACB, Buffer ACW1 in Buffer ACW2 pripravljeni (dodajanje izopropanola ali etanola) po navodilih na strani 24.
- Dodajte v Buffer AVErekonstituiran nosilec RNA, v Buffer ACL v skladu z navodili v Preglednica 3.

Preglednica 3. Prostornina Buffer ACL in nosilca AVE (raztopljenega v Buffer AVE), potrebna za obdelavo 1–5 ml vzorcev človeške krvne plazme

Nastavitev za ml plazme	A	B	C	D	E	Nosilec RNA in Buffer AVE(μl)
	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	
Število vzorcev	Buffer ACL(ml)					
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

Postopek: Klasični protokol

1. Pipetirajte QIAGEN Proteinase K, plazmo in Buffer ACLv tem zaporedju v 50-mililitrsko centrifugalno epruveto (ni priložena).

Namestitev	A	B	C	D	E
ProtK (µl)	100	200	300	400	500
Plazma (ml)	1	2	3	4	5
ACL (ml)	0,8	1,6	2,4	3,2	4

2. Zaprite pokrovček in mešajte s pulznim vrtinčenjem 30 sekund.

Prepričajte se, da se v epruveti ustvari vidni vrtinec. Za zagotovitev učinkovitega liziranja je nujno, da se vzorec in Buffer ACL temeljito pomešata, da dobimo homogeno raztopino.

Opomba: V tem času ne prekinjajte postopka. Za začetek inkubacije lize nadaljujte takoj s korakom 3.

3. Inkubirajte 30 (\pm 2) minut pri 60 °C (\pm 1°C).
4. Epruveto postavite nazaj na laboratorijsko mizo in odvijte pokrovček.
5. Lizatu v epruveti dodajte Buffer ACB. Prostornino izberite glede na nastavitev iz koraka 1.

Namestitev	A	B	C	D	E
ACB (ml)	1,8	3,6	5,4	7,2	9

6. Zaprite pokrovček in vedno dobro mešajte s pulznim vrtinčenjem 30 sekund.

Prepričajte se, da se v epruveti ustvari vidni vrtinec. Za zagotovitev učinkovite lize je nujno, da se lizat in Buffer ACB temeljito pomešata, da dobimo homogeno raztopino.

7. Mešanico lizata in Buffer ACB inkubirajte v epruveti 5 (\pm 1) minut na ledu.
8. Kolono QIAamp Mini vstavite v VacConnector na QIAvac 24 Plus (glejte „Nastavitev vakuumskega sklopa QIAvac 24 Plus vacuum manifold“, stran 19). Vstavite 20-mililitrski podaljšek kolone v odprto kolono QIAamp Mini.

Prepričajte se, da je podaljšek kolone trdno vstavljen v kolono QIAamp Mini, da ne pride do uhajanja vzorca.

Opomba: Epruveto za spiranje prihranite za centrifugiranje v koraku 13.

- Lizat iz koraka 7 previdno nanosite v podaljšek kolone QIAamp Mini. Vključite vakuumsko črpalko s tlakom od -800 do -900 mbar. Ko so vsi lizati v celoti povlečeni skozi kolone, izklopite vakuumsko črpalko in sprostite tlak na 0 mbar. Previdno odstranite in zavrzite podaljšek kolone.

Upoštevajte, da lahko velike prostornine lizata vzorca (približno 18 ml, ko začnemo s 5 ml vzorca) rabijo do 20 minut, da s pomočjo vakuumske sile preidejo skozi membrano QIAamp Mini.

Za hitro in priročno sproščanje tlaka vakuuma je treba uporabiti Vacuum Regulator (del sistema QIAvac Connecting System).

Opomba: Da bi se izognili navzkrižnem onesnaženju, bodite pozorni, da ne prekrizate sosednjih kolon QIAamp Mini, medtem ko odstranjujete podaljške kolon.

