

# QIAamp<sup>®</sup> DSP Circulating NA Kit — Instrukcja użycia (Instrukcja obsługi)



Wersja 2



Do diagnostyki in vitro



61504



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Niemcy



1127632PL

# Spis treści

Przeznaczenie.....	4
Docelowi użytkownicy.....	4
Opis i zasada procedury.....	5
Objętości próbek.....	5
Liza próbek.....	7
Adsorpcja do membrany kolumny QIAamp Mini.....	7
Usuwanie pozostałości zanieczyszczeń.....	7
Elucja czystych kwasów nukleinowych.....	8
Uzysk i rozmiar kwasów nukleinowych.....	8
Opis protokołów.....	9
Podsumowanie i objaśnienie.....	9
Dostarczone materiały.....	10
Zawartość zestawu.....	10
Składniki zestawu.....	11
Materiały wymagane, ale niedostarczane.....	12
Odczynniki dodatkowe.....	12
Materiały eksploatacyjne.....	12
Wyposażenie.....	13
Ostrzeżenia i środki ostrożności.....	14
Informacje dotyczące bezpieczeństwa.....	14
Informacje dotyczące nagłych przypadków.....	15
Środki ostrożności.....	15

<b>Usuwanie .....</b>	<b>16</b>
Przechowywanie i sposób postępowania z odczynnikami.....	17
<b>Stabilność produktu.....</b>	<b>17</b>
Przechowywanie i sposób postępowania z próbkami.....	18
Procedura.....	19
Przygotowanie buforów i odczynników .....	26
Protokół typu Breeze: oczyszczanie krążących kwasów nukleinowych z próbek ludzkiego osocza krwi o objętości 1–5 ml.....	29
Protokół klasyczny: oczyszczanie krążących kwasów nukleinowych z próbek ludzkiego osocza krwi o objętości 1–5 ml.....	35
Kontrola jakości .....	41
Ograniczenia .....	41
Parametry skuteczności .....	42
Literatura .....	43
Rozwiązywanie problemów .....	44
Symbole .....	47
Załącznik A: Zalecenia dotyczące separacji i przechowywania osocza krwi .....	50
Załącznik B: Ogólne uwagi dotyczące postępowania z RNA.....	52
Informacje dotyczące zamawiania.....	53
Historia zmian dokumentu .....	54

## Przeznaczenie

Zestaw QIAamp DSP Circulating NA Kit to system, który wykorzystuje technologię membrany krzemionkowej (technologia QIAamp) do ręcznej izolacji i oczyszczania wolnokrążącego DNA i RNA z próbek osocza krwi ludzkiej.

Zestaw QIAamp DSP Circulating NA Kit jest przeznaczony do diagnostyki in vitro.

## Docelowi użytkownicy

Produkt jest przeznaczony do stosowania przez profesjonalnych użytkowników, takich jak technicy i lekarze przeszkoleni w zakresie technik biologii molekularnej.

## Opis i zasada procedury

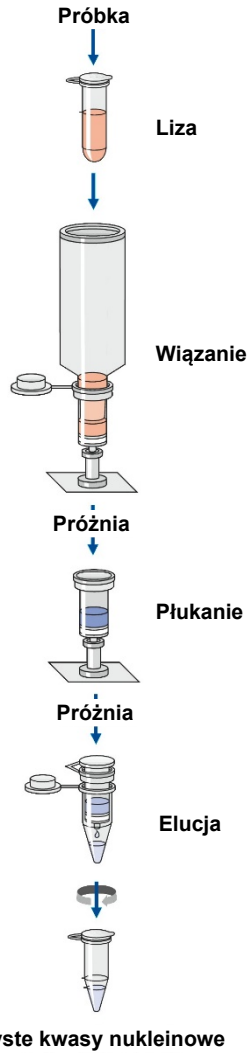
Procedura QIAamp DSP Circulating NA obejmuje 4 etapy (liza, wiązanie, płukanie i elucja) i jest przeprowadzana przy użyciu kolumn QIAamp Mini w systemie QIAvac. Procedura odporna ułatwia zminimalizowanie ryzyka zanieczyszczenia krzyżowego między próbkami i zwiększa bezpieczeństwo użytkownika podczas postępowania z potencjalnie zakaźnymi próbkami.

Procedura prosta jest odpowiednia do równoczesnego przetwarzania do 24 próbek w okresie krótszym niż 2 godziny.

### Objętości próbek

Kolumny QIAamp Mini wiążą fragmenty kwasów nukleinowych o długości nawet tylko 20 nukleotydów, ale uzysk zależy od objętości próbki oraz stężenia krążących kwasów nukleinowych w próbce (zwykle w osoczu stężenie to wynosi 1–100 ng/ml). Procedurę QIAamp DSP Circulating NA zoptymalizowano dla próbek o objętości do 5 ml.

**Procedura zestawu QIAamp  
DSP Circulating NA Kit**



**Ryc. 1. Przegląd procedury zestawu QIAamp DSP Circulating NA Kit.**

## Liza próbek

Wolnokrążące kwasy nukleinowe obecne w płynach ustrojowych są zwykle związane z białkami lub zamknięte w pęcherzykach, co stwarza konieczność wykonania wydajnego etapu lizy w celu uwolnienia kwasów nukleinowych, które będą mogły swoiście związać się z kolumną QIAamp Mini. Z tego względu próbki są poddawane lizie w warunkach wysoce denaturujących w podwyższonych temperaturach w obecności proteiny K i buforu Buffer ACL, co zapewnia inaktywację DNaz i RNaz oraz uwolnienie kwasów nukleinowych od związanych z nimi białek, lipidów i pęcherzyków.

## Adsorpcja do membrany kolumny QIAamp Mini

Aby zapewnić optymalne wiązanie krążących kwasów nukleinowych do membrany, warunki wiązania dostosowuje się poprzez dodanie buforu Buffer ACB do lizatu. Lizaty nanosi się następnie na kolumnę QIAamp Mini, a w miarę przesączania lizatu pod wpływem podciśnienia krążące kwasy nukleinowe są adsorbowane na membranie krzemionkowej z dużej objętości próbki. Sól i środowisko pH zapewniają, że większość białek i innych zanieczyszczeń, które mogą powodować inhibicję reakcji PCR i innych dalszych reakcji enzymatycznych, nie zatrzymuje się na membranie kolumny QIAamp Mini.

Do wykonania tego protokołu wymagany jest kolektor próżniowy (np. QIAvac 24 Plus z systemem QIAvac Connecting System) i pompa próżniowa umożliwiająca wytworzenie podciśnienia ~800–900 mbar (np. QIAGEN® Vacuum Pump). Należy używać regulatora podciśnienia Vacuum Regulator (część systemu QIAvac Connecting System) w celu łatwego monitorowania wartości podciśnienia oraz wygodnego zwalniania podciśnienia.

## Usuwanie pozostałości zanieczyszczeń

Kwasy nukleinowe pozostają związane z membraną, podczas gdy zanieczyszczenia są efektywnie wypłukiwane podczas 3 etapów płukania.

## Elucja czystych kwasów nukleinowych

Elucja jest wykonywana za pomocą buforu Buffer AVE. Podczas jednego etapu wysoce czyste krążące kwasy nukleinowe są eluowane w buforze Buffer AVE, zrównoważonym do temperatury pokojowej. Można zastosować elastyczną objętość elucji z zakresu 50–150  $\mu\text{l}$ . Jeśli wymagane są wyższe stężenia kwasów nukleinowych, objętość elucji można zmniejszyć aż do 20  $\mu\text{l}$ . Objętości elucji mniejsze niż 50  $\mu\text{l}$  umożliwiają uzyskanie eluatów o wyższym stężeniu kwasów nukleinowych, ale mogą spowodować obniżenie całkowitego uzysku.

Odzyskana objętość eluatu może być do 5  $\mu\text{l}$  mniejsza niż objętość buforu do elucji naniesiona na kolumnę.

## Uzysk i rozmiar kwasów nukleinowych

Uzyski wolnokrążących kwasów nukleinowych wyizolowanych z próbek biologicznych zwykle wynoszą mniej niż 1  $\mu\text{g}$ . Z tego względu trudno jest oznaczyć je za pomocą spektrofotometru. Całkowity uzysk krążących DNA i RNA uzyskanych z próbki przy użyciu zestawu QIAamp DSP Circulating NA Kit różni się między próbkami pobranymi od różnych osób, a także zależy od innych czynników (np. od określonych stanów chorobowych). Ponadto istnieje wysokie prawdopodobieństwo, że większą część odczytów absorbancji UV będzie stanowić nośnik RNA obecny w wyizolowanym kwasie nukleinowym (patrz strona 27). W celu określenia uzysków zalecane jest użycie ilościowych metod amplifikacji.

Rozkład wielkości krążących kwasów nukleinowych oczyszczonych za pomocą zestawu QIAamp DSP Circulating NA Kit można sprawdzić za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym, hybrydyzacji do znakowanej sondy swoistej dla sekwencji docelowej (1) lub elektroforezy w układzie mikroprzepływowym (np. przy użyciu analizatora Agilent® Bioanalyzer).



## Opis protokołów

W niniejszej instrukcji obsługi dostępne są dwa różne protokoły.

- Protokół „Protokół typu Breeze: oczyszczanie krążących kwasów nukleinowych z próbek ludzkiego osocza krwi o objętości 1–5 ml” (na stronie 29) jest przeznaczony do przetwarzania próbek osocza o objętości do 5 ml w etapach po 1 ml i został zoptymalizowany w taki sposób, aby ograniczyć czas pracy manualnej oraz skrócić czas wykonywania protokołu.
- Protokół „Protokół klasyczny: oczyszczanie krążących kwasów nukleinowych z próbek ludzkiego osocza krwi o objętości 1–5 ml” (na stronie 35) jest przeznaczony do przetwarzania próbek osocza o objętości do 5 ml w etapach po 1 ml i jest to niezmieniony protokół z zestawu *QIAamp DSP Circulating NA Kit* w wersji 1 wydania 3 (R3) instrukcji obsługi.

## Podsumowanie i objaśnienie

Wolnokrążące kwasy nukleinowe są obecne w ludzkim osoczu zwykle w postaci krótkich fragmentów, składających się z <1000 par zasad (DNA), <1000 nukleotydów (RNA) lub nawet tylko 20 nukleotydów (miRNA). Stężenie wolnokrążących kwasów nukleinowych w osoczu krwi ludzkiej zazwyczaj jest niskie i znacznie różni się u poszczególnych osób, osiągając w próbkach ludzkich wartości 1–100 ng/ml (2–6).

Zestaw *QIAamp DSP Circulating NA Kit* umożliwia wydajne oczyszczenie krążących kwasów nukleinowych z ludzkiego osocza. Można stosować próbki świeże lub próbki mrożone. Probówki przedłużające (Extension Tubes) oraz próżniowe przetwarzanie próbek wykorzystywane w systemie *QIAvac 24 Plus* umożliwiają zastosowanie wejściowych objętości próbek do 5 ml, a elastyczne objętości elucji od 20 do 150 µl pozwalają na zateżenie rodzajów kwasów nukleinowych, które występują w niskich stężeniach.

