

September 2019

# QIAamp<sup>®</sup> DSP Circulating NA Kit Brugsanvisning (Håndbog)

Version 1



50

IVD

CE

REF

61504



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden

R4 MAT

1118364DK

Sample to Insight



# Indhold

Tilsigtet anvendelse .....	4
Oversigt og forklaring .....	4
Procedureprincipper.....	5
Prøvevolumener.....	5
Lysering af prøver.....	7
Adsorption på QIAamp Mini-kolonmembranen.....	7
Fjernelse af restkontaminanter .....	7
Eluering af rene nukleinsyrer.....	8
Udbytte og størrelse af nukleinsyrer .....	8
Beskrivelse af protokoller.....	9
Medfølgende materialer .....	10
Kit-indhold.....	10
Påkrævede materialer, der ikke medfølger.....	11
Advarsler og forholdsregler.....	12
Opbevaring og håndtering af reagenser .....	15
Prøveopbevaring og -håndtering.....	16
Procedure .....	17
Klargøring af buffere og reagenser.....	24
Breeze-protokol: Oprensning af cirkulerende nukleinsyrer fra 1-5 ml humant blodplasma .....	27
Klassisk protokol: Oprensning af cirkulerende nukleinsyrer fra 1-5 ml humant blodplasma .....	32

---

Kvalitetskontrol .....	37
Begrænsninger .....	37
Symboler .....	38
Litteraturhenvisninger.....	40
Kontaktoplysninger .....	40
Fejlfindingsvejledning.....	41
Bilag A: Anbefalinger for separation of opbevaring af blodplasma .....	43
Bilag B: Generelle bemærkninger om håndtering af RNA.....	45
Bestillingsinformation.....	46
Revisionshistorik for håndbogen .....	47

---

# Tilsigtet anvendelse

QIAamp DSP Circulating NA Kit er et system, der anvender silicamembran-teknologi (QIAamp-teknologi) til isolering og oprensning af cirkulerende cellefrit DNA og RNA fra humane blodplasmaprøver.

Produktet er beregnet til brug af professionelle brugere, såsom laboratorieteknikere og læger, der er uddannet i molekylærbiologisk teknik.

QIAamp DSP Circulating NA Kit er beregnet til in vitro-diagnostisk brug.

## Oversigt og forklaring

Frit cirkulerende nukleinsyrer findes i human plasma, som regel som korte fragmenter, <1000 bp (DNA) <1000 nt (RNA) eller helt ned til 20 nt (miRNA). Koncentrationen af frit cirkulerende nukleinsyrer i humant blodplasma er som regel lav og varierer betydeligt fra person til person i området fra 1 til 100 ng/ml i humane prøver (1-5).

QIAamp DSP Circulating NA Kit muliggør effektiv oprensning af cirkulerende nukleinsyrer fra human plasma. Prøverne kan være enten friske eller frosne. Extension Tubes og vakuumbehandling på QIAvac 24 Plus muliggør et startprøvevolumen på op til 5 ml, og fleksible elueringsvolumener mellem 20-150 µl gør det muligt at koncentrere nukleinsyrearter, der er til stede i lave koncentrationer.

Elueret, frit cirkulerende genomisk DNA eller RNA er klar til brug i efterfølgende anvendelser og er også egnet til opbevaring. QIAamp DSP Circulating NA Kit fjerner effektivt proteiner, nukleaser og andre urenheder.

---

# Procedureprincipper

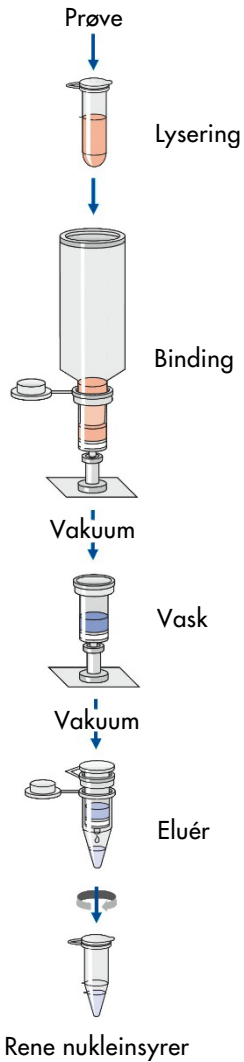
QIAamp DSP Circulating NA-proceduren omfatter 4 trin (lysis, binding, vask og eluering) og udføres ved anvendelse af QIAamp Mini-kolonner på QIAvac-systemet. Den robuste procedure medvirker til at minimere krydskontaminering fra prøve til prøve og øger brugernes sikkerhed ved håndtering af potentielt smittefarlige prøver.

Den enkle procedure er velegnet til samtidig behandling af op til 24 prøver på mindre end 2 timer.

## Prøvevolumener

QIAamp Mini-kolonner binder fragmenterede nukleinsyrer, der helt ned til 20 nt lange, men udbyttet afhænger af prøvevolumen og koncentrationen af cirkulerende nukleinsyrer i prøven (typisk 1-100 ng/ml i plasma). QIAamp DSP Circulating NA-proceduren er optimeret til prøvevolumener på op til 5 ml.

## QIAamp DSP Circulating NA Kit



Figur 1. Oversigt over QIAamp DSP Circulating NA Kit-proceduren

---

## Lysering af prøver

Frit cirkulerende nukleinsyrer i biologiske væsker er som regel bundet til proteiner eller indkapslet i vesikler, hvilket kræver et effektivt lysisstrin for at frigive nukleinsyrer til selektiv binding til QIAamp Mini-kolonnen. Derfor lyseres prøver under meget denaturerende betingelser ved forhøjede temperaturer i nærvær af proteinase K og Buffer ACL, hvilket sikrer inaktivering af DNaser og RNaser og frigivelse af nukleinsyrer fra bundne proteiner, lipider og vesikler.

## Adsorption på QIAamp Mini-kolonmembranen

For at tillade optimal binding af de cirkulerende nukleinsyrer til membranen justeres bindingsforholdene ved at tilsætte Buffer ACB til lysatet. Lysater overføres dernæst til en QIAamp Mini-kolonne, og cirkulerende nukleinsyrer adsorberes fra et stort volumen på silica-membranen, samtidigt med at lysatet trækkes igennem vha. vakuumtrykket. Salt og pH-forhold sikrer, at størstedelen af proteiner og andre kontaminanter, som kan hæmme PCR og andre efterfølgende enzymreaktioner, ikke bliver tilbage på QIAamp Mini-kolonmembranen.