- Na kolono QIAamp Mini nanosite 600 μ l Buffer ACW1. Pustite pokrov kolone odprt in vključite vakuumsko črpalko. Ko je ves Buffer ACW1 povlečen skozi kolono QIAamp mini, izklopite vakuumsko črpalko in sprostite tlak na 0 mbar.
- Na kolono QIAamp Mini nanosite 750 μ l Buffer ACW2. Pustite pokrov kolone odprt in vključite vakuumsko črpalko. Ko je ves Buffer ACW2 povlečen skozi kolono QIAamp mini, izklopite vakuumsko črpalko in sprostite tlak na 0 mbar.
- Na kolono QIAamp Mini nanosite 750 μ l etanola (96–100%). Pustite pokrov kolone odprt in vključite vakuumsko črpalko. Ko je ves etanol povlečen skozi kolono za centrifugiranje, izklopite vakuumsko črpalko in sprostite tlak na 0 mbar.
- Zaprte pokrov kolone QIAamp Mini. Odstranite jo iz vakuumskega sklopa in zavrzite VacConnector. Kolono QIAamp Mini postavite v čisto 2-mililitrsko epruveto za spiranje (iz koraka 8) in pri polni hitrosti (20.000 x g; 14.000 vrt./min.) centrifugirajte 3 (\pm 0.5) minut.
- Kolono QIAamp Mini postavite v čisto 2-mililitrsko epruveto za spiranje. Odprite pokrov in inkubirajte sklop pri 56 °C (\pm 1 °C) 10 (\pm 1) minut, da se membrana popolnoma posuši.

-
15. Kolono QIAamp Mini postavite v čisto 1,5-mililitrsko epruveto za elucijo (priložena) in zavržite 2-mililitrsko epruveto za spiranje iz koraka 13. Previdno nanosite 20–150 µl Buffer AVE na sredino membrane kolone QIAamp Mini. Zaprite pokrov in inkubirajte 3 (± 0,5) minute pri sobni temperaturi.

Pomembno: Poskrbite, da je elucijski Buffer AVE ogret na sobno temperaturo (15–25 °C). Če elucijo izvajate v majhnih količinah (<50 µl), je za popolno elucijo vezanih nukleinskih kislin treba elucijski pufer spustiti na sredino membrane.

Elucijski volumen je mogoče prilagoditi glede na zahteve zaključnih postopkov.

Elucija z manjšimi količinami Buffer AVE vodi do višjih koncentracij nukleinske kisline, vendar lahko povzroči nižji skupni izkoristek.

Dobljen volumen eluata je lahko do 5 µl manjši od elucijskega volumna, nanesenega na kolono QIAamp Mini.

Opomba: Za pričakovane nizke izkoristke NA se za elucijo priporoča uporaba epruvete z nizko vezavo (ni priložena).

16. Za eluiranje nukleinskih kislin centrifugirajte v mikrocentrifugi pri polni hitrosti (20.000 x g; 14.000 vrt / min) 1 minuto.

Kontrola kakovosti

V skladu s sistemom vodenja kakovosti družbe QIAGEN, certificiranim po standardu ISO, se vsaka serija kompletov QIAamp DSP Circulating NA Kits preskusi v skladu z vnaprej določenimi specifikacijami, s čimer se zagotovi stalna kakovost izdelka.

Omejitve

Zmogljivost sistema za izolacijo cirkulacijskih nukleinskih kislin brez celic, je bila določena z vzorci človeške plazme, pridobljenimi iz naslednjih epruvet za kri:

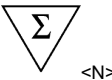












- K2-EDTA (Beckton Dickinson, kat. št. 367525)
- PAXgene Blood ccfDNA Tube (PreAnalytiX, kat. št. 768115)
- Cell-Free DNA BCT (Streck, kat. št. 218962)

Uporabnik je sam odgovoren za potrjevanje učinkovitosti sistema za kakršne koli postopke, izvedene v laboratoriju, ki jih študije učinkovitosti QIAGEN ne zajemajo.

Pri zaključnih postopkih je treba uporabiti zadostne kontrole in tako zmanjšati tveganje za negativen vpliv na diagnostične rezultate. Za nadaljnjo validacijo priporočamo smernice Mednarodne konference o usklajevanju tehničnih zahtev (International Conference on Harmonization of Technical Requirements, ICH) iz publikacije ICH Q2(R1) Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology (Validacija analitičnih postopkov: besedilo in metodologija).

Vsi generirani diagnostični rezultati morajo biti interpretirani v povezavi z drugimi kliničnimi ali laboratorijskimi ugotovitvami.