Po elucji wolnokrążący genomowy DNA lub RNA jest gotowy do użytku w dalszych procedurach. Można go również przechowywać. Użytkownicy powinni przeprowadzać optymalizację wejściowych objętości osocza oraz objętości elucji przetwarzanych w danym laboratorium, biorąc pod uwagę określoną procedurę docelową oraz dalsze procedury analityczne.

# Dostarczone materiały

## Zawartość zestawu

<b>QIAamp DSP Circulating NA Kit</b>	<b>(50)</b>
<b>Nr katalogowy</b>	<b>61504</b>
<b>Liczba przygotowań</b>	<b>50</b>

	<b>Produkt</b>	<b>Symbole</b>	<b>Ilość</b>
QIAamp Mini	QIAamp Mini columns with Wash Tubes (Kolumny QIAamp Mini z probówkami do płukania) (WT) (2 ml)	<b>COL</b>	50
EXT	Column Extenders (Przedłużacze kolumn) (20 ml)	<b>COL EXT</b>	2 x 25
WT	Wash Tubes (Probówki do płukania) (2 ml)	<b>WASH TUBE</b>	50
ET	Elution Tubes (Probówki do elucji) (1,5 ml)	<b>ELU TUBE</b>	50
VC	VacConnectors	<b>VAC CON</b>	50
ACL*	Lysis Buffer (Bufor do lizy)*	<b>LYS BUF</b>	220 ml
ACB*	Binding Buffer (Bufor do wiązania)* (koncentrat)	<b>BIND BUF CONC</b>	300 ml
ACW1*	Wash Buffer 1 (Bufor płuczący 1)* (koncentrat)	<b>WASH BUF 1 CONC</b>	19 ml
ACW2†	Wash Buffer 2 (Bufor płuczący 2)† (koncentrat)	<b>WASH BUF 2 CONC</b>	13 ml
AVE†	Elution Buffer (Bufor do elucji)† (fioletowe zatyczki)	<b>ELU BUF</b>	5 x 2 ml
PROTK	QIAGEN Proteinase K (Proteinaza K firmy QIAGEN)	<b>PROTK</b>	4 x 7 ml
Carrier	Carrier RNA (czerwone zatyczki)	<b>CAR RNA</b>	310 µg
QIAamp Mini	QIAamp Mini columns with Wash Tubes (Kolumny QIAamp Mini z probówkami do płukania) (WT) (2 ml)	<b>COL</b>	50
	Instrukcja obsługi	<b>H B</b>	1

\* Zawiera sól chaotropową. Patrz strona 14 — **Ostrzeżenia i środki ostrożności.**

† Zawiera azydek sodu jako środek konserwujący.

## Składniki zestawu

Poniżej przedstawiono opis głównych składników zestawu.

**Tabela 1. Składniki aktywne dostarczanych odczynników**

Odczynnik		Składnik aktywny	Stężenie
Symbol	Nazwa		
ACL	Bufor do lizy	Tiocyanian guanidyny	od $\geq 30$ do $< 50\%$ w/w
ACB	Bufor do wiązania (koncentrat)	Tiocyanian guanidyny	od $\geq 30$ do $< 50\%$ w/w
ACW1	Bufor płuczący 1 (koncentrat)	Chlorowodorek guanidyny	od $\geq 30$ do $< 60\%$ w/w
ACW2	Bufor płuczący 2 (koncentrat)	Brak	–
AVE	Bufor do elucji (fioletowe zatyczki)	Brak	–
PROTK	QIAGEN Proteinase K (Proteinaza K firmy QIAGEN)	Proteinaza K	od $\geq 1$ do $< 3\%$ w/w
Carrier	Nośnik RNA (czerwone zatyczki)	Brak	–

## Kontrole i kalibratory

W celu zminimalizowania ryzyka wystąpienia jakichkolwiek czynników mających negatywny wpływ na wyniki diagnostyczne wygenerowane po izolacji kwasu nukleinowego, w dalszych procedurach analitycznych należy stosować odpowiednie kontrole.

# Materiały wymagane, ale niedostarczane

## Odczynniki dodatkowe

- Etanol (96–100%)\*
- Izopropanol (100%)
- Kruszony lód (wyłącznie w przypadku protokołu „Protokół klasyczny: oczyszczanie krążących kwasów nukleinowych z próbek ludzkiego osocza krwi o objętości 1–5 ml”).
- Niektóre próbki mogą wymagać rozcieńczenia fizjologicznym roztworem soli buforowanym fosforanem (Phosphate-Buffered Saline, PBS)

## Materiały eksploatacyjne

- Pipety (z regulacją)
- Jałowe końcówki do pipet (w celu uniknięcia zanieczyszczenia krzyżowego zalecane jest stosowanie końcówek do pipet z barierami aerozolowymi)
- Mikropróbówki wolne od nukleaz o pojemności od 1,5 do 2 ml
- Probówki wirówkowe o pojemności 50 ml

\* Nie używać alkoholu denaturowanego, który zawiera inne substancje, takie jak metanol lub keton metylo-etylowy.

## Wyposażenie

- Łaźnia wodna lub blok grzewczy, do którego można włożyć probówki wirówkowe o pojemności 50 ml i ogrzewać je w temperaturze 56°C lub 60°C\*
- Blok grzewczy lub podobny wyrób, do którego można włożyć probówki do płukania o pojemności 2 ml i ogrzewać je w temperaturze 56°C (wyłącznie w przypadku protokołu klasycznego)\*
- Wyrząsarka
- Mikrowirówka (z rotorem na probówki o pojemności 2 ml)\*
- Kolektor QIAvac 24 Plus vacuum manifold (nr kat. 19413)
- System QIAvac Connecting System (nr kat. 19419) lub równoważny system
- Pompa Vacuum Pump (nr kat. 84010 (USA i Kanada), 84000 (Japonia) lub 84020 (pozostałe kraje)) lub równoważna pompa umożliwiająca wytworzenie podciśnienia od -800 do -900 mbar
- Opcjonalnie: zawory VacValves (nr kat. 19408)

\* Upewnić się, że aparaty zostały sprawdzone i skalibrowane zgodnie z wytycznymi producenta.

## Ostrzeżenia i środki ostrożności

Należy pamiętać, że może być wymagane zapoznanie się z lokalnymi przepisami dotyczącymi zgłaszania poważnych incydentów, które wystąpiły w związku z wyrobem, producentowi oraz właściwemu organowi państwa, w którym przebywa użytkownik i/lub pacjent.

Do diagnostyki in vitro

### Informacje dotyczące bezpieczeństwa

Podczas pracy z substancjami chemicznymi należy zawsze nosić odpowiedni fartuch laboratoryjny, rękawiczki jednorazowe i okulary ochronne. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z odpowiednimi kartami charakterystyki (Safety Data Sheets, SDS). Są one dostępne online w wygodnym i kompaktowym formacie PDF pod adresem [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety). Na tej stronie można wyszukiwać, wyświetlać i drukować karty charakterystyki dla wszystkich zestawów i składników zestawów firmy QIAGEN.

**OSTRZEŻENIE** Ryzyko obrażeń ciała



NIE dolewać wybielacza ani roztworów kwasowych bezpośrednio do odpadów powstałych po przygotowaniu próbek.

Bufory Buffer ACL, Buffer ACB i Buffer ACW1 zawierają sole guanidyny, które w połączeniu z wybielaczem mogą tworzyć wysoce reaktywne związki.

W przypadku rozlania płynu zawierającego te bufory należy usunąć go za pomocą odpowiedniego detergentu laboratoryjnego i wody. Jeśli rozlany płyn zawiera czynniki potencjalnie zakaźne, należy wyczyścić zalany obszar najpierw detergentem laboratoryjnym i wodą, a następnie 1-procentowym (stężenie objętościowe) podchlorynem sodu.

- Próbkki są potencjalnie zakaźne. Pozostałości próbek i odczynników używanych do oznaczenia należy utylizować zgodnie z lokalnymi procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa.

## Informacje dotyczące nagłych przypadków

CHEMTREC

Stany Zjednoczone i Kanada: 1-800-424-9300

Poza Stanami Zjednoczonymi i Kanadą: +1 703-527-3887

## Środki ostrożności

Do składników zestawu QIAamp DSP Circulating NA Kit mają zastosowanie następujące zwroty wskazujące na zagrożenia i określające środki ostrożności.

### Buffer ACB



Zawiera: tiocyjanian guanidyny. Niebezpieczeństwo! Działa szkodliwie po połknięciu. Może działać szkodliwie w kontakcie ze skórą lub w przypadku wdychania. Powoduje poważne oparzenia skóry i uszkodzenie wzroku. Działa szkodliwie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki. W kontakcie z kwasami uwalnia bardzo toksyczne gazy. Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy. W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są założone i można je łatwo usunąć. Nadal płukać. Natychmiast skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUC lub lekarzem.

### Buffer ACL



Zawiera: tiocyjanian guanidyny. Niebezpieczeństwo! Działa szkodliwie po połknięciu. Może działać szkodliwie w kontakcie ze skórą lub w przypadku wdychania. Powoduje poważne oparzenia skóry i uszkodzenie wzroku. Działa szkodliwie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki. W kontakcie z kwasami uwalnia bardzo toksyczne gazy. Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy. W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są założone i można je łatwo usunąć. Nadal płukać. Natychmiast skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUC lub lekarzem.

### Buffer ACW1



Zawiera: chlorowodorek guanidyny. Ostrzeżenie! Działa szkodliwie po połknięciu lub w następstwie wdychania. Działa drażniąco na skórę. Powoduje poważne podrażnienie oczu. Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy. Zanieczyszczoną odzież zdjąć i wyprać przed ponownym użyciem. Zawartość/pojemnik usuwać w zatwierdzonym zakładzie przetwarzania odpadów.

## Proteinase K



Zawiera: proteinazę K. Niebezpieczeństwo! Powoduje łagodne podrażnienie skóry. Może powodować objawy alergii lub astmy albo trudności w oddychaniu w następstwie wdychania. Unikać wdychania pyłu/dymu/gazu/mgły/par/rozpylonej cieczy. Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy. Stosować indywidualne środki ochrony dróg oddechowych. W przypadku narażenia lub problemów: Skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ lub z lekarzem. Wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić mu warunki do swobodnego oddychania. Zawartość/pojemnik usuwać w zatwierdzonym zakładzie przetwarzania odpadów.

## Usuwanie

W odpadach znajdują się pozostałości próbek i odczynników. Odpady tego typu mogą zawierać materiał toksyczny lub zakaźny i należy je usuwać w odpowiedni sposób. Informacje o odpowiednich procedurach usuwania odpadów są zawarte w lokalnych przepisach dotyczących bezpieczeństwa.

W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z odpowiednimi kartami charakterystyki (Safety Data Sheets, SDS). Są one dostępne online w formacie PDF pod adresem [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety). Na tej stronie można wyszukiwać, wyświetlać i drukować karty SDS wszystkich zestawów i składników zestawów firmy QIAGEN.