Til denne protokol kræves en vakuumanifold (f.eks. QIAvac 24 Plus med QIAvac Connecting System) og en vakuumpumpe, der kan frembringe et vakuum på ~800-900 mbar (f.eks. QIAGEN® Vacuum Pump). Der skal bruges en Vacuum Regulator (indgår i QIAvac Connecting System) til nem overvågning af vakuumtryk og praktisk udløsning af vakuumtrykket.

## Fjernelse af restkontaminanter

Nukleinsyrer forbliver bundet til membranen, mens kontaminanter vaskes effektivt væk under tre vasketrin.

## Eluering af rene nukleinsyrer

Eluering udføres vha. Buffer AVE. Med et enkelt trin elueres stærkt oprensede cirkulerende nukleinsyrer i Buffer AVE, der er blevet ekvibreret til stuetemperatur. Der kan anvendes et fleksibelt elueringsvolumen på 50-150 µl. Hvis der kræves højere nukleinsyrekoncentrationer, kan elueringsvolumenet reduceres helt ned til 20 µl. Elueringsvolumener på under 50 µl fører til højere koncentrerede nukleinsyreeluat, men kan resultere i lavere samlet udbytte.

Den udvundne eluatvolumen kan være op til 5 µl mindre end det elueringsbuffervolumen, der blev anvendt på kolonnen.

## Udbytte og størrelse af nukleinsyrer

Udbytter af frit cirkulerende nukleinsyrer isoleret fra biologiske prøver er normalt under 1 µg og er derfor vanskelige at bestemme med et spektrofotometer. Det absolutte udbytte af cirkulerende DNA og RNA, der opnås fra en prøve ved anvendelse af QIAamp DSP Circulating NA Kit, varierer mellem prøver fra forskellige personer og afhænger også af andre faktorer (eksempelvis nogle sygdomstilstande). Desuden vil bærer-RNA, der er til stede i de ekstraherede nukleinsyrer, sandsynligvis dominere UV-absorbansmålinger (se side 25). Kvantitative amplifikationsmetoder anbefales til bestemmelse af udbytte.

Størrelsesfordelingen af cirkulerende nukleinsyrer, der er oprenset ved hjælp af QIAamp DSP Circulating NA Kit, kan kontrolleres ved agarosegelelektroforese eller hybridisering til en målspecifik mærket probe<sup>5</sup> eller en mikrofluidikbaseret elektroforeseopløsning (f.eks. Agilent Bioanalyzer).



---

## Beskrivelse af protokoller

I denne håndbog viser to forskellige protokoller.

“Breeze-protokol: Oprensning af cirkulerende nukleinsyrer fra 1-5 ml humant blodplasma” (side 27) er beregnet til behandling af op til 5 ml plasma in 1 ml trin og er optimeret til minimal brugerhåndtering og hurtig behandlingstid.

“Klassisk protokol: Oprensning af cirkulerende nukleinsyrer fra 1-5 ml humant blodplasma” (side 32) er beregnet til behandling af op til 5 ml plasma in 1 ml trin og består af den uændrede protokol i håndbogen til QIAamp DSP Circulating NA Kit Handbook, revision 3 (R3).

# Medfølgende materialer

## Kit-indhold

QIAamp DSP Circulating NA Kit			(50)
Katalognr.			61504
Antal klargøringer			50
QIAamp Mini	QIAamp Mini Columns with Wash Tubes (QIAamp Mini-kolonner med vaskerør) (WT) (2 ml)	<b>COL</b>	50
EXT	Column Extenders (kolonneforlængere) (20 ml)	<b>COL EXT</b>	2 x 25
WT	Wash Tubes (vaskerør) (2 ml)	<b>WASH TUBE</b>	50
ET	Elution Tubes (elueringsrør) (1,5 ml)	<b>ELU TUBE</b>	50
VC	VacConnectors (vakuumkonnekteror)	<b>VAC CON</b>	50
ACL*	Lysis Buffer* (lysisbuffer)	<b>LYS BUF</b>	220 ml
ACB*	Binding Buffer* (bindingsbuffer) (koncentrat)	<b>BIND BUF CONC</b>	300 ml
ACW1*	Wash Buffer 1* (vaskebuffer 1) (koncentrat)	<b>WASH BUF 1 CONC</b>	19 ml
ACW2†	Wash Buffer 2† (vaskebuffer 2) (koncentrat)	<b>WASH BUF 2 CONC</b>	13 ml
AVE†	Elution Buffer† (elueringsbuffer) (lilla hætter)	<b>ELU BUF</b>	5 x 2 ml
PROTK	QIAGEN Proteinase K	<b>PROTK</b>	4 x 7 ml
Carrier	Carrier RNA (bærer-RNA) (røde hætter)	<b>CAR RNA</b>	310 µg
	Håndbog	<b>HB</b>	1

\* Indeholder et kaotropisk salt. Se side 12 for Advarsler og forholdsregler.

† Indeholder natriumazid som konserveringsmiddel.

## Påkrævede materialer, der ikke medfølger

Der skal altid anvendes en egnet laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemikalier. Der findes flere oplysninger i de tilhørende sikkerhedsdatablade (Safety Data Sheets, SDS'er), som kan fås hos produktets leverandør.

Kontrollér, at instrumenterne er kontrolleret og kalibreret i henhold til producentens anbefalinger.

For alle protokoller

- Pipetter (justerbare)
- Sterile pipettespidser (pipettespidser med aerosolbarrierer anbefales for at forhindre krydskontaminering)
- Vandbad eller varmeblok, som kan indeholde 50 ml centrifugeringsrør ved 56 °C eller 60 °C\*
- Varmeblok eller tilsvarende ved 56 °C, der passer til 2 ml vaskerør (kun til klassisk protokol)\*
- Mikrocentrifuge (med rotor til 2 ml rør)\*
- 50 ml centrifugerør
- QIAvac 24 Plus vacuum manifold (kat.nr. 19413)
- QIAvac Connecting System (kat.nr. 19419) eller tilsvarende
- Vacuum Pump (kat.nr. 84010 [USA og Canada], 84000 [Japan] eller 84020 [resten af verden]) eller tilsvarende pumpe, der kan frembringe et vakuum på -800 til -900 mbar
- Ethanol (96-100 %)†
- Isopropanol (100 %)
- Knust is (kun for "Klassisk protokol: Oprensning af cirkulerende nukleinsyrer fra 1-5 ml humant blodplasma").
- Nogle prøver kan kræve fortynding med fosfat-bufferet saltvand (PBS)
- Ekstraudstyr: VacValves (katalognr. 19408)

\* Kontrollér, at instrumenterne er kontrolleret og kalibreret i henhold til producentens anbefalinger.