Simboli

Simbol	Opredelitev simbola
	Vsebuje dovolj reagentov za <N> poskusov
	Uporabno do
	Diagnostični medicinski pripomoček in vitro
	Ob dobavi
	Odprite ob dostavi; Vrtljive kolone QIAamp Mini hranite pri temperaturi 2–8°C
	Kataloška številka
	Številka
	Serijska številka
	Številka materiala
	Komponente
	Volumen
	Dodajanje
	Omejitev temperature



Proizvajalec



Glejte navodila za uporabo



Zapišite tekoči datum, ko v stekleničko dodate etanol



Etanol



Zapišite tekoči datum, ko v stekleničko dodate izopropanol



Izopropanol



Vsebuje



Vodi do



Gvadaninijev tiocianat



Gvanidinijev klorid



BRIJ 58



Globalna trgovinska identifikacijska številka

Reference

1. Levy, B. (2019) *Prenatal Diagnosis*. Methods in Molecular Biology. 2nd ed. New York: Humana Press.
2. 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.
3. 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.
4. Babayan, A. and Pantel, K. (2018) Advances in liquid biopsy approaches for early detection and monitoring of cancer. *Genome Med* **10**, 21.
5. Terrinoni, A., et al (2019) The circulating miRNAs as diagnostic and prognostic markers. *Clin Chem Lab Med*. **57**, 932-953.

Kontaktne podatke

Za tehnično pomoč in več informacij si oglejte naš Center za tehnično podporo na **support.qiagen.com** ali stopite v stik z enim od Oddelkov za tehnično službo QIAGEN ali lokalnimi distributerji (glejte zadnjo platnico ali obiščite spletno mesto **www.qiagen.com**).

Navodila za odpravljanje težav

Ta navodila za odpravljanje težav vam lahko pomagajo pri odpravljanju morebitnih težav. Za kontaktne informacije glejte zadnjo platnico ali obiščite www.qiagen.com.

Pripombe in predlogi

Malo ali nič nukleinske kisline v eluatu

- | | | |
|----|--|--|
| a) | Uporaba nestabilizirane plazme | Nestabilizirani vzorci plazme lahko vodijo do pospešene razgradnje DNA. Priporočamo, da sledite CEN/TS 16835-3:2015. Postopek čiščenja ponovite z novimi vzorci. |
| b) | Podaljšan čas med odvzemom krvi in pripravo plazme | Nukleirane krvničke se lahko razgradijo in v plazmo sprostijo genomsko DNA ter razredčijo ciljno nukleinsko kislino. |
| c) | Vzorci so bili zamrznjeni in odmrznjeni več kot enkrat | Izogibati se je treba ponavljajočemu zamrzovanju in odmrzovanju, ker lahko povzroči razgradnjo DNA. Vedno uporabite sveže vzorce ali enkrat odmrznjene vzorce. |
| d) | Nizka koncentracija ciljne DNA v vzorcih | Vzorci plazme so bili predolgo pušчени na sobni temperaturi. Postopek čiščenja ponovite z novimi vzorci
Opomba: nekateri posamezniki imajo lahko v plazmi nizko koncentracijo nukleinske kisline brez celic; tu je treba izbrati večji volumen vzorca in nizek volumen eluata. |
| e) | Neučinkovita liza vzorca v Buffer ACL | Če je QIAGEN Proteinase K dalj časa izpostavljena povišani temperaturi, lahko izgubi aktivnost. Postopek ponovite z uporabo novih vzorcev in sveže QIAGEN Proteinase K. |
| f) | Mešanica Buffer ACL in nosilca RNA ni dovolj zmešana | Mešanico Buffer ACL in nosilca RNA zmešajte tako, da vsaj 10-krat nežno obrnete epruveto z mešanico Buffer ACL in nosilca RNA. |
| g) | Uporabljen etanol z nižjim odstotkom od 96–100% | Postopek čiščenja ponovite z novimi vzorci in 96–100% etanolom. Ne uporabljajte denaturiranega alkohola, ki vsebuje druge snovi, kot je metanol ali metiletiketon. |
| h) | Napačno pripravljen Buffer ACB | Preverite, ali je bil koncentrat Buffer ACB rekonstituiran s pravilno prostornino izopropanola (ne z etanolom, glejte stran 24). |
| i) | Napačno pripravljen Buffer ACW1 ali Buffer ACW2 | Preverite, ali sta bila koncentrata Buffer ACW1 in Buffer ACW2 razredčena s pravilno prostornino etanola (glejte stran 24). Postopek čiščenja ponovite z novimi vzorci. |
| j) | Buffer ACW1 ali Buffer ACW2 pripravljen s 70% etanolom | Preverite, ali sta bila koncentrata Buffer ACW1 in Buffer ACW2 razredčena z 96–100% etanolom (glejte stran 24). Postopek čiščenja ponovite z novimi vzorci. |