# Przechowywanie i sposób postępowania z odczynnikami

Kolumny QIAamp Mini należy przechowywać w postaci suchej w temperaturze 2–8°C. Wszystkie bufora należy przechowywać w temperaturze pokojowej (15–25°C). Kolumny QIAamp Mini i bufora można przechowywać w tych warunkach do terminu ważności podanego na opakowaniu zestawu; nie wykazano obniżenia skuteczności tych produktów w przypadku przestrzegania tych zaleceń.

Liofilizowany nośnik RNA należy przechowywać w temperaturze pokojowej (15–25°C) do terminu ważności podanego na etykiecie składnika. Nośnik RNA należy rozpuścić w buforze Buffer AVE; rozpuszczony nośnik RNA należy niezwłocznie dodać do buforu Buffer ACL zgodnie z opisem na stronie 30 dla protokołu typu Breeze oraz na stronie 36 dla protokołu klasycznego. Roztwór używany w protokole powinien być świeżo przygotowany. Niewykorzystane pozostałości nośnika RNA rozpuszczonego w buforze Buffer AVE należy podzielić na porcje i zamrozić w temperaturze od –30°C do –15°C.

Zestaw QIAamp DSP Circulating NA Kit zawiera gotowy do użycia roztwór proteinazy K rozpuszczonej w buforze do przechowywania o specjalnie opracowanym składzie. Roztwór proteinazy K przechowywany w temperaturze pokojowej (15–25°C) jest stabilny do terminu ważności podanego na etykiecie składnika.

## Stabilność produktu

Zestaw może być używany przez 12 miesięcy od pierwszego użycia lub do upływu terminu ważności, cokolwiek nastąpi wcześniej.

# Przechowywanie i sposób postępowania z próbkami

## Przechowywanie i sposób postępowania z krwią

Aby uniknąć rozkładu wolnokrążących kwasów nukleinowych i uwolnienia komórkowych kwasów nukleinowych, zalecane jest, aby krew pełna była przechowywana w temperaturze 2–8°C przez maksymalnie 6 godz. (np. próbki z dodatkiem EDTA). W przypadku korzystania z próbek do pobierania krwi ze stabilizatorem należy wziąć pod uwagę podane przez producenta informacje dotyczące warunków przechowywania. Zalecamy zwalidowanie tych warunków przechowywania w połączeniu z określoną dalszą procedurą i cząsteczką docelową.

## Przechowywanie i sposób postępowania z osoczem

W przypadku używania EDTA jako antykoagulantu bezzwłocznie po pobraniu krwi zalecane jest przeprowadzenie separacji osocza i izolacji kwasów nukleinowych, szczególnie w przypadku RNA. W przypadku przechowywania krótkoterminowego — osocze można przechowywać w temperaturze 2–8°C przez maksymalnie 24 godziny.

W przypadku przechowywania długoterminowego — porcje osocza pozyskanego z próbek do pobierania krwi ze stabilizatorami oraz bez stabilizatorów można przechowywać w temperaturze –20°C lub –80°C przez maksymalnie 12 miesięcy (tylko w przypadku materiału docelowego DNA) lub w temperaturze –80°C przez maksymalnie 4 tygodnie (w przypadku materiału docelowego RNA).

## Przechowywanie kwasów nukleinowych po elucji

Kwasy nukleinowe po elucji zbiera się w probówkach do elucji o pojemności 1,5 ml (dostarczone w zestawie). Oczyszczone krążące kwasy nukleinowe można przechowywać w temperaturze 2–8°C przez maksymalnie 24 godziny. Jeśli czas przechowywania ma przekraczać 24 godziny, zalecane jest, aby DNA lub RNA wykorzystywane na potrzeby dalszych procedur analitycznych były przechowywane odpowiednio w temperaturze od –30°C do –15°C (DNA) lub od –90°C do –60°C (RNA).

# Procedura

## Ważne informacje przed rozpoczęciem

### System QIAvac 24 Plus

System QIAvac 24 Plus jest przeznaczony do szybkiego i wydajnego próżniowego przetwarzania do 24 kolumn wirówkowych firmy QIAGEN jednocześnie. Próbkę i roztwory do płukania są przesączone przez membrany kolumn przy zastosowaniu podciśnienia, a nie wirowania, co skraca czas procedury oczyszczania i czas pracy manualnej.

System QIAvac 24 Plus w połączeniu z systemem QIAvac Connecting System może być używany jako system do przesączania. Przesączony próbkę jest zbierany w odrębnej butelce na odpady.

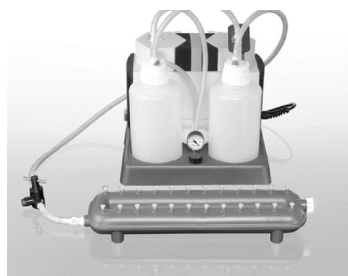
W celu konserwacji systemu QIAvac 24 Plus należy zapoznać się z dokumentem *QIAvac 24 Plus — Instrukcja obsługi*.

### Przetwarzanie kolumn QIAamp Mini w systemie QIAvac 24 Plus

Kolumny QIAamp Mini są przetwarzane w systemie QIAvac 24 Plus przy użyciu jednorazowych złączy VacConnector oraz zaworów VacValve wielorazowego użytku. Zawory VacValve (opcjonalne) są wkładane bezpośrednio w złącza Luer kolektora systemu QIAvac 24 Plus i zapewniają jednolite natężenie przepływu, ułatwiając równoległe przetwarzanie różnych objętości próbek. Należy ich używać w celu zapewnienia jednolitego podciśnienia, jeśli wartości natężenia przepływu próbek znacząco się różnią. Złącza VacConnector to jednorazowe złącza, które są dopasowywane między kolumnami QIAamp Mini a zaworami VacValve lub między kolumnami QIAamp Mini a złączami Luer systemu QIAvac 24 Plus. Uniemożliwiają one bezpośredni kontakt kolumny wirówkowej z zaworem VacValve podczas oczyszczania, co zapobiega zanieczyszczeniu krzyżowemu próbek. Złącza VacConnector są użytkowane po jednym użyciu. Ze względu na to, że stosowane są duże objętości roztworów, wymagane jest korzystanie z systemu QIAvac Connecting System (lub podobnego układu z butelkami na odpady) (patrz Ryc. 2).

## Wytyczne dotyczące postępowania z systemem QIAvac 24 Plus

- System QIAvac 24 Plus musi być zawsze położony na bezpiecznym stole roboczym lub w bezpiecznym obszarze roboczym. Jeśli system zostanie upuszczony, może dojść do pęknięcia kolektora QIAvac 24 Plus.
- Przechowywany system QIAvac 24 Plus zawsze powinien być czysty i suchy. Odpowiednie procedury czyszczenia można znaleźć w *instrukcji obsługi systemu QIAvac 24 Plus*.
- Komponenty systemu QIAvac 24 Plus nie są odporne na działanie niektórych rozpuszczalników (Tabela 2). W przypadku rozlania tych rozpuszczalników na moduł należy dokładnie spłukać go wodą.
- Aby zapewnić jednolitą skuteczność, nie należy nakładać smaru silikonowego lub próżniowego na żadną część kolektora QIAvac 24 Plus.
- Podczas pracy w pobliżu kolektora próżniowego pod ciśnieniem należy zawsze zachowywać ostrożność i nosić okulary ochronne.
- Aby uzyskać informacje dotyczące części zapasowych lub wymiennych, należy skontaktować się z serwisem technicznym firmy QIAGEN lub lokalnym dystrybutorem firmy QIAGEN.
- Podciśnienie to ciśnienie różnicowe między wnętrzem kolektora próżniowego a atmosferą (standardowe ciśnienie atmosferyczne o wartości 1013 milibarów lub 760 mm Hg), które można zmierzyć za pomocą systemu QIAvac Connecting System (patrz Ryc. 2). Do wykonania protokołów wymagana jest pompa próżniowa umożliwiająca wytworzenie podciśnienia o wartości od -800 do -900 mbar (np. pompa QIAGEN Vacuum Pump). Należy unikać wyższych wartości podciśnienia. Zastosowanie podciśnienia o wartości niższej niż wartości zalecane może zmniejszyć uzysk kwasów nukleinowych i obniżyć ich czystość, a także zwiększyć ryzyko zatkania membran.



Ryc. 2. Systemy QIAvac 24 Plus i QIAvac Connecting System oraz pompa Vacuum Pump.

**Tabela 2. Odporność chemiczna systemu QIAvac 24 Plus**

Odporność na		Brak odporności na
Kwas octowy	Sole chaotropowe	Benzen
Kwas chromowy	Stężone alkohole	Fenol
SDS	Chlorek sodu	Chloroform
Tween™ 20	Mocznik	Toluen
Wybielacz chlorowy	Kwas chlorowodorowy	Etery
Wodorotlenek sodu		

## Ustawianie kolektora próżniowego QIAvac 24 Plus Vacuum Manifold

1. Podłączyć system QIAvac 24 Plus do źródła podciśnienia. Jeśli używany jest system QIAvac Connecting System, podłączyć system do kolektora i źródła podciśnienia w sposób opisany w Załączniku A do dokumentu *QIAvac 24 Plus — Instrukcja obsługi*.
2. Włożyć zawór VacValve (opcjonalny) do każdego używanego złącza Luer systemu QIAvac 24 Plus (patrz Ryc. 3). Zamknąć nieużywane złącza Luer zatyczkami Luer lub zamknąć włożony zawór VacValve.  

Zaworów VacValve należy używać w celu zapewnienia jednolitego podciśnienia, jeśli wartości natężenia przepływu próbek różnią się znacząco.
3. Włożyć złącze VacConnector do każdego zaworu VacValve (patrz Ryc. 3).  

Etap ten należy wykonać tuż przed rozpoczęciem oczyszczania, aby uniknąć narażenia złączy VacConnector na potencjalne zanieczyszczenia obecne w powietrzu.
4. Umieścić kolumny QIAamp Mini w złączach VacConnector na kolektorze (patrz Ryc. 3).  
**Uwaga:** Zachować probówkę do płukania z opakowania blistrowego do użytku w protokole oczyszczania.
5. Włożyć przedłużacz kolumny (20 ml) do każdej kolumny QIAamp Mini (patrz Ryc. 3).  
**Uwaga:** Należy upewnić się, że przedłużacz kolumny został prawidłowo włożony do kolumny QIAamp Mini, aby nie dopuścić do wycieku próbki.

6. Postępować zgodnie z instrukcjami zawartymi w protokołach, aby oczyścić kwasy nukleinowe. Po użyciu złącza VacConnector należy je zutylizować w odpowiedni sposób.