† Der må ikke bruges denatureret alkohol, som indeholder andre stoffer, såsom metanol eller methylethylketon.

# Advarsler og forholdsregler

Til in vitro-diagnostisk brug

Der skal altid anvendes en egnet laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemikalier. Der henvises til de relevante sikkerhedsdatablade (Safety Data Sheets, SDS'er) for yderligere information. Disse er tilgængelige online i et praktisk og kompakt PDF-format på adressen [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), hvor det er muligt at finde, få vist og udskrive SDS'et for hvert QIAGEN-kit og hver kitkomponenter.

ADVARSEL Risiko for personskade



Tilsæt IKKE blegemiddel eller sure opløsninger direkte til væskeaffaldet fra prøveklargøringen.

Buffer ACL, Buffer ACB og Buffer ACW1 indeholder guanidinsalte, som kan danne højt reaktive forbindelser, når de kombineres med blegemiddel.

Hvis væske, der indeholder disse buffere, spildes, rengøres med egnet rengøringsmiddel til laboratorier og vand. Hvis den spildte væske indeholder potentielt smittefarlige stoffer, rengøres det påvirkede område først med rengøringsmiddel til laboratorier og vand og dernæst med 1 % (v/v) natriumhypochlorit.

Følgende fare- og sikkerhedssætninger gælder komponenter i QIAamp DSP Circulating NA Kit.

## Buffer ACB



Indeholder: guanidin-thiocyanat. Fare! Farlig ved indtagelse. Kan være farlig ved hudkontakt eller ved indånding. Forårsager svære forbrændinger af huden og øjenskader. Skadelig for vandlevende organismer, med langvarige virkninger. Udvikler meget giftig gas ved kontakt med syre. Bær beskytteshandsker/beskyttelsestøj/øjenbeskyttelse/ansigtsbeskyttelse. VED KONTAKT MED ØJNENE: Skyl forsigtigt med vand i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis det kan gøres let. Fortsæt med at skylle. Ring omgående til en GIFTINFORMATION eller en læge.

## Buffer ACL



Indeholder: guanidin-thiocyanat. Fare! Farlig ved indtagelse. Kan være farlig ved hudkontakt eller ved indånding. Forårsager svære forbrændinger af huden og øjenskader. Skadelig for vandlevende organismer, med langvarige virkninger. Udvikler meget giftig gas ved kontakt med syre. Bær beskytteshandsker/beskyttelsestøj/øjenbeskyttelse/ansigtsbeskyttelse. VED KONTAKT MED ØJNENE: Skyl forsigtigt med vand i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis det kan gøres let. Fortsæt med at skylle. Ring omgående til en GIFTINFORMATION eller en læge.

## Buffer ACW1



Indeholder: guanidinhydrochlorid. Advarsel! Skadelig ved indtagelse eller ved indånding. Forårsager hudirritation. Forårsager alvorlig øjenirritation. Bær beskytteshandsker/beskyttelsestøj/øjenbeskyttelse/ansigtsbeskyttelse.

## Proteinase K



Indeholder: Proteinase K. Fare! Forårsager let hudirritation. Kan forårsage allergi- eller astmasymptomer eller åndedrætsbesvær ved indånding. Undgå indånding af pulver/røg/gas/tåge/damp/spray. Bær beskyttelsehandsker/beskyttelsestøj/øjebeskyttelse/ansigtsbeskyttelse. Anvend åndedrætsværn. Ved eksponering eller mistanke om eksponering: Ring til en GIFTINFORMATION eller en læge. Flyt personen til et sted med frisk luft og sørg for, at vedkommende hviler i en stilling, som letter vejtrækningen.

---

## Opbevaring og håndtering af reagenser

QIAamp Mini-kolonner skal opbevares tørt ved 2-8 °C. Alle buffere skal opbevares ved stuetemperatur (15-25 °C). QIAamp Mini-kolonner og -buffere kan opbevares under disse betingelser indtil udløbsdatoen på kittets æske uden forringelse af ydeevnen.

Frysetørret bærer-RNA skal opbevares ved stuetemperatur (15-25 °C) indtil den udløbsdato, der er angivet på komponentens etiket. Bærer-RNA skal opløses i Buffer AVE, og det opløste bærer-RNA skal umiddelbart herefter tilsættes i Buffer ACL som beskrevet på side 28 for Breeze-protokollen og på side 33 for den klassiske protokol. Denne opløsning skal forberedes frisk og er stabil ved 2-8 °C i op til 48 timer. Ubrugte portioner bærer-RNA opløst i Buffer AVE bør nedfryses i alikvoter ved -30 til -15 °C.

QIAamp DSP Circulating NA Kit indeholder en brugsklar proteinase K-opløsning, der opløses i en specifikt formuleret opbevaringsbuffer. Det indeholdte proteinase K er stabilt indtil udløbsdatoen på komponenten etiket, når den opbevares ved stuetemperatur (15-25 °C).

---

# Prøveopbevaring og -håndtering

## Opbevaring og håndtering af blod

For at undgå nedbrydning af cellefrie nukleinsyrer og frigivelse af cellulære nukleinsyrer anbefaler vi opbevaring af fuldblod i højst 6 timer ved 2-8 °C (f.eks. EDTA-prøver). Hvis der anvendes stabiliserede blodprøvetagningsrør, bør du følge producentens angivne opbevaringsbetingelser. Vi anbefaler at validere disse opbevaringsbetingelser i kombination med din specifikke efterfølgende anvendelse og dine specifikke mål.

## Opbevaring og håndtering af plasma

Det anbefales at udføre plasmaseparation og nukleinsyreisolering straks efter bloddonation, når EDTA anvendes som antikoagulan, særligt for RNA. Ved kortvarig opbevaring kan plasmaet opbevares op til 24 timer ved 2-8 °C.

Ved længere tids opbevaring kan alikvoter af plasma fra stabiliserede såvel som ikke-stabiliserede blodprøvetagningsrør opbevares ved -20 °C (kun med DNA som mål) eller -80 °C (DNA og RNA som mål) i mindst 4 uger.

## Opbevaring af eluerede nukleinsyrer

Eluerede nukleinsyrer opsamles i 1,5 ml elueringsrør (medfølger). De oprensede cirkulerende nukleinsyrer kan opbevares i op til 24 timer ved 2-8 °C. Ved opbevaringsperioder på mere end 24 timer anbefales opbevaring frem til efterfølgende anvendelser ved -30 til -15 °C for DNA og -90 til -60 °C for RNA.