DNA ali RNA pri zaključnih encimskih reakcijah ne delujeta dobro

- | | | |
|----|---|--|
| a) | V eluatu je malo ali nič DNA | Za možne vzroke glejte »Malo ali nič nukleinske kisline v eluatu« zgoraj. Če je možno, povečajte količino eluata, dodanega v reakcijo. |
| b) | Uporabljen neprimeren elucijski volumen | Določite največji volumen eluata, ki je primeren za vaše zaključne postopke. Ustrezno zmanjšajte ali povečajte količino eluata, dodanega v zaključne postopke. Volumen elucije se lahko sorazmerno prilagodi.
Opomba: Elucija z manjšimi količinami Buffer AVE vodi do višjih koncentracij nukleinske kisline, vendar lahko povzroči manjši skupni izkoristek. |

Pripombe in predlogi

- c) Pufri niso temeljito zmešani Komponente soli in etanola Buffer ACW2 za spiranje se lahko ločijo, če dalj časa stojijo med postopki. Pred vsakim postopkom vedno dobro premešajte pufre.
- d) Motnja zaradi nosilca RNA Če prisotnost nosilca RNA v eluatu moti encimsko reakcijo v zaključnih postopkih, bo morda treba zmanjšati količino nosilca RNA ali ga v celoti izpustiti.

Splošno ravnanje

- a) Zamašen kolon QIAamp Mini Če se pretok zmanjša, se lahko podaljša čas vakumiranja. Podredno, če je bil uporabljen, zaprite VacValve in previdno odstranite sklop podaljška kolone – VacConnector – VacValve iz kolone QIAamp Mini, ne da bi pri tem izgubili kakšen lizat v podaljšku kolone. Odstranite kolono QIAamp Mini iz vakuumskega sklopa, položite jo v 2-mililitrsko epruveto za spiranje in jo centrifugirajte pri polni hitrosti, dokler vzorec popolnoma ne preide skozi membrano. Zamenjajte sklop podaljška kolone – VacConnector – VacValve, ki vsebuje preostali lizat. Vključite vakuumsko črpalko, odprite VacValve in nadaljujte z nalaganjem preostalega lizata. Če se kolona QIAamp Mini ponovno zamaši, ponovite zgornji postopek. Zaradi večkratnega zamrzovanja in odmrzovanja se lahko v plazmi pojavijo krioprecipitati. Ti lahko blokirajo kolono QIAamp Mini. Ne uporabljajte plazme, ki je bila zamrznjena in odmrznjena več kot enkrat. Če so krioprecipitati vidni, očistite vzorec s centrifugiranjem 5 minut pri 16000 x g.
- b) Spremenljivi elucijski volumni Na volumen končnega eluata lahko vplivajo različni vzorci. Dobljen volumen eluata je lahko do 5 µl manjši od elucijskega volumna, nanesenega na kolono QIAamp Mini.
- c) Vakuumski tlak –800 do –900 mbar ni dosežen Vakuumski sklop ni tesno zaprt. Ko je vakuum vklopljen, pritisnite pokrov vakuumskega sklopa. Preverite, ali je dosežen vakuumski tlak. Tesnilo pokrova QIAvac se je izrabilo. Vizualno preverite tesnilo sklopa in ga po potrebi zamenjajte. VacValves so se obrabile. Odstranite vse VacValves in vstavite VacConnectors neposredno v podaljške luerja. Vstavite kolone QIAamp Mini v VacConnectors, zaprite pokrov kolon in vključite vakuum. Preverite, ali je dosežen vakuumski tlak. Po potrebi zamenjajte VacValves. Povezava z vakuumsko črpalko ne tesni. Zaprite vse podaljške luerja s čepki luerja in vključite vakuumsko črpalko. Po vklopu črpalke preverite, ali je vakuumski tlak stabilen (in ventil Vacuum Regulator zaprt). Po potrebi zamenjajte povezave med črpalko in vakuumskim sklopom. Če vakuumski tlak še vedno ni dosežen, zamenjajte vakuumsko črpalko z močnejšo.

Dodatek A: Priporočilo za odvajanje in shranjevanje krvne plazme

Za stabilizacijske epruvete za kri (npr. epruveta PAXgene ccfDNA ali epruveta Streck Cell-Free DNA) sledite navodilom proizvajalca za ločevanje in shranjevanje plazme. Priporočamo, da te pogoje shranjevanja uporabljate v kombinaciji z vašimi zaključnimi postopki in glede na ciljno enoto.