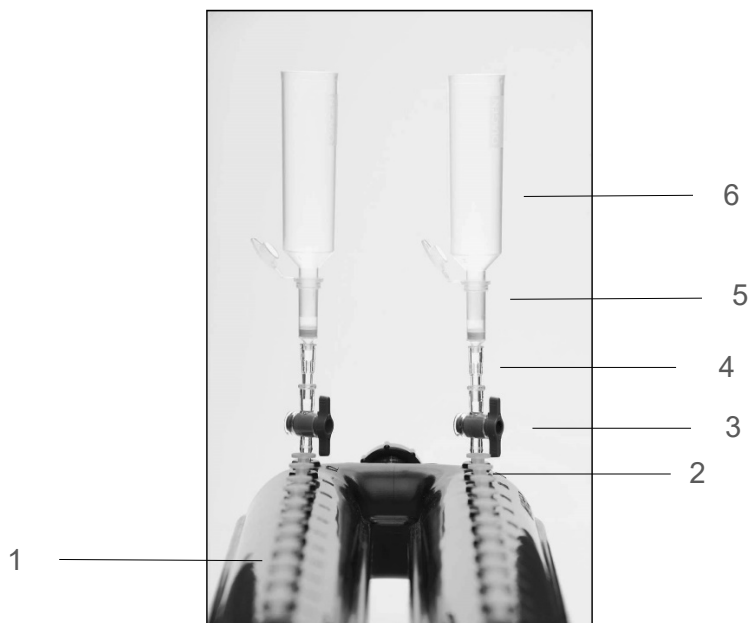
Gdy włączone jest podciśnienie, wieczko kolumny QIAamp Mini musi być otwarte.

Między etapami należy wyłączać podciśnienie, aby zapewnić jednolite, równomierne podciśnienie podczas przetwarzania. W celu szybszego zwalniania podciśnienia należy używać regulatora podciśnienia Vacuum Regulator (część systemu QIAvac Connecting System).

**Uwaga:** Po przesączeniu całej objętości próbki przez kolumnę wirówkową można zamknąć odpowiedni zawór VacValve, co umożliwi równoległe przetwarzanie próbek o różnych objętościach i różnych lepkościach.

7. Po przetworzeniu próbek należy oczyścić system QIAvac 24 Plus (patrz sekcja „Czyszczenie i odkażanie systemu QIAvac 24 Plus” w dokumencie *QIAvac 24 Plus — Instrukcja obsługi*).

**Uwaga:** Bufory ACL, ACB i ACW1 nie są zgodne ze środkami dezynfekującymi, które zawierają wybielacz. Patrz strona 14 — Ostrzeżenia i środki ostrożności.

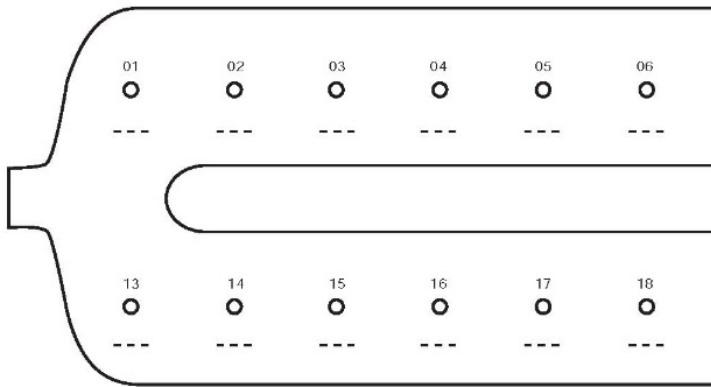


**Ryc. 3. Ustawianie systemu QIAvac 24 Plus z kolumnami QIAamp Mini przy użyciu zaworów VacValve, złączy VacConnector i przedłużaczy kolumn.**

- |          |  |          |                     |
|----------|--|----------|---------------------|
| <b>1</b> | Kolektor próżniowy QIAvac 24 Plus Vacuum Manifold            | <b>4</b> | Złącze VacConnector |
| <b>2</b> | Złącze Luer systemu QIAvac 24 Plus (zamknięte zatyczką Luer) | <b>5</b> | Kolumna QIAamp Mini |
| <b>3</b> | Zawór VacValve*  | <b>6</b> | Przedłużacz kolumny |

Zalecane jest, aby próbki i kolumny QIAamp Mini przeznaczone do użycia w systemie próżniowym QIAvac 24 Plus oznaczyć zgodnie ze schematem przedstawionym na Ryc. 4 w celu uniknięcia pomieszania próbek. Można skopiować tę rycinę i oznakować nazwami próbek.

\* Należy zakupić osobno.

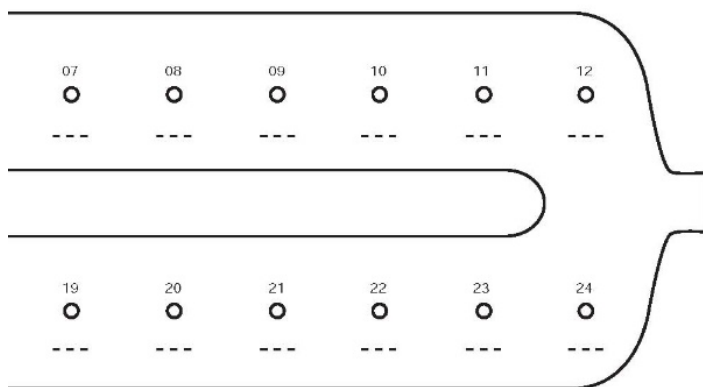


Data: \_\_\_\_\_

Operator: \_\_\_\_\_

Id. cyklu: \_\_\_\_\_





**Ryc. 4. Schemat oznaczania probówek i kolumn QIAamp Mini przeznaczonych do użycia w systemie próżniowym QIAvac 24 Plus.**

# Przygotowanie buforów i odczynników

## Buffer ACB

Przed użyciem dodać 200 ml izopropanolu (100%) do 300 ml koncentratu buforu Buffer ACB, aby uzyskać 500 ml buforu Buffer ACB. Dobrze wymieszać mieszaninę uzyskaną po dodaniu izopropanolu.

## Buffer ACW1\*

Przed użyciem dodać 25 ml etanolu (96–100%) do 19 ml koncentratu buforu Buffer ACW1, aby uzyskać 44 ml buforu Buffer ACW1. Dobrze wymieszać mieszaninę uzyskaną po dodaniu etanolu.

## Buffer ACW2†

Przed użyciem dodać 30 ml etanolu (96–100%) do 13 ml koncentratu buforu Buffer ACW2, aby uzyskać 43 ml buforu Buffer ACW2. Dobrze wymieszać mieszaninę uzyskaną po dodaniu etanolu.

## Dodawanie nośnika RNA do buforu Buffer ACL\*

Nośnik RNA spełnia 2 funkcje: po pierwsze wzmacnia wiązanie kwasów nukleinowych do membrany kolumny QIAamp Mini, zwłaszcza jeśli w próbce jest bardzo mało cząsteczek docelowych. Po drugie dodanie dużych ilości nośnika RNA zmniejsza prawdopodobieństwo rozkładu RNA w rzadkich przypadkach, gdy cząsteczki RNaz nie ulegną denaturacji pod wpływem soli chaotropowych i detergentów zawartych w buforze Buffer ACL.

\* Zawiera sól chaotropową. Patrz strona 14 — **Ostrzeżenia i środki ostrożności.**

† Zawiera azydek sodu jako środek konserwujący.

Ilość liofilizowanego nośnika RNA dostarczona w zestawie jest wystarczająca dla objętości buforu Buffer ACL dostarczonej w zestawie. Zalecane stężenie nośnika RNA dostosowano w taki sposób, aby protokół QIAamp DSP Circulating NA mógł być używany jako generyczny system oczyszczania zgodny z wieloma różnymi systemami amplifikacji i nadawał się do szerokiej gamy docelowych cząsteczek RNA i DNA.

Różne systemy amplifikacji różnią się pod kątem wydajności w zależności od całkowitej ilości kwasów nukleinowych obecnych w reakcji. Eluaty z tego zestawu zawierają krążące kwasy nukleinowe i nośnik RNA, a w większości przypadków ilość nośnika RNA znacznie przekracza ilość krążących kwasów nukleinowych. Z tego względu oznaczenie ilościowe wyizolowanych kwasów nukleinowych poprzez odczyt absorpcji UV nie będzie dokładne, gdyż wyniki takich pomiarów zależą w głównej mierze od obecności nośnika RNA.

W celu osiągnięcia najwyższych poziomów czułości w reakcjach amplifikacji może być konieczne zmniejszenie ilości nośnika RNA dodanego do buforu Buffer ACL.

W przypadku systemów amplifikacji, w których stosowane są startery oligo dT, podczas izolacji wolnokrążących kwasów nukleinowych nie należy dodawać nośnika RNA.

Dodać 1550 µl buforu Buffer AVE\* do próbki zawierającej 310 µg liofilizowanego nośnika RNA w celu uzyskania roztworu o stężeniu 0,2 µg/µl. Całkowicie rozpuścić nośnik RNA, podzielić go na równe porcje o objętości odpowiedniej do potrzeb i przechowywać w temperaturze od -30°C do -15°C. Porcji nośnika RNA nie należy wielokrotnie poddawać cyklom zamrażania-rozmrażania.

Należy zwrócić uwagę, że nośnik RNA nie rozpuszcza się w buforze Buffer ACL. Należy go najpierw rozpuścić w buforze Buffer AVE, a następnie dodać do buforu Buffer ACL.

\*Zawiera azydek sodu jako środek konserwujący.

Obliczyć objętość mieszaniny buforu Buffer ACL i nośnika RNA wymaganą do przetworzenia danej partii próbek zgodnie z wartościami przedstawionymi w tabelach odpowiednich protokołów. Wybrać liczbę próbek, które mają być jednocześnie przetwarzane.

Delikatnie wymieszać, odwracając probówkę lub butelkę 10 razy. W celu uniknięcia spienienia nie używać wytrząsarki.

**Uwaga:** Procedura przygotowania próbek jest zoptymalizowana dla maksymalnie 1,0 µg nośnika RNA na próbkę. Jeśli wykazano, że mniejsza ilość nośnika RNA jest lepsza dla systemu amplifikacji użytkownika, należy przenieść tylko wymaganą ilość rozpuszczonego nośnika RNA do próbek zawierających bufor Buffer ACL. Na każdy mikrogram nośnika RNA wymaganego na przygotowanie, dodać 5 µl rozpuszczonego nośnika RNA do buforu Buffer ACL. (Zastosowanie ilości mniejszej niż 1,0 µg nośnika RNA na próbkę może być korzystne i musi zostać poddane walidacji dla każdego konkretnego rodzaju próbki i dalszego oznaczenia).

# Protokół typu Breeze: oczyszczanie krążących kwasów nukleinowych z próbek ludzkiego osocza krwi o objętości 1–5 ml

Protokół jest przeznaczony do oczyszczania krążącego DNA i RNA z próbek ludzkiego osocza krwi o objętości 1–5 ml i został zoptymalizowany w taki sposób, aby ograniczyć czas pracy manualnej oraz skrócić czas wykonywania protokołu. W przypadku istniejących, zwalidowanych przez użytkownika procedur, w których używana jest wersja 1/R3 zestawu QIAamp DSP Circulating NA Kit, należy zapoznać się z częścią „Protokół klasyczny: oczyszczanie krążących kwasów nukleinowych z próbek ludzkiego osocza krwi o objętości 1–5 ml” (na stronie 35).