# Procedure

## Vigtige anvisninger før start

### QIAvac 24 Plus

QIAvac 24 Plus er designet til hurtig og effektiv vakuumbehandling af op til 24 QIAGEN spin-kolonner parallelt. Prøver og vaskeopløsninger trækkes gennem kolonnenmembranerne ved vakuum frem for ved centrifugering, hvilket giver højere hastighed og reduceret brugerhåndteringstid ved oprensingsprocedurer.

Når det kombineres med QIAvac Connecting System, kan QIAvac 24 Plus bruges som gennemstrømningssystem. Det gennemstrømmede prøvemateriale opsamles i en separat flaske til spildvæske.

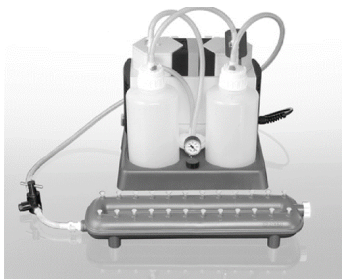
Du kan se oplysninger om vedligeholdelse af QIAvac 24 Plus under betjeningsvejledningen i *håndbogen til QIAvac 24 Plus*.

### Behandling af QIAamp Mini-kolonner på QIAvac 24 Plus

QIAamp Mini-kolonner behandles på QIAvac 24 Plus ved brug af VacConnectors til engangsbrug og VacValves til flergangsbrug. VacValves (ekstraudstyr) sættes direkte i luer-åbningerne i QIAvac 24 Plus-manifolden og sikrer en stabil strømningshastighed, hvilket gør det lettere at behandle forskellige prøvevolumener parallelt. De skal bruges, hvis prøvestrømningshastighederne er meget forskellige, til at sikre et konstant vakuum. VacConnectors er engangskonnektorer, der passer mellem QIAamp Mini-kolonner og VacValves eller mellem QIAamp Mini-kolonner og luer-åbningerne i QIAvac 24 Plus. De forhindrer direkte kontakt mellem spin-kolonnen og VacValve under oprensning, hvorved krydskontaminering mellem prøver undgås. VacConnectors kasseres efter én anvendelse. På grund af de store væskevolumener, der anvendes, er QIAvac Connecting System (eller en lignende opsætning med affaldsflasker) påkrævet (se Figur 2).

## Retningslinjer for håndtering af QIAvac 24 Plus

- Anbring altid QIAvac 24 Plus på en sikker arbejdsflade eller et sikkert arbejdsområde. Hvis den tages, kan QIAvac 24 Plus-manifolden revne.
- Opbevar altid QIAvac 24 Plus på et rent og tørt sted. Oplysninger om rengøringsprocedurer findes i håndbogen til QIAvac 24 Plus.
- Komponenterne i QIAvac 24 Plus er ikke modstandsdygtige over for bestemte opløsningsmidler (Tabel 1). Hvis disse opløsningsmidler spildes på enheden, skal den skylles grundigt med vand.
- For ikke at sikre stabil og ensartet ydelse må du ikke påføre silikone eller vakuumsedt på nogen del af QIAvac 24 Plus-manifolden.
- Vær altid forsigtig, og bær sikkerhedsbriller, når du arbejder i nærheden af en vakuummanifold under tryk.
- Kontakt QIAGENs tekniske service eller den lokale forhandler, hvis du ønsker oplysninger om reservedele eller udskiftningsdele.
- Vakuumtrykket er differensstrykket mellem indersiden af vakuummanifolden og atmosfæren (atmosfærisk standardtryk 1013 millibar eller 760 mm Hg) og kan måles ved hjælp af QIAvac Connecting System (se Figur 2). Protokollerne kræver en vakuumpumpe, der kan frembringe et vakuum på -800 til -900 mbar (f.eks. QIAGEN Vacuum Pump). Højere vakuumtryk end disse skal undgås. Brug af lavere vakuumtryk end anbefalet kan reducere nukleinsyreudbyttet og -renheden og øge risikoen for tilstoppede membraner.



Figur 2. QIAvac 24 Plus, QIAvac Connecting System og Vacuum Pump

Table 1. Specifikationerne for kemisk resistens for QIAvac 24 Plus

Resistent over for		Ikke resistent over for
Eddikesyre	Kaotropiske salte	Benzen
Chromsyre	Koncentrerede alkoholer	Phenol
SDS	Natriumchlorid	Chloroform
Tween® 20	Urea	Toluen
Klorblegemiddel	Saltsyre	Ætere
Natriumhydroxid		

## Opsætning af QIAvac 24 Plus vacuum manifold

1. Forbind QIAvac 24 Plus til en vakuumkilde. Hvis QIAvac Connecting System anvendes, skal systemet sluttes til manifolden og vakuumkilden som beskrevet i appendiks A i *håndbogen til QIAvac 24 Plus*.
2. Sæt en VacValve (ekstraudstyr) i hver luer-åbning på den QIAvac 24 Plus, der skal anvendes (se Figur 3). Luk de luer-åbninger, der ikke anvendes, med luer-propper, eller luk den isatte VacValve.  
VacValves bør anvendes, hvis strømningshastighederne for prøver afviger markant, for at sikre et konstant vakuum.
3. Sæt en VacConnector i hver VacValve (se Figur 3).  
Udfør dette trin, umiddelbart før oprensningen startes, for at undgå at udsætte VacConnectors for potentielle kontaminanter i luften.
4. Sæt QIAamp Mini-kolonnerne i VacConnectors på manifolden (se Figur 3).  
Bemærk: Gem vaskerøret fra blisterpakningen til senere brug i oprensningsprotokollen.
5. Sæt en kolonneforlænger (20 ml) i hver QIAamp Mini-kolonne (se Figur 3).  
Bemærk: Kontrollér, at hver kolonneforlænger sidder korrekt på plads i QIAamp Mini-kolonnen, for at undgå udsivning af prøve.
6. Følg instruktionerne i protokollerne for oprensning af nukleinsyre. Bortskaf VacConnectors korrekt efter brug.