Za nestabilizirani BCT priporočamo, da sledite CEN/TS 16835-3: 2015.

Za izolacijo cirkulacijskih nukleinskih kislin brez celic iz vzorcev krvi, priporočamo, da sledite temu protokolu, ki vključuje korak centrifugiranja z visoko g-silo, da odstranite celične naplavine in s tem zmanjšate količino celične ali genomske DNA in RNA v vzorcu.

1. Celotno kri EDTA v epruveh BD Vacutainer® (ali drugih primarnih epruveh za kri, ki vsebujejo EDTA kot antikoagulacijsko sredstvo) postavite v centrifugo, ohlajeno na 4 °C, z vrtljivim rotorjem in ustreznimi vedri.
2. Vzorce krvi centrifugirajte 10 minut pri 1900 x g (3000 vrt/min) pri 4 °C.
3. Previdno aspirirajte supernatant plazme, ne da bi zmotili plazemsko-celični vmesni sloj. Iz ene 10-mililitrske epruvete krvi lahko dobimo približno 4–5 ml plazme.

Opomba: Na tej stopnji se plazma lahko uporablja za ekstrakcijo cirkulacijske nukleinske kisline. Vendar pa bo naslednje hitro centrifugiranje odstranilo dodatni celični drobir in onesnaženje cirkulacijskih nukleinskih kislin z genomsko DNA in RNA iz poškodovanih nukleiziranih krvnih celic.

4. Aspirirana plazma se prenese v svežo centrifugalno epruveto.
5. Vzorce plazme centrifugirajte 10 minut pri 16.000 x g (v rotorju s fiksnim kotom) pri 4 °C. Tako boste odstranili dodatne celične nukleinske kisline, pritrjene na celični drobir.
6. Previdno odstranite supernatant in ga prestavite v novo epruveto, ne da bi zmotili pelet.

-
7. Če se bo plazma istega dne uporabila za ekstrakcijo nukleinske kisline, jo do nadaljnje obdelave hranite pri temperaturi 2–8 °C. Za daljše skladiščenje lahko alikvote plazme iz stabiliziranih kot tudi nestabiliziranih epruвет za kri hranite pri temperaturi –20 °C (ciljanje DNA) ali –80 °C (ciljanje RNA) vsaj štiri tedne. Pred uporabo plazme za ekstrakcijo cirkulacijske nukleinske kisline, odmrznite epruvete plazme na sobni temperaturi.
8. **Izbirno:** Da bi odstranili krioprecipitat, centrifugirajte vzorce plazme 5 minut pri 16.000 x g (v rotorju s fiksnim kotom).

Izbirno: Supernatant prenesite v novo epruveto in nato začnite s protokolom ekstrakcije cirkulacijske nukleinske kisline.

Dodatek B: Splošne opombe glede ravnanja z RNA

Ravnanje z RNA

Ribonukleaze (RNaze) so zelo stabilni in aktivni encimi, ki na splošno ne potrebujejo kofaktorjev za delovanje. Ker je RNaze težko inaktivirati in celo neznatne količine zadoščajo za uničenje RNA, ne uporabljajte nobene plastike ali steklovine, ne da bi najprej odstranili morebitno onesnaženje z RNazo. Paziti je treba, da med postopkom čiščenja ali po njem ne pride do nenamernega vnašanja RNaz v vzorec RNA. Za ustvarjanje in vzdrževanje okolja brez RNaze je treba med pripravo in uporabo posod in raztopin za enkratno in večkratno uporabo pri delu z RNA upoštevati naslednje ukrepe.

Splošno ravnanje

Pri delu z RNA je treba vedno uporabljati pravilno mikrobiološko, aseptično tehniko. Na rokah in prašnih delcih so lahko bakterije in plesni, zato so najpogostejši vir onesnaženja z RNazo. Pri delu z reagenti in vzorci vedno nosite rokavice iz lateksa ali vinila, saj boste tako preprečili onesnaženje z RNazo s površine kože ali prašne laboratorijske opreme. Pogosto menjajte rokavice in naj bodo epruvete zaprte vedno, ko je to mogoče. Ko se alikvoti pipetirajo za zaključne postopke, očiščeno RNA hranite na ledu.

Plastična posoda za enkratno uporabo

V celotnem postopku je priporočljiva uporaba sterilnih polipropilenskih epruvet za enkratno uporabo brez RNaze.