## Ważne informacje przed rozpoczęciem

- Wszystkie etapy odwirowywania należy przeprowadzać w temperaturze pokojowej (15–25°C).
- Między etapami należy wyłączać podciśnienie, aby zapewnić jednolite, równomierne podciśnienie podczas wszystkich etapów protokołu.  
**Uwaga:** Ciśnienie wytwarzane przez pompę Vacuum Pump powinno wynosić od –800 do –900 mbar.
- Doprowadzić próbki do temperatury pokojowej.
- Uzupelnąć objętość próbki do najbliższej pełnej objętości (od 1 do 5 ml), dolewając do niej buforu PBS.
- Ustawić system QIAvac 24 Plus w sposób opisany na stronie 21.
- Ogrzać łąźnię wodną lub blok grzewczy do temperatury 56°C w celu użycia go na etapie 3 z próbkami wirówkowymi o pojemności 50 ml.
- Przed użyciem doprowadzić kolumny wirówkowe QIAamp Mini do temperatury pokojowej, pozostawiając je w takiej temperaturze na co najmniej 1 godzinę.
- Upewnić się, że przygotowano bufor Buffer ACB, bufor Buffer ACW1 i bufor Buffer ACW2 (dodanie izopropanolu lub etanolu) zgodnie z instrukcjami na stronie 26.
- Dodać zrekonstruowany w buforze Buffer AVE nośnik RNA do buforu Buffer ACL zgodnie z instrukcjami zawartymi w Tabeli 3.

**Tabela 3. Objętość buforu Buffer ACL i nośnika RNA (rozpuszczonego w buforze Buffer AVE) wymagana do przetworzenia próbek osocza krwi ludzkiej o objętości 1–5 ml**

Przygotowanie na ml osocza	A	B	C	D	E	
	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	
Liczba próbek	Bufor Buffer ACL (ml)					Nośnik RNA w buforze Buffer AVE (µl)
1	0,9	1,8	2,6	3,5	4,4	5,6
2	1,8	3,5	5,3	7,0	8,8	11,3
3	2,6	5,3	7,9	10,6	13,2	16,9
4	3,5	7,0	10,6	14,1	17,6	22,5
5	4,4	8,8	13,2	17,6	22,0	28,1
6	5,3	10,6	15,8	21,1	26,4	33,8
7	6,2	12,3	18,5	24,6	30,8	39,4
8	7,0	14,1	21,1	28,2	35,2	45,0
9	7,9	15,8	23,8	31,7	39,6	50,6
10	8,8	17,6	26,4	35,2	44,0	56,3
11	9,7	19,4	29,0	38,7	48,4	61,9
12	10,6	21,1	31,7	42,2	52,8	67,5
13	11,4	22,9	34,3	45,8	57,2	73,1
14	12,3	24,6	37,0	49,3	61,6	78,8
15	13,2	26,4	39,6	52,8	66,0	84,4
16	14,1	28,2	42,2	56,3	70,4	90,0
17	15,0	29,9	44,9	59,8	74,8	95,6
18	15,8	31,7	47,5	63,4	79,2	101,3
19	16,7	33,4	50,2	66,9	83,6	106,9
20	17,6	35,2	52,8	70,4	88,0	112,5
21	18,5	37,0	55,4	73,9	92,4	118,1
22	19,4	38,7	58,1	77,4	96,8	123,8
23	20,2	40,5	60,7	81,0	101,2	129,4
24	21,1	42,2	63,4	84,5	105,6	135,0

## Procedura: Protokół typu Breeze

1. Za pomocą pipety przenieść produkt QIAGEN Proteinase K, osocze i bufor Buffer ACL, **w tej kolejności**, do próbki wirówkowej o pojemności 50 ml (niedostarczona).

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

2. Zamknąć zatyczką i wymieszać zawartość próbki, wytrząsając ją pulsacyjnie 5 razy po 2 sekundy.

Upewnić się, że w próbce tworzy się widoczny wir. W celu zapewnienia skutecznego przeprowadzenia lizy kluczowe jest, aby próbka i bufor Buffer ACL były dobrze wymieszane i tworzyły jednorodny roztwór.

**Uwaga:** Nie przerywać procedury w tym momencie. Bezzwłocznie przejść do etapu 3, aby rozpocząć inkubację w celu lizy.

3. Inkubować w temperaturze 56°C (±1°C) przez 15 (±1) minut.
4. Umieścić próbkę na stole laboratoryjnym, a następnie odkręcić zatyczkę.
5. Dodać bufor Buffer ACB do lizatu znajdującego się w próbce. Dobrać objętość odpowiednio do ustawienia z etapu 1.

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

6. Zamknąć zatyczką i dokładnie wymieszać zawartość próbki, wytrząsając ją pulsacyjnie 5 razy po 2 sekundy.

Upewnić się, że w próbce tworzy się widoczny wir. W celu zapewnienia skutecznego przeprowadzenia lizy kluczowe jest, aby lizat i bufor Buffer ACB były dobrze wymieszane i tworzyły jednorodny roztwór.

7. Mieszaninę lizatu i buforu Buffer ACB inkubować w probówce przez 5 ( $\pm$ 1) minut w temperaturze pokojowej.
8. Włożyć kolumnę QIAamp Mini do złącza VacConnector w systemie QIAvac 24 Plus (patrz część „Ustawianie kolektora próżniowego QIAvac 24 Plus Vacuum Manifold”, strona 21). Włożyć przedłużacz kolumny o pojemności 20 ml do otwartej kolumny QIAamp Mini.

Należy upewnić się, że przedłużacz kolumny został prawidłowo włożony do kolumny QIAamp Mini, aby nie dopuścić do wycieku próbki.

**Uwaga:** Zachować probówkę do płukania do użycia w celu odwirowania do sucha w etapie 13.

9. Ostrożnie nanieść lizat z etapu 7 na przedłużacz kolumny QIAamp Mini. Włączyć pompę próżniową. Po całkowitym przesączeniu wszystkich lizatów przez kolumny wyłączyć pompę próżniową i zwolnić ciśnienie do 0 mbar. Ostrożnie zdjąć i wyrzucić przedłużacz kolumny.

Należy pamiętać, że przejście lizatów próbek o dużych objętościach (około 18 ml w przypadku wyjściowej objętości próbki równej 5 ml) przez membranę QIAamp Mini przy użyciu siły podciśnienia może zająć nawet 20 min.

W celu szybszego i wygodnego zwalniania podciśnienia należy używać regulatora podciśnienia Vacuum Regulator (część systemu QIAvac Connecting System).

**Uwaga:** Aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego, należy uważać, by podczas wyjmowania przedłużaczy kolumn nie zanieczyścić sąsiadujących ze sobą kolumn QIAamp Mini.

10. Nanieść 600  $\mu$ l buforu Buffer ACW1 na kolumnę QIAamp Mini. Pozostawić otwarte wieczko kolumny i włączyć pompę próżniową. Po przesączeniu całej objętości buforu Buffer ACW1 przez kolumnę QIAamp Mini wyłączyć pompę próżniową i zwolnić ciśnienie do 0 mbar.



11. Nanieść 750 µl buforu Buffer ACW2 na kolumnę QIAamp Mini. Pozostawić otwarte wieczko kolumny i włączyć pompę próżniową. Po przesączeniu całej objętości buforu Buffer ACW2 przez kolumnę QIAamp Mini wyłączyć pompę próżniową i zwolnić ciśnienie do 0 mbar.
12. Nanieść 750 µl etanolu (96–100%) na kolumnę QIAamp Mini. Pozostawić otwarte wieczko kolumny i włączyć pompę próżniową. Po przesączeniu całej objętości etanolu przez kolumnę wirówkową wyłączyć pompę próżniową i zwolnić ciśnienie do 0 mbar.
13. Zamknąć wieczko kolumny QIAamp Mini. Wyciągnąć kolumnę z kolektora próżniowego i wyrzucić złącze VacConnector. Umieścić kolumnę QIAamp Mini w czystej probówce do płukania o pojemności 2 ml (z kroku 8) i wirować ją przy maksymalnej prędkości (20 000 x g; 14 000 rpm) przez 3 (±0,5) minuty.
14. Umieścić kolumnę QIAamp Mini w nowej probówce do płukania o pojemności 2 ml. Otworzyć wieczko i inkubować zespół w temperaturze pokojowej przez 3 min w celu całkowitego osuszenia membrany.
15. Umieścić kolumnę QIAamp Mini w czystej probówce do elucji o pojemności 1,5 ml (dostarczona) i wyrzucić probówkę do płukania o pojemności 2 ml z etapu 14. Ostrożnie nanieść 20–150 µl buforu Buffer AVE na środek membrany kolumny QIAamp Mini. Zamknąć wieczko i inkubować w temperaturze pokojowej przez 3 (±0,5) minuty.

**Ważne:** Upewnić się, że bufor do elucji Buffer AVE jest doprowadzony do temperatury pokojowej (15–25°C). Jeśli elucja jest przeprowadzana w małych objętościach (<50 µl), bufor do elucji należy podać na środek membrany w celu całkowitej elucji związanych kwasów nukleinowych.

Objętość elucji jest elastyczna i można ją dostosowywać odpowiednio do wymogów dalszych procedur.

Przeprowadzanie elucji w mniejszych objętościach buforu Buffer AVE prowadzi do uzyskania większego stężenia kwasów nukleinowych, ale może spowodować otrzymanie mniejszego uzysku całkowitego.

Odzyskana objętość eluatu może być do 5 µl mniejsza niż objętość buforu do elucji naniesiona na membranę kolumny QIAamp Mini.

**Uwaga:** Jeśli oczekiwany jest niski uzysk kwasów nukleinowych, podczas elucji zalecane jest stosowanie probówek typu Low-bind (niedostarczone).

16. Wirować w mikrowirówce przy maksymalnej prędkości (20 000 x g; 14 000 rpm) przez 1 minutę w celu elucji kwasów nukleinowych.

**Uwaga:** Obrócić wieczka probówek do elucji w taki sposób, aby były skierowane w stronę przeciwną do kierunku, w którym obraca się rotor (np. jeśli rotor obraca się zgodnie z ruchem wskazówek zegara, obrócić wieczka w kierunku odwrotnym do ruchu wskazówek zegara).

# Protokół klasyczny: oczyszczanie krążących kwasów nukleinowych z próbek ludzkiego osocza krwi o objętości 1–5 ml

Ten protokół jest niezmiennym protokołem z wydania 3 (R3) dokumentu *QIAamp DSP Circulating NA Kit — Instrukcja obsługi* i jest przeznaczony do użycia np. z istniejącymi, zwalidowanymi przez użytkownika procedurami dla próbek osocza ludzkiego o objętości 1–5 ml.