---

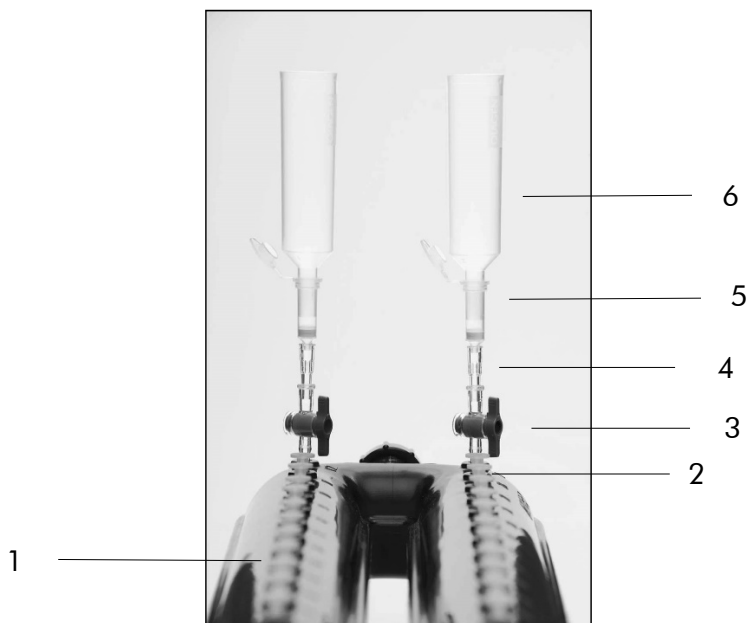
Lad låget på QIAamp Mini-kolonnen være åbent under påføring af vakuum.

Sluk for vakuumpet mellem de enkelte trin for at sikre, at der anvendes et ensartet, jævnt vakuum under behandlingen. Hvis der ønskes hurtigere vakuumfrigivelse, skal der bruges en Vacuum Regulator (indgår i QIAvac Connecting System).

Bemærk: Hver VacValve kan lukkes enkeltvis, når prøven er trukket helt gennem spin-kolonnen, hvilket muliggør parallel behandling af prøver med forskellige volumener eller viskositeter.

7. Når prøverne er behandlet, skal QIAvac 24 Plus rengøres (se "Rengøring og dekontaminering af QIAvac 24 Plus" i *håndbogen til QIAvac 24 Plus*).

Bemærk: Bufferne ACL, ACB og ACW1 er ikke kompatible med desinfektionsmidler, der indeholder blegemiddel. Se side 12 for Advarsler og forholdsregler.

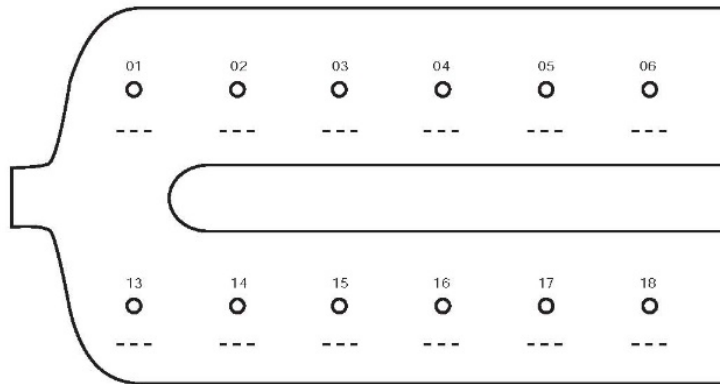


Figur 3. Opsætning af QIAvac 24 Plus med QIAamp Mini-kolonner ved brug af VacValves, VacConnectors og kolonneforlængere.

- |  |                       |
|--|-----------------------|
| 1 QIAvac 24 Plus vacuum manifold                       | 4 VacConnector        |
| 2 Luer-åbning på QIAvac 24 Plus (lukket med luer-prop) | 5 QIAamp Mini-kolonne |
| 3 VacValve**   | 6 Kolonneforlænger    |

Vi anbefaler, at du mærker rørene og QIAamp Mini-kolonner til anvendelse på QIAvac 24 Plus vacuum system i henhold til skemaet i Figur 4 for at undgå sammenblanding af prøver. Denne figur kan fotokopieres og mærkes med navnene på prøverne.

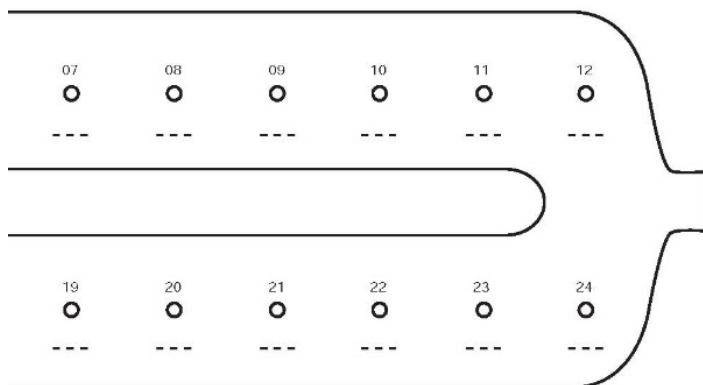
\* Købes separat.



Dato: \_\_\_\_\_

Bruger: \_\_\_\_\_

Kørsels-ID: \_\_\_\_\_



Figur 4. Etikettersigt over rør og QIAamp Mini-kolonner til anvendelse på QIAvac 24 Plus vacuum system

# Klargøring af buffere og reagenser

## Buffer ACB

Før brug skal du tilsætte 200 ml isopropanol (100 %) i 300 ml Buffer ACB-koncentrat for at få 500 ml Buffer ACB. Bland grundigt efter tilsætning af isopropanol.

## Buffer ACW1 \*

Før brug skal du tilsætte 25 ml ethanol (96-100 %) i 19 ml Buffer ACW1-koncentrat for at få 44 ml Buffer ACW1. Bland grundigt efter tilsætning af ethanol.

## Buffer ACW2†

Før brug skal du tilsætte 30 ml ethanol (96-100 %) i 13 ml Buffer ACW2-koncentrat for at få 43 ml Buffer ACW2. Bland grundigt efter tilsætning af ethanol.

## Tilsætning af bærer-RNA til Buffer ACL\*

Bærer-RNA tjener to formål. For det første forbedrer det bindingen af nukleinsyrer til QIAamp Mini-membranen, specielt hvis der er meget få mål-molekyler i prøven. For det andet reducerer tilføjelsen af store mængder bærer-RNA chancen for RNA-nedbrydning i de sjældne tilfælde, hvor RNase-molekyler ikke denatureres via de kaotropske salte og detergenter i Buffer ACL.

Mængden af medfølgende frysetørret bærer-RNA er tilstrækkeligt til den mængde Buffer ACL, der medfølger i kittet. Den anbefalede koncentration af bærer-RNA er blevet justeret, således at QIAamp DSP Circulating NA-protokollen kan anvendes som et generisk oprensningssystem,

\* Indeholder kaotropisk salt. Se side 12 for advarsler og forholdsregler.

† Indeholder natriumazid som konserveringsmiddel.