Informacije za naročanje

Izdelek	Vsebina	Kat. št.
QIAamp DSP Circulating NA Kit (50)	Za 50 pripravkov: Kolone QIAamp Mini, podaljški kolon, VacConnectors, QIAGEN Proteinase K, reagenti, pufri in zbiralne epruvete	61504
Pribor		
QIAvac 24 Plus vacuum manifold*	Vakuumski sklop za obdelavo 1–24 vrtljivih kolon: Vakuumski sklop QIAvac 24 Plus Vacuum manifold, čepi luerja in hitre spojke	19413
Vacuum Pump*	Univerzalna vakuumška črpalka	84010 [ZDA in Kanada] 84000 [Japonska] 84020 [ostali svet]
QIAvac Connecting System*	Sistem za povezavo vakuumškega sklopa z vakuumsko črpalko: vključuje pladenj, odpadne stekleničke, epruvete, spojke, ventil, merilnik in 24 VacValves	19419

* Za uporabo z vakuumskimi protokoli.

Posodobljene informacije o licenciranju in zavrnitve odgovornosti za izdelek so na voljo v priročniku ali navodilih za uporabo zadevnega kompleta znamke QIAGEN. Priročniki in navodila za uporabo kompletov znamke QIAGEN so na voljo na spletni strani **www.qiagen.com**, lahko pa jih tudi naročite pri oddelku za tehnične storitve družbe QIAGEN ali lokalnem distributerju.

Priročnik zgodovine revizij

Datum	Spremembe
R4 09/2019	Sprememba namenske uporabe na nukleinske kisline brez celic zgolj iz človeške plazme. Vključevanje „Breeze“ protokola. Protokoli za urin in miRNA niso vključeni. Posodobitev varnostnih informacij.

Sporazum o licenčnih omejitvah za komplet QIAamp DSP Circulating NA Kit

Kupec ali uporabnik izdelka z njegovo uporabo soglaša z naslednjimi pogoji:

- Izdelek se lahko uporablja zgolj v skladu s protokoli, ki so priloženi izdelku, in s to knjižico ter skupaj s sestavnimi deli v kompletu. QIAGEN v okviru svoje intelektualne lastnine ne ponuja licenc za uporabo ali vključitev priloženih sestavnih delov tega kompleta s sestavnimi deli, ki niso priloženi temu kompletu, kot je opisano v protokolih, ki so priloženi izdelku, temu priročniku in dodatnimi protokoli, ki so na voljo na www.qiagen.com. Nekatere od teh dodatnih protokolov so ustvarili uporabniki QIAGEN za uporabnike QIAGEN. Družba QIAGEN teh protokolov ni temeljito testirala ali optimizirala. QIAGEN ne ponuja garancije ali jamstva, da ti ne kršijo pravic drugih strank.
- Razen izrecno navedenih licenc QIAGEN ne jamči, da ta komplet in/ali njegova uporaba ne krši pravic drugih strank.
- Ta komplet in njegovi sestavni deli so licencirani za enkratno uporabo in jih ni dovoljeno ponovno uporabiti, obnoviti ali prodajati naprej.
- QIAGEN zlasti zavrača kakršne koli druge licence, izrecne ali nakazane, razen tistih, ki so izrecno navedene.
- Kupec in uporabnik tega kompleta se strinjata, da ne bosta ukrepala ali dovolila drugim, da ukrepajo v smeri, ki bi vodila v ali omogočala katero od zgoraj prepovedanih dejanj. QIAGEN lahko prepovedi iz tega Sporazuma o licenčnih omejitvah uveljavlja na katerem koli sodišču ter dobi povrnjene vse svoje stroške za preiskavo in sodišče, vključno s stroški za odvetnika, pri katerem koli dejanju za uveljavitev tega Sporazuma o licenčnih omejitvah ali pravice intelektualne lastnine v povezavi s tem kompletom in/ali njegovimi sestavnimi deli.

Za posodobljene licenčne pogoje glejte www.qiagen.com.

Blagovne znamke: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp® (QIAGEN Group); BD Vacutainer® (Becton, Dickinson and Company); Tween® (ICI Americas Inc.). V tem dokumentu uporabljena registrirana imena, blagovne znamke itd. se ne smejo šteti kot nezaščiteni z zakonom, čeprav niso izrecno označena kot takšna.

1118364 10/2019 HB-0466-005 © 2019 QIAGEN, vse pravice pridržane.