## Ważne informacje przed rozpoczęciem

- Wszystkie etapy odwirowywania należy przeprowadzać w temperaturze pokojowej (15–25°C).
- Między etapami należy wyłączać podciśnienie, aby zapewnić jednolite, równomierne podciśnienie podczas wszystkich etapów protokołu.  
**Uwaga:** Ciśnienie wytwarzane przez pompę Vacuum Pump powinno wynosić od –800 do –900 mbar.
- Doprowadzić próbki do temperatury pokojowej.
- Uzupełnić objętość próbki do najbliższej pełnej objętości (od 1 do 5 ml), dolewając do niej buforu PBS.
- Ustawić system QIAvac 24 Plus w sposób opisany na stronie 21.
- Ogrzać łąźnię wodną lub blok grzewczy do temperatury 60°C w celu użycia go na etapie 3 z probówkami wirówkowymi o pojemności 50 ml.
- Ogrzać blok grzewczy do temperatury 56°C do użycia na etapie 14 z probówkami do płukania o pojemności 2 ml.
- Przed użyciem doprowadzić kolumny wirówkowe QIAamp Mini do temperatury pokojowej, pozostawiając je w takiej temperaturze na co najmniej 1 godzinę.
- Upewnić się, że przygotowano bufor Buffer ACB, bufor Buffer ACW1 i bufor Buffer ACW2 (dodanie izopropanolu lub etanolu) zgodnie z instrukcjami na stronie 26.
- Dodać zrekonstruowany w buforze Buffer AVE nośnik RNA do buforu Buffer ACL zgodnie z instrukcjami zawartymi w Tabeli 4.

**Tabela 4. Objętość buforu Buffer ACL i nośnika RNA (rozpuszczonego w buforze Buffer AVE) wymagana do przetworzenia próbek osocza krwi ludzkiej o objętości 1–5 ml**

Przygotowanie na ml osocza	A	B	C	D	E	
	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	
Liczba próbek	Bufor Buffer ACL (ml)					Nośnik RNA w buforze Buffer AVE (µl)
1	0,9	1,8	2,6	3,5	4,4	5,6
2	1,8	3,5	5,3	7,0	8,8	11,3
3	2,6	5,3	7,9	10,6	13,2	16,9
4	3,5	7,0	10,6	14,1	17,6	22,5
5	4,4	8,8	13,2	17,6	22,0	28,1
6	5,3	10,6	15,8	21,1	26,4	33,8
7	6,2	12,3	18,5	24,6	30,8	39,4
8	7,0	14,1	21,1	28,2	35,2	45,0
9	7,9	15,8	23,8	31,7	39,6	50,6
10	8,8	17,6	26,4	35,2	44,0	56,3
11	9,7	19,4	29,0	38,7	48,4	61,9
12	10,6	21,1	31,7	42,2	52,8	67,5
13	11,4	22,9	34,3	45,8	57,2	73,1
14	12,3	24,6	37,0	49,3	61,6	78,8
15	13,2	26,4	39,6	52,8	66,0	84,4
16	14,1	28,2	42,2	56,3	70,4	90,0
17	15,0	29,9	44,9	59,8	74,8	95,6
18	15,8	31,7	47,5	63,4	79,2	101,3
19	16,7	33,4	50,2	66,9	83,6	106,9
20	17,6	35,2	52,8	70,4	88,0	112,5
21	18,5	37,0	55,4	73,9	92,4	118,1
22	19,4	38,7	58,1	77,4	96,8	123,8
23	20,2	40,5	60,7	81,0	101,2	129,4
24	21,1	42,2	63,4	84,5	105,6	135,0

## Procedura: Protokół klasyczny

1. Za pomocą pipety przenieść produkt QIAGEN Proteinase K, osocze i bufor Buffer ACL, w tej kolejności, do próbki wirówkowej o pojemności 50 ml (niedostarczona).

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

2. Zamknąć zatyczką i wytrząsać pulsacyjnie przez 30 s.

Upewnić się, że w próbce tworzy się widoczny wir. W celu zapewnienia skutecznego przeprowadzenia lizy kluczowe jest, aby próbka i bufor Buffer ACL były dobrze wymieszane i tworzyły jednorodny roztwór.

**Uwaga:** Nie przerywać procedury w tym momencie. Bezwzględnie przejść do etapu 3, aby rozpocząć inkubację w celu lizy.

3. Inkubować w temperaturze 60°C (±1°C) przez 30 (±2) minut.
4. Umieścić próbkę na stole laboratoryjnym, a następnie odkręcić zatyczkę.
5. Dodać bufor Buffer ACB do lizatu znajdującego się w próbce. Dobrać objętość odpowiednio do ustawienia z etapu 1.

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

6. Zamknąć zatyczką i dokładnie wymieszać zawartość próbki, wytrząsając ją pulsacyjnie przez 30 sekund.

Upewnić się, że w próbce tworzy się widoczny wir. W celu zapewnienia skutecznego przeprowadzenia lizy kluczowe jest, aby lizat i bufor Buffer ACB były dobrze wymieszane i tworzyły jednorodny roztwór.

7. Mieszaninę lizatu i buforu Buffer ACB inkubować w probówce przez 5 ( $\pm$ 1) minut na lodzie.
8. Włożyć kolumnę QIAamp Mini do złącza VacConnector w systemie QIAvac 24 Plus (patrz część „Ustawianie kolektora próżniowego QIAvac 24 Plus Vacuum Manifold”, strona 21). Włożyć przedłużacz kolumny o pojemności 20 ml do otwartej kolumny QIAamp Mini.

Należy upewnić się, że przedłużacz kolumny został prawidłowo włożony do kolumny QIAamp Mini, aby nie dopuścić do wycieku próbki.

**Uwaga:** Zachować probówkę do płukania do użycia w celu odwirowania do sucha w etapie 13.

9. Ostrożnie nanieść lizat z etapu 7 na przedłużacz kolumny QIAamp Mini. Włączyć pompę próżniową, stosując ciśnienie od  $-800$  do  $-900$  mbar. Po całkowitym przesączeniu wszystkich lizatów przez kolumny wyłączyć pompę próżniową i zwolnić ciśnienie do 0 mbar. Ostrożnie zdjąć i wyrzucić przedłużacz kolumny.

Należy pamiętać, że przejście lizatów próbek o dużych objętościach (około 18 ml w przypadku wyjściowej objętości próbki równej 5 ml) przez membranę QIAamp Mini przy użyciu siły podciśnienia może zająć nawet 20 min.

W celu szybszego i wygodnego zwalniania podciśnienia należy używać regulatora podciśnienia Vacuum Regulator (część systemu QIAvac Connecting System).

**Uwaga:** Aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego, należy uważać, by podczas wyjmowania przedłużaczy kolumn nie zanieczyścić sąsiadujących ze sobą kolumn QIAamp Mini.

10. Nanieść 600  $\mu$ l buforu Buffer ACW1 na kolumnę QIAamp Mini. Pozostawić otwarte wieczko kolumny i włączyć pompę próżniową. Po przesączeniu całej objętości buforu Buffer ACW1 przez kolumnę QIAamp Mini wyłączyć pompę próżniową i zwolnić ciśnienie do 0 mbar.

11. Nanieść 750 µl buforu Buffer ACW2 na kolumnę QIAamp Mini. Pozostawić otwarte wieczko kolumny i włączyć pompę próżniową. Po przesączeniu całej objętości buforu Buffer ACW2 przez kolumnę QIAamp Mini wyłączyć pompę próżniową i zwolnić ciśnienie do 0 mbar.
12. Nanieść 750 µl etanolu (96–100%) na kolumnę QIAamp Mini. Pozostawić otwarte wieczko kolumny i włączyć pompę próżniową. Po przesączeniu całej objętości etanolu przez kolumnę wirówkową wyłączyć pompę próżniową i zwolnić ciśnienie do 0 mbar.
13. Zamknąć wieczko kolumny QIAamp Mini. Wyciągnąć kolumnę z kolektora próżniowego i wyrzucić złącze VacConnector. Umieścić kolumnę QIAamp Mini w czystej probówce do płukania o pojemności 2 ml (z kroku 8) i wirować ją przy maksymalnej prędkości (20 000 x g; 14 000 rpm) przez 3 (±0,5) minuty.
14. Umieścić kolumnę QIAamp Mini w nowej probówce do płukania o pojemności 2 ml. Zdjąć wieczko i inkubować zespół w temperaturze 56°C (±1°C) przez 10 (±1) minut w celu całkowitego osuszenia membrany.
15. Umieścić kolumnę QIAamp Mini w czystej probówce do elucji o pojemności 1,5 ml (dostarczona) i wyrzucić probówkę do płukania o pojemności 2 ml z etapu 13. Ostrożnie nanieść 20–150 µl buforu Buffer AVE na środek membrany kolumny QIAamp Mini. Zamknąć wieczko i inkubować w temperaturze pokojowej przez 3 (±0,5) minuty.

**Ważne:** Upewnić się, że bufor do elucji Buffer AVE jest doprowadzony do temperatury pokojowej (15–25°C). Jeśli elucja jest przeprowadzana w małych objętościach (<50 µl), bufor do elucji należy podać na środek membrany w celu całkowitej elucji związanych kwasów nukleinowych.

Objętość elucji jest elastyczna i można ją dostosowywać odpowiednio do wymogów dalszych procedur.

Przeprowadzanie elucji w mniejszych objętościach buforu Buffer AVE prowadzi do uzyskania większego stężenia kwasów nukleinowych, ale może spowodować otrzymanie mniejszego uzysku całkowitego.

Odzyskana objętość eluatu może być do 5 µl mniejsza niż objętość buforu do elucji naniesiona na kolumnę QIAamp Mini.

**Uwaga:** Jeśli oczekiwany jest niski uzysk kwasów nukleinowych, podczas elucji zalecane jest stosowanie probówek typu Low-bind (niedostarczone).

16. Wirować w mikrowirówce przy maksymalnej prędkości (20 000 x g; 14 000 rpm) przez 1 minutę w celu elucji kwasów nukleinowych.

**Uwaga:** Obrócić wieczka probówek do elucji w taki sposób, aby były skierowane w stronę przeciwną do kierunku, w którym obraca się rotor (np. jeśli rotor obraca się zgodnie z ruchem wskazówek zegara, obrócić wieczka w kierunku odwrotnym do ruchu wskazówek zegara).



## Kontrola jakości

Zgodnie z poświadczonym certyfikatem ISO systemem zarządzania jakością firmy QIAGEN każda seria zestawu QIAamp DSP Circulating NA Kit jest testowana pod kątem wstępnie ustalonych specyfikacji w celu zapewnienia spójnej jakości produktu.

## Ograniczenia

Skuteczność systemu pod względem izolacji wolnokrążących kwasów nukleinowych ustalono przy użyciu próbek ludzkiego osocza uzyskanych z następujących próbek do pobierania krwi:

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

Użytkownik jest odpowiedzialny za walidację skuteczności systemu pod kątem wszelkich procedur stosowanych w danym laboratorium, które nie są objęte badaniami skuteczności wykonanymi przez firmę QIAGEN.