---

der er kompatibelt med mange forskellige forstærkningssystemer, og som er egnet til en lang række RNA- og DNA-mål.

Forskellige amplifikationssystemer varierer i virkning, afhængigt af den samlede mængde nukleinsyrer, der er til stede i reaktionen. Eluater fra kittet indeholder både cirkulerende nukleinsyrer og bærer-RNA og mængden af bærer-RNA vil i de fleste tilfælde i høj grad overstige mængden af cirkulerende nukleinsyrer. Kvantificering af isolerede cirkulerende nukleinsyrer ved UV-absorbansmåling vil derfor ikke være tilstrækkelig, da resultaterne af sådanne målinger bestemmes af tilstedeværelsen af bærer-RNA.

For at opnå de højeste sensitivitetsniveauer af forstærkningsreaktioner, kan det være nødvendigt at reducere mængden af bærer-RNA, der er tilsat Buffer ACL.

Med amplificeringssystemer, der omfatter brug af oligo dT-primere, skal der ikke tilsættes noget bærer-RNA under isolering af frit cirkulerende nukleinsyrer.

Tilsæt 1550 µl Buffer AVE\* i røret med 310 µg frysetørret bærer-RNA for at opnå en opløsning men en koncentration på 0,2 µg/µl. Opløs bærer-RNA grundigt, del det op i alikvoter af passende størrelse, og opbevar det ved -30 til -15°C. Alikvoterne af bærer-RNA må ikke fryse-optøes mere end 3 gange.

Bemærk, at bærer-RNA ikke opløses i Buffer ACL. Det skal først opløses i Buffer AVE, og dernæst tilsættes Buffer ACL.

Beregn den mængde blanding af Buffer ACL-bærer-RNA, der kræves til hvert batch af prøver, i henhold til tabellerne i protokollerne. Vælg det antal prøver, der skal behandles samtidig.

\*Indeholder natriumazid som konserveringsmiddel.

---

Bland forsigtigt ved at vende bunden i vejret på røret eller flasken 10 gange. For at undgå skumning må der ikke bruges vortex.

Bemærk: Prøveforberedelsesproceduren er optimeret til maksimalt 1,0 µg bærer-RNA pr. prøve. Hvis mindre bærer-RNA har vist sig at være bedre til dit amplifikationssystem, overføres kun den påkrævede mængde af opløst bærer-RNA til rørene med Buffer ACL. For hvert mikrogram bærer-RNA påkrævet pr. klargøring tilsættes 5 µl opløst bærer-RNA til Buffer ACL. (Brug af mindre end 1,0 µg bærer-RNA pr. prøve kan være fordelagtigt og skal valideres for hver enkelt prøvetype og efterfølgende analyse).

---

# Breeze-protokol: Oprensning af cirkulerende nukleinsyrer fra 1-5 ml humant blodplasma

Denne protokol er til oprensning af cirkulerende DNA og RNA fra 1-5 ml humant blodplasma og er optimeret til minimal brugerhåndtering og hurtig behandlingstid. Du kan se oplysninger om eksisterende brugervaliderede workflows ved brug af QIAamp DSP Circulating Kit version 1/R3 under "Klassisk protokol: Oprensning af cirkulerende nukleinsyrer fra 1-5 ml humant blodplasma" (side 32).

## Vigtige anvisninger før start

- Alle centrifugeringstrin udføres ved stuetemperatur (15-25 °C).
- Sluk for vakuumpumpe mellem de enkelte trin for at sikre, at der anvendes et ensartet, jævnt vakuum under protokoltrinnene.
- Bemærk: Trykket i Vacuum Pump skal være mellem -800 og -900 mbar.
- Lad prøverne få stuetemperatur.
- Brug fosfat-bufferet saltvand til at bringe mængden af prøven til det nærmeste nøjagtige volumen (1 ml til 5 ml).
- Opsæt QIAvac 24 Plus som beskrevet på side 19.
- Opvarm et vandbad eller en varmeblok til 56 °C til anvendelse med 50 ml centrifugeringsrør i trin 3.
- Lad QIAamp Mini spin-kolonnerne stå i mindst 1 time ved stuetemperatur før brug.
- Sørg for, at Buffer ACB, Buffer ACW1 og Buffer ACW2 er klargjort (tilsætning af isopropanol eller ethanol) i henhold til vejledningen på side 24.
- Tilsæt bærer-RNA rekonstitueret i Buffer AVE til Buffer ACL i henhold til vejledningen i Tabel 2.

Tabel 2. Mængden af Buffer ACL og bærer-RNA (opløst i Buffer AVE), der kræves til behandling af prøver med 1-5 ml human blodplasma

Opsætning for ml plasma	A	B	C	D	E	Bærer-RNA i Buffer AVE (µl)
	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	
Antal prøver	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

## Procedure: Breeze-protokol

1. Pipetter QIAGEN Proteinase K, plasma og Buffer ACL i denne rækkefølge i et 50 ml centrifugerør (medfølger ikke).

Setup	A	B	C	D	E
ProtK ( $\mu$ l)	100	200	300	400	500
Plasma (ml)	1	2	3	4	5
ACL (ml)	0,8	1,6	2,4	3,2	4

2. Luk hæften og bland ved at puls-vortexe i 5 x 2 sekunder.

Kontrollér, at der dannes en synlig hvirvel i røret. For at sikre effektiv lysering, er det væsentligt, at prøven og Buffer ACL blandes grundigt for at give en homogen opløsning.

Bemærk: Proceduren må ikke afbrydes på dette tidspunkt. Fortsæt med det samme til trin 3 for at starte lysisinkuberingen.

3. Inkubér ved 56 °C ( $\pm 1$  °C) i 15 ( $\pm 1$ ) minutter.
4. Sæt røret tilbage på laboratoriebordet, og skru låget af.
5. Tilsæt Buffer ACB i lysatet i røret. Vælg et volumen i henhold til opsætningen i trin 1.

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

6. Luk hæften og bland grundigt ved at puls-vortexe i 5 x 2 sekunder.

Kontrollér, at der dannes en synlig hvirvel i røret. For at sikre effektiv lysering, er det væsentligt, at lysatet og Buffer ACB blandes grundigt for at give en homogen opløsning.

7. Inkuber blandingen af lysat og Buffer ACB i røret i 5 ( $\pm$ 1) minutter ved stuetemperatur.
8. Isæt QIAamp Mini-kolonnen i VacConnector på QIAvac 24 Plus (se "Opsætning af QIAvac 24 Plus vacuum manifold", side 19). Sæt en 20 ml kolonneforlænger i den åbne QIAamp Mini-kolonne.

Kontrollér, at hver kolonneforlænger sidder korrekt på plads i QIAamp Mini-kolonnen, for at undgå udsivning prøve.

**Bemærk:** Gem vaskerøret til brug ved tørrecentrifugering i trin 13.

9. Tilsæt omhyggeligt lysatet fra trin 7 i den anvendte kolonneforlænger på QIAamp Mini-kolonnen. Tænd for vakuumpumpen. Når alle lysater er trukket helt gennem kolonnerne, skal du slukke vakuumpumpen og frigive trykket til 0 mbar. Fjern og bortskaf omhyggeligt den brugte kolonneforlænger.

Vær opmærksom på, at store prøvelysatmængder (ca. 18 ml, når man starter med en 5 ml prøve) kan kræve op til 20 minutter for at passere gennem QIAamp Mini-membranen ved vakuumkraft.

Hvis der ønskes hurtig og nem vakuumfrigivelse, skal der bruges en Vacuum Regulator (indgår i QIAvac Connecting System).

**Bemærk:** For at undgå krydskontaminering skal du være forsigtig med ikke at krydse ind over tilstødende QIAamp Mini-kolonner under udtagning af kolonneforlængere.

10. Tilsæt 600  $\mu$ l Buffer ACW1 i QIAamp Mini-kolonnen. Lad låget på kolonnen være åbent, og tænd vakuumpumpen. Når al Buffer ACW1 er trukket gennem QIAamp Mini-kolonnen, skal du slukke vakuumpumpen og frigive trykket til 0 mbar.
11. Tilsæt 750  $\mu$ l Buffer ACW2 i QIAamp Mini-kolonnen. Lad låget på kolonnen være åbent, og tænd vakuumpumpen. Når al Buffer ACW2 er trukket gennem QIAamp Mini-kolonnen, skal du slukke vakuumpumpen og frigive trykket til 0 mbar.

12. Tilsæt 750 µl ethanol (96-100 %) i QIAamp Mini-kolonnen. Lad låget på kolonnen være åbent, og tænd vakuumpumpen. Når al ethanolen er trukket gennem spin-kolonnen, skal du slukke vakuumpumpen og frigive trykket til 0 mbar.
13. Luk låget på QIAamp Mini-kolonnen. Tag den ud af vakuumanifolden, og kassér VacConnector. Læg QIAamp Mini-kolonnen i et rent 2 ml vaskerør (fra trin 8), og centrifugér ved fuld hastighed (20.000 x g; 14.000 o./min.) i 3 (±0,5) minutter.
14. Anbring QIAamp Mini-kolonnen i et nyt 2 ml vaskerør. Åbn låget, og inkuber røret med kolonnen ved stuetemperatur i 3 minutter for at tørre membranen helt.
15. Anbring QIAamp Mini-kolonnen i et rent 1,5 ml elueringsrør, det 2 ml vaskerør fra trin 14. Tilsæt forsigtigt 20-150 µl Buffer AVE på midten af QIAamp Mini-kolonmembranen. Luk låget og inkubér ved stuetemperatur i 3 (±0,5) minutter.

Vigtigt: Sørg for, at eluerings-Buffer AVE bringes til stuetemperatur (15-25 °C). Hvis eluering foretages i små mængder (<50 µl), skal elueringsbufferen påføres på midten af membranen for at færdiggøre eluering af bundne nukleinsyrer.

Elueringsmængden er fleksibel og kan tilpasses i henhold til kravene til efterfølgende anvendelser.

Eluering med mindre mængder Buffer AVE giver højere koncentrationer af nukleinsyre, men kan resultere i lavere samlet udbytte.

Det genvundne eluatvolumen kan være op til 5 µl mindre end det elueringsvolumen, der blev tilsat på membranen i QIAamp Mini-kolonnen.

Bemærk: Ved forventede lave NA-udbytter anbefales det at bruge et LoBind-rør til eluering (medfølger ikke).

16. Centrifugér i mikrocentrifuge ved fuld hastighed (20.000 x g; 14.000 o/min.) i 1 minut for at eluere nukleinsyrerne.

# Klassisk protokol: Oprensning af cirkulerende nukleinsyrer fra 1-5 ml humant blodplasma

Denne protokol består af den uændrede protokol i håndbogen til QIAamp DSP Circulating NA Kit, revision 3 (R3) til brug med eksempelvis eksisterende brugervaliderede workflows for 1-5 ml human plasma.

## Vigtige anvisninger før start

- Alle centrifugeringstrin udføres ved stuetemperatur (15-25 °C).
- Sluk for vakuumpet mellem de enkelte trin for at sikre, at der anvendes et ensartet, jævnt vakuum under protokoltrinnene.

Bemærk: Trykket i Vacuum Pump skal være mellem -800 og -900 mbar.

- Lad prøverne få stuetemperatur.
- Brug fosfat-bufferet saltvand til at bringe mængden af prøven til det nærmeste nøjagtige volumen (1 ml til 5 ml).
- Opsæt QIAvac 24 Plus som beskrevet på side 19.
- Opvarm et vandbad eller en varmeblok til 60°C til anvendelse med 50 ml centrifugeringsrør i trin 3.
- Opvarm en varmeblok til 56 °C til anvendelse med 2 ml vaskerør i trin 14.
- Lad QIAamp Mini spin-kolonnerne stå i mindst 1 time ved stuetemperatur før brug.
- Sørg for, at Buffer ACB, Buffer ACW1 og Buffer ACW2 er klargjort (tilsætning af isopropanol eller ethanol) i henhold til vejledningen på side 24.
- Tilsæt bærer-RNA rekonstitueret i Buffer AVE til Buffer ACL i henhold til vejledningen i Tabel 3.



Tabel 3. Mængden af Buffer ACL og bærer-RNA (opløst i Buffer AVE), der kræves til behandling af prøver med 1-5 ml human blodplasma

Opsætning for ml plasma	A	B	C	D	E	Bærer-RNA i Buffer AVE (µl)
	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	
Antal prøver	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

## Procedure: Klassisk protokol

1. Pipetter QIAGEN Proteinase K, plasma og Buffer ACL i denne rækkefølge i et 50 ml centrifugerør (medfølger ikke).

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

2. Luk hæften og bland ved at puls-vortexe i 30 sekunder.

Kontrollér, at der dannes en synlig hvirvel i røret. For at sikre effektiv lysering, er det væsentligt, at prøven og Buffer ACL blandes grundigt for at give en homogen opløsning.