W celu zminimalizowania ryzyka negatywnego wpływu na wyniki diagnostyczne należy stosować odpowiednie kontrole do dalszych procedur analitycznych. W celu dalszej walidacji zalecane jest przestrzeganie wytycznych Międzynarodowej Konferencji ds. Harmonizacji Wymagań Technicznych (ICH) dostępnych w przewodniku ICH Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Test And Methodology.

Wszelkie uzyskane wyniki diagnostyczne należy interpretować w połączeniu z innymi wynikami badań klinicznych i laboratoryjnych.

## Parametry skuteczności

Odpowiednie parametry skuteczności można znaleźć na stronie produktu pod adresem [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com), na karcie z materiałami źródłowymi.

# Literatura

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

# Rozwiązywanie problemów

Ta część instrukcji może okazać się pomocna podczas rozwiązywania jakichkolwiek zaistniałych problemów. Aby uzyskać więcej informacji, należy także zapoznać się ze stroną często zadawanych pytań w witrynie naszego Centrum pomocy technicznej pod adresem: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Naukowcy z działu serwisu technicznego firmy QIAGEN zawsze chętnie odpowiedzą na wszelkie pytania dotyczące informacji i/lub protokołów opisanych w niniejszej instrukcji obsługi, a także technologii próbek i oznaczeń (informacje kontaktowe znajdują się na stronie [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Komentarze i wskazówki

### Niewielka ilość/brak kwasów nukleinowych w elucji

- |    |   |   |
|----|---|---|
| a) | Użycie niestabilizowanego osocza                                      | Użycie próbek niestabilizowanego osocza może prowadzić do przyspieszonego rozkładu DNA. Zalecamy przestrzeganie wymogów normy CEN/TS 16835-3:2015. Powtórzyć procedurę oczyszczania, używając nowych próbek.  |
| b) | Zbyt długi czas między pobraniem krwi a przygotowaniem osocza         | Jądrzaste komórki krwi mogą ulec rozpadowi i uwolnić genomowy DNA do osocza, rozcieńczając docelowy kwas nukleinowy.  |
| c) | Próbki zamrożone i rozmrożone więcej niż jeden raz                    | Należy unikać wielokrotnego zamrażania i rozmrażania próbek, gdyż może to prowadzić do rozkładu DNA. Należy zawsze używać świeżych próbek lub próbek, które były rozmrażane tylko jeden raz.  |
| d) | Niskie stężenie docelowego DNA w próbkach                             | Próbki osocza były pozostawione w temperaturze pokojowej na zbyt długi czas. Powtórzyć procedurę oczyszczania, używając nowych próbek.<br><b>Uwaga:</b> Osocze niektórych osób może zawierać niskie stężenia wolnokrążących kwasów nukleinowych; w takim przypadku należy użyć większej objętości próbki oraz mniejszej objętości elucji. |
| e) | Niewydajna liza próbki w buforze Buffer ACL                           | Jeśli produkt QIAGEN Proteinase K przez dłuższy czas był narażony na działanie podwyższonych temperatur, może utracić aktywność. Powtórzyć procedurę, używając nowych próbek i świeżego produktu QIAGEN Proteinase K.   |
| f) | Niedostateczne wymieszanie mieszaniny buforu Buffer ACL i nośnika RNA | Bufor Buffer ACL należy wymieszać z nośnikiem RNA, delikatnie odwracając probówkę z mieszaniną buforu Buffer ACL i nośnika RNA co najmniej 10 razy.   |
| g) | Użycie niskoprocentowego etanolu zamiast etanolu o stężeniu 96–100%   | Powtórzyć procedurę oczyszczania, używając nowych próbek i etanolu o stężeniu 96–100%. Nie używać alkoholu denaturowanego, który zawiera inne substancje, takie jak metanol lub keton metylo-etylowy.   |

## Komentarze i wskazówki

- |    |  |   |
|----|--|---|
| h) | Nieprawidłowe przygotowanie buforu Buffer ACB                                      | Upewnić się, że koncentrat buforu Buffer ACB zrekonstruowano, używając prawidłowej objętości izopropanolu (nie używać etanolu, patrz strona 26).  |
| i) | Nieprawidłowe przygotowanie buforu Buffer ACW1 lub Buffer ACW2                     | Upewnić się, że koncentraty buforów Buffer ACW1 i Buffer ACW2 rozcieńczono, używając prawidłowej objętości etanolu (patrz strona 26). Powtórzyć procedurę oczyszczania, używając nowych próbek. |
| j) | Bufor Buffer ACW1 lub Buffer ACW2 przygotowany przy użyciu 70-procentowego etanolu | Upewnić się, że koncentraty buforów Buffer ACW1 i Buffer ACW2 rozcieńczono, używając etanolu o stężeniu 96–100% (patrz strona 26). Powtórzyć procedurę oczyszczania, używając nowych próbek.    |

## Dalsze reakcje enzymatyczne z użyciem DNA lub RNA nie przebiegają zgodnie z oczekiwaniami

- |    |   |  |
|----|---|--|
| a) | Niewielka ilość/brak DNA w eluacie      | Możliwe przyczyny takiej sytuacji przedstawiono w punkcie „Niewielka ilość/brak kwasów nukleinowych w eluacie” powyżej. Jeśli jest to możliwe, zwiększyć ilość eluatu dodawanego do reakcji.   |
| b) | Stosowana nieprawidłowa objętość elucji | Określić maksymalną objętość eluatu odpowiednią dla dalszej procedury. Odpowiednio zwiększyć lub zmniejszyć objętość eluatu dodawaną do dalszej procedury. Można proporcjonalnie dostosować objętość elucji.<br><b>Uwaga:</b> Przeprowadzanie elucji w mniejszych objętościach buforu Buffer AVE prowadzi do uzyskania większego stężenia kwasów nukleinowych, ale może spowodować otrzymanie mniejszego uzysku całkowitego. |
| c) | Niedokładne wymieszanie buforów         | Składniki buforu płuczącego Buffer ACW2, sól i etanol, mogły rozdzielić się, jeśli między cyklami przygotowań butelka z buforem nie była poruszana przez długi czas. Przed każdą reakcją należy zawsze dobrze wymieszać bufony.  |
| d) | Zakłócenia spowodowane nośnikiem RNA    | Jeśli obecny w eluacie nośnik RNA zakłóca przebieg dalszej reakcji enzymatycznej, może być konieczne zmniejszenie dodawanej ilości nośnika RNA lub całkowite pominięcie etapu dodawania tego produktu.   |

## Ogólne postępowanie












- |    |                             |   |
|----|-----------------------------|---|
| a) | Zatkana kolumna QIAamp Mini | W przypadku zmniejszenia natężenia przepływu można wydłużyć czas wywierania podciśnienia.<br>Alternatywnie można zamknąć zawór VacValve, jeśli jest używany, a następnie ostrożnie wyjąć zespół przedłużacz kolumny–VacConnector–VacValve z kolumny QIAamp Mini, uważając, aby nie utracić lizatu, który znajduje się w przedłużaczu kolumny.<br>Wyjąć kolumnę QIAamp Mini z kolektora próżniowego, umieścić ją w probówce do płukania o pojemności 2 ml, a następnie wirować ją przy maksymalnej prędkości aż cała objętość próbki przejdzie przez membranę. Ponownie założyć zespół przedłużacz kolumny–VacConnector–VacValve zawierający pozostałą objętość lizatu. Włączyć pompę próżniową, otworzyć zawór VacValve i kontynuować nakładanie pozostałej objętości lizatu. |
|----|-----------------------------|---|

## Komentarze i wskazówki

- Jeśli kolumna QIAamp Mini wciąż się zatyka, powtarzać powyższą procedurę.
- W wyniku wielokrotnego zamrażania i rozmrażania osocza mogły powstać krioprecypitaty. Mogą one zablokować kolumnę QIAamp Mini. Nie należy używać osocza, które było zamrażane i rozmrażane więcej niż jeden raz.
- Jeśli widoczne są krioprecypitaty, należy oczyścić próbkę, wirując ją przez 5 min przy 16 000 x g.
- b) Zmienne objętości elucji
- Użycie różnych próbek może wpłynąć na objętość końcowego eluatu. Odzyskana objętość eluatu może być do 5 µl mniejsza niż objętość buforu do elucji naniesiona na kolumnę QIAamp Mini.
- c) Nie osiągnięto podciśnienia o wartości od –800 do –900 mbar
- Kolektor próżniowy nie jest szczelnie zamknięty. Po włączeniu podciśnienia należy docisnąć wieko kolektora próżniowego. Upewnić się, że osiągnięto podciśnienie.
- Uszczelka wieka QIAvac zużyła się. Wzrokowo sprawdzić stan uszczelki kolektora i w razie potrzeby wymienić ją.
- Zawory VacValve zużyły się. Wyjąć wszystkie zawory VacValve i włożyć złącza VacConnector bezpośrednio do przedłużacza Luer. Włożyć kolumny QIAamp Mini do złącza VacConnector, zamknąć wieczka kolumn, a następnie włączyć podciśnienie. Upewnić się, że osiągnięto podciśnienie. W razie potrzeby wymienić zawory VacValve.
- Połączenie z pompą próżniową jest nieszczelne. Zamknąć wszystkie przedłużacze Luer zatyczkami Luer, a następnie włączyć pompę próżniową. Po włączeniu pompy sprawdzić, czy podciśnienie utrzymuje się na stabilnym poziomie (a zawór Vacuum Regulator jest zamknięty). W razie potrzeby wymienić przewody łączące pompę i kolektor próżniowy.
- Jeśli wciąż nie jest możliwe osiągnięcie odpowiedniej wartości podciśnienia, należy wymienić pompę próżniową na silniejszą pompę.

# Symbole

Poniższe symbole znajdują się w instrukcji użycia lub na opakowaniu i etykietach:

Symbol	Definicja symbolu
 <N>	Zawiera odczynniki wystarczające do wykonania <N> reakcji
	Termin ważności
	Ten produkt spełnia wymogi Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego 2017/746 w sprawie wyrobów medycznych do diagnostyki in vitro.
	Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro
	Numer katalogowy
	Numer serii
	Numer materiału (tj. oznaczenie składnika)
	Składniki
	Zawiera
	Liczba
	Globalny numer jednostki handlowej

Symbol	Definicja symbolu
Rn	R oznacza wydanie Instrukcji użycia, a n to numer wydania
	Zakres temperatury
	Producent
	Zapoznać się z instrukcją użycia
	Chronić przed światłem słonecznym
	Ostrzeżenie/przestroga
	Po otrzymaniu
	Otworzyć w momencie dostawy; kolumny wirówkowe QIAamp Mini przechowywać w temperaturze 2–8°C
	Objętość
	Dodawanie



## Symbol

## Definicja symbolu



Po dodaniu etanolu do butelki zapisać aktualną datę

**EtOH**

Etanol



Po dodaniu izopropanolu do butelki zapisać aktualną datę

**IPA**

Izopropanol

→

Prowadzi do

**GITC**

Tiocyanian guanidyny

**GuHCl**

Chlorowodorek guanidyny

**BRIJ 58**

BRIJ 58

**PROTK**

Proteinaza K

**UDI**

Niepowtarzalny identyfikator wyrobu

## Załącznik A: Zalecenia dotyczące separacji i przechowywania osocza krwi

W przypadku próbek do pobierania krwi ze stabilizatorami (np. próbki PAXgene ccfDNA Tube lub Streck Cell-Free DNA Tube) należy postępować zgodnie z instrukcjami producenta dotyczącymi separacji i przechowywania osocza. Zalecamy zwalidowanie tych warunków przechowywania w połączeniu z określoną dalszą procedurą i częstotliwością docelową.