Bemærk: Proceduren må ikke afbrydes på dette tidspunkt. Fortsæt med det samme til trin 3 for at starte lysisinkuberingen.

3. Inkubér ved  $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  i 30 ( $\pm 2$ ) minutter.
4. Sæt røret tilbage på laboratoriebordet, og skru låget af.
5. Tilsæt Buffer ACB i lysatet i røret. Vælg et volumen i henhold til opsætningen i trin 1.

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

6. Luk hæften og bland grundigt ved at puls-vortexe i 30 sekunder.

Kontrollér, at der dannes en synlig hvirvel i røret. For at sikre effektiv lysering, er det væsentligt, at lysatet og Buffer ACB blandes grundigt for at give en homogen opløsning.

7. Inkuber blandingen af lysat og Buffer ACB i røret i 5 ( $\pm$ 1) minutter på is.

8. Isæt QIAamp Mini-kolonnen i VacConnector på QIAvac 24 Plus (se "Opsætning af QIAvac 24 Plus vacuum manifold", side 19). Sæt en 20 ml kolonneforlænger i den åbne QIAamp Mini-kolonne.

Kontrollér, at hver kolonneforlænger sidder korrekt på plads i QIAamp Mini-kolonnen, for at undgå udsivning prøve.

Bemærk: Gem vaskerøret til brug ved tørrecentrifugering i trin 13.

9. Tilsæt omhyggeligt lysatet fra trin 7 i den anvendte kolonneforlænger på QIAamp Mini-kolonnen. Tænd for vakuumpumpen, så der påføres et tryk på -800 til -900 mbar. Når alle lysater er trukket helt gennem kolonnerne, skal du slukke vakuumpumpen og frigive trykket til 0 mbar. Fjern og bortskaf omhyggeligt den brugte kolonneforlænger.

Vær opmærksom på, at store prøvelysatmængder (ca. 18 ml, når man starter med en 5 ml prøve) kan kræve op til 20 minutter for at passere gennem QIAamp Mini-membranen ved vakuumkraft.

Hvis der ønskes hurtig og nem vakuumfrigivelse, skal der bruges en Vacuum Regulator (indgår i QIAvac Connecting System).

Bemærk: For at undgå krydskontaminering skal du være forsigtig med ikke at krydse ind over tilstødende QIAamp Mini-kolonner under udtagning af kolonneforlængere.

10. Tilsæt 600  $\mu$ l Buffer ACW1 i QIAamp Mini-kolonnen. Lad låget på kolonnen være åbent, og tænd vakuumpumpen. Når al Buffer ACW1 er trukket gennem QIAamp Mini-kolonnen, skal du slukke vakuumpumpen og frigive trykket til 0 mbar.

11. Tilsæt 750  $\mu$ l Buffer ACW2 i QIAamp Mini-kolonnen. Lad låget på kolonnen være åbent, og tænd vakuumpumpen. Når al Buffer ACW2 er trukket gennem QIAamp Mini-kolonnen, skal du slukke vakuumpumpen og frigive trykket til 0 mbar.

12. Tilsæt 750 µl ethanol (96-100 %) i QIAamp Mini-kolonnen. Lad låget på kolonnen være åbent, og tænd vakuumpumpen. Når al ethanolen er trukket gennem spin-kolonnen, skal du slukke vakuumpumpen og frigive trykket til 0 mbar.
13. Luk låget på QIAamp Mini-kolonnen. Tag den ud af vakuumanifolden og kassér VacConnector. Læg QIAamp Mini-kolonnen i et rent 2 ml vaskerør (fra trin 8), og centrifuger ved fuld hastighed (20.000 x g; 14.000 o./min.) i 3 (±0,5) minutter.
14. Anbring QIAamp Mini-kolonnen i et nyt 2 ml vaskerør. Åbn låget, og inkuber røret med kolonnen ved 56 °C (±1 °C) i 10 (±1) minutter for at tørre membranen helt.
15. Anbring QIAamp Mini-kolonnen i et rent 1,5 ml elueringsrør, det 2 ml vaskerør fra trin 13. Tilsæt forsigtigt 20-150 µl Buffer AVE på midten af QIAamp Mini-kolonnemembranen. Luk låget og inkubér ved stuetemperatur i 3 (±0,5) minutter.

Vigtigt: Sørg for, at eluerings-Buffer AVE bringes til stuetemperatur (15-25 °C). Hvis eluering foretages i små mængder (<50 µl), skal elueringsbufferen påføres på midten af membranen for at færdiggøre eluering af bundne nukleinsyrer.

Elueringsmængden er fleksibel og kan tilpasses i henhold til kravene til efterfølgende anvendelser.

Eluering med mindre mængder Buffer AVE giver højere koncentrationer af nukleinsyre, men kan resultere i lavere samlet udbytte.

Det genvundne eluatvolumen kan være op til 5 µl mindre end det elueringsvolumen, der blev tilsat på QIAamp Mini-kolonnen.

Bemærk: Ved forventede lave NA-udbytter anbefales det at bruge et LoBind-rør til eluering (medfølger ikke).

16. Centrifuger i mikrocentrifuge ved fuld hastighed (20.000 x g; 14.000 o./min.) i 1 minut for at eluere nukleinsyrerne.

# Kvalitetskontrol

I overensstemmelse med QIAGENs ISO-certificerede kvalitetsstyringssystem testes hvert lot af QIAamp DSP Circulating NA Kits efter fastlagte specifikationer for at sikre en ensartet produktkvalitet.

## Begrænsninger

Systemydelsen til isolering af cirkulerende, cellefrie nukleinsyrer er blevet fastlagt ved anvendelse af humane plasmaprøver genereret fra følgende blodprøvetagningsrør:

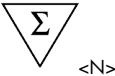












- K2-EDTA (Beckton Dickinson, kat.- nr. 367525)
- PAXgene Blood ccfDNA Tube (PreAnalytiX, kat.- nr. 768115)
- Cell-Free DNA BCT (Streck, kat.- nr. 218962)

Det er brugerens ansvar at validere systemets ydelse for procedurer, der anvendes i deres laboratorium, og som ikke er dækket af QIAGEN-ydelsesundersøgelser.

For at minimere risikoen for en negativ indvirkning på diagnostiske resultater skal der anvendes hensigtsmæssige kontroller for efterfølgende anvendelser. For yderligere validering anbefales retningslinjerne i International Conference on Harmonisation for tekniske krav (ICH) i ICH Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text And Methodology anbefales.

De fremkomne diagnostiske resultater skal fortolkes i forbindelse med andre kliniske fund eller laboratoriefund.

# Symboler

Symbol	Symboldefinition
	