W przypadku próbek BCT bez stabilizatorów zalecane jest postępowanie zgodnie z normą ISO 20186-3:2019 Diagnostyczne badania molekularne in vitro — Specyfikacja procesów przedlaboratoryjnych badania pełnej krwi żyłnej — Część 3: Izolowane pozakomórkowe krążące DNA z osocza lub normą CEN/TS 17742 Diagnostyczne badania molekularne in vitro — Specyfikacja procesów przedlaboratoryjnych badania pełnej krwi żyłnej — Izolowane pozakomórkowe krążące RNA z osocza.

W celu izolacji wolnokrążących kwasów nukleinowych z próbek krwi zalecane jest postępowanie zgodnie z niniejszym protokołem, który obejmuje etap wirowania przy dużej sile odśrodkowej w celu usunięcia resztek komórkowych, dzięki czemu zmniejszana jest ilość komórkowego lub genomowego DNA i RNA obecnego w próbce.

1. Umieścić próbki krwi pełnej z EDTA znajdujące się w próbkach BD Vacutainer® (lub innych pierwotnych próbkach na krew zawierających EDTA jako antykoagulant) w wirówce z rotorem wychylnym i odpowiednimi koszami, schłodzonej do temperatury 4°C.
2. Wirować próbki krwi przez 10 min przy 1900 x g (3000 rpm) w temperaturze 4°C.
3. Ostrożnie zaaspirować supernatant osocza, nie naruszając warstwy znajdującej się na styku osocza i resztek komórkowych. Z próbki pierwotnej zawierającej 10 ml krwi można uzyskać około 4–5 ml osocza.

**Uwaga:** Uzyskane na tym etapie osocze można wykorzystać do izolacji krążących kwasów nukleinowych. Jednakże wykonanie kolejnego etapu wirowania przy dużej prędkości spowoduje usunięcie dodatkowych resztek komórkowych oraz zanieczyszczeń krążących kwasów nukleinowych w postaci genomowego DNA i RNA uwolnionych z uszkodzonych jądrzastych komórek krwi.

4. Zaaspirowane osocze jest przenoszone do świeżej probówki wirówkowej.
5. Wirować próbki osocza przez 10 min przy 16 000 x g (w rotorze ze stałym kątem nachylenia) w temperaturze 4°C.

Wykonanie tego etapu spowoduje usunięcie dodatkowych komórkowych kwasów nukleinowych przyłączonych do resztek komórkowych.

6. Ostrożnie usunąć supernatant i przenieść go do nowej probówki, nie naruszając osadu.
7. Jeśli osocze będzie używane do izolacji kwasów nukleinowych wykonywanej tego samego dnia, należy przechowywać je w temperaturze 2–8°C do momentu rozpoczęcia dalszego przetwarzania. W celu dłuższego przechowywania porcje osoczy z probówek do pobierania krwi ze stabilizatorem oraz bez dodatku stabilizatora można przechowywać w temperaturze –20°C (jeśli cząsteczką docelową jest DNA) lub w temperaturze –80°C (jeśli cząsteczką docelową jest RNA) przez co najmniej 4 tygodnie. Przed użyciem osocza do izolacji krążących kwasów nukleinowych należy rozmrozić osocze, umieszczając probówki w temperaturze pokojowej.
8. **Opcjonalnie:** W celu usunięcia krioprecypitatów należy wirować próbki osocza przez 5 min przy 16 000 x g (w rotorze ze stałym kątem nachylenia).

**Opcjonalnie:** Przenieść supernatant do nowej probówki, a następnie przejść do wykonywania protokołu izolacji krążących kwasów nukleinowych.

# Załącznik B: Ogólne uwagi dotyczące postępowania z RNA

## Postępowanie z RNA

Rybonukleazy (RNazy) są bardzo stabilnymi i aktywnymi enzymami, które na ogół nie wymagają kofaktorów do działania. Ponieważ RNazy trudno inaktywować i nawet bardzo małe ich ilości wystarczają do rozkładu RNA, nie wolno używać jakichkolwiek sprzętów wykonanych ze szkła lub z tworzywa sztucznego bez wcześniejszego wyeliminowania możliwego zanieczyszczenia RNazami. Należy zachować szczególną ostrożność, aby uniknąć przypadkowego wprowadzenia RNaz do próbki z RNA w trakcie trwania lub po zakończeniu procedury oczyszczania. Aby utworzyć i zachować środowisko wolne od RNaz, należy wdrożyć następujące środki ostrożności na etapach obróbki wstępnej oraz stosowania jednorazowych i wielorazowych naczyń i roztworów podczas pracy z RNA.

## Ogólne postępowanie

Podczas pracy z RNA należy zawsze stosować prawidłową mikrobiologiczną technikę aseptyczną. Dłonie i cząsteczki kurzu mogą przenosić bakterie i pleśnie i są najczęstszymi źródłami zanieczyszczeń RNazami. Podczas postępowania z odczynnikami i próbkami RNA należy zawsze nosić lateksowe lub winylowe rękawiczki, aby uniknąć zanieczyszczenia RNazami z powierzchni skóry lub zakurzonych urządzeń laboratoryjnych. Rękawiczki należy często zmieniać, a próbówki trzymać zamknięte, gdy tylko to możliwe. Podczas rozdzielania porcji do dalszych zastosowań za pomocą pipety należy trzymać oczyszczony RNA na lodzie.

## Jednorazowy sprzęt z tworzywa sztucznego

Podczas wykonywania procedury zalecane jest stosowanie jałowych, jednorazowych próbek polipropylenowych wolnych od RNaz.

## Informacje dotyczące zamawiania

Produkt	Zawartość	Nr kat.
QIAamp DSP Circulating NA Kit (50)	Na 50 przygotowań: kolumny QIAamp Mini, przedłużacze kolumn Column Extender, złącza VacConnector, produkt QIAGEN Proteinase K, odczynniki, bufony i probówki do pobierania próbek	61504
<b>Akcesoria</b>		
QIAvac 24 Plus vacuum manifold*	Kolektor próżniowy do przetwarzania 1–24 kolumn wirówkowych: kolektor próżniowy QIAvac 24 Plus Vacuum Manifold, zatyczki Luer i szybkozłączki	19413
Vacuum Pump*	Uniwersalna pompa próżniowa Vacuum Pump	84010 [USA i Kanada] 84000 [Japonia] 84020 [pozostałe kraje]
System QIAvac Connecting System*	System łączący kolektor próżniowy z pompą próżniową: obejmuje tacę, butelki na odpady, przewody, złączki, zawór, manometr i 24 zawory VacValve	19419

\* Do użytku z protokołami próżniowymi.

Aktualne informacje licencyjne oraz dotyczące wyłączenia odpowiedzialności dla poszczególnych produktów znajdują się w odpowiedniej instrukcji obsługi lub podręczniku użytkownika zestawu QIAGEN. Instrukcje obsługi i podręczniki użytkownika zestawów QIAGEN są dostępne pod adresem [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Można je także zamówić w serwisie technicznym firmy QIAGEN lub u lokalnego dystrybutora.

## Historia zmian dokumentu

### Wydanie

### Opis

R1, czerwiec 2022 r.

Wydanie zestawu IVDR w wersji 2; nie wprowadzono żadnych zmian w protokołach lub danych dotyczących skuteczności w porównaniu do wersji 1 zestawu; w części dotyczącej przeznaczenia dodano informacje o „ręcznej” izolacji; wprowadzono drobne aktualizacje i poprawki

Strona celowo pozostawiona pusta

Strona celowo pozostawiona pusta



#### Umowa ograniczonej licencji dla zestawu QIAamp DSP Circulating NA Kit

Korzystanie z tego produktu oznacza zgodę nabywcy lub użytkownika produktu na następujące warunki:

1. Niniejszy produkt może być użytkowany wyłącznie zgodnie z protokołami dołączonymi do produktu oraz niniejszą instrukcją obsługi i wyłącznie ze składnikami wchodzącymi w skład tego panelu. Firma QIAGEN nie udziela żadnej licencji w zakresie praw własności intelektualnej do użytkowania niniejszego panelu ze składnikami nienależącymi do panelu, z wyjątkiem przypadków opisanych w protokołach dołączonych do produktu, niniejszej instrukcji obsługi oraz dodatkowych protokołach dostępnych na stronie [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Niektóre dodatkowe protokoły zostały sformułowane przez użytkowników rozwiązań QIAGEN z myślą o innych użytkownikach rozwiązań QIAGEN. Takie protokoły nie zostały dokładnie przetestowane ani poddane procesowi optymalizacji przez firmę QIAGEN. Firma QIAGEN nie gwarantuje, że nie naruszają one praw osób trzecich.
2. Firma QIAGEN nie gwarantuje, że niniejszy panel i/lub jego użytkowanie nie narusza praw osób trzecich. Wyjątek stanowią jedynie wyraźnie określone licencje.
3. Panel oraz jego składniki są na mocy licencji przeznaczone wyłącznie do jednorazowego użytku i nie można ich ponownie używać, regenerować lub sprzedawać.
4. Firma QIAGEN nie udziela żadnych innych licencji wyrażonych lub dorozumianych poza tymi, które są wyraźnie określone.
5. Nabywca i użytkownik panelu zobowiązuje się nie podejmować działań ani nie zezwalać innym osobom na podejmowanie działań, które mogą doprowadzić do wykonania lub umożliwić wykonanie zabronionych czynności wymienionych powyżej. Firma QIAGEN może wyegzekwować przestrzeganie zakazów niniejszej Umowy ograniczonej licencji i wnieść sprawę do dowolnego sądu. Ma także prawo zażądać zwrotu kosztów wszelkich postępowań i kosztów sądowych, w tym wynagrodzeń prawników, związanych z egzekwowaniem postanowień Umowy ograniczonej licencji lub wszelkich praw własności intelektualnej w odniesieniu do zestawu i/lub jego składników.

Aktualne warunki licencji są dostępne na stronie [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Znaki towarowe: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, (QIAGEN Group); Agilent® (Agilent Technologies, Inc.); BD™, Vacutainer® (Becton Dickinson and Company); PAXgene® (PreAnalytix GmbH); Tween™ (ICI Americas Inc.). Zastrzeżonych nazw, znaków towarowych itd. wykorzystywanych w niniejszym dokumencie, nawet jeżeli nie zostały oznaczone jako zastrzeżone, nie można uważać za niechronione przepisami prawa.

Czerwiec-2022 HB-3049-001 1127632 © 2022 QIAGEN, wszelkie prawa zastrzeżone.

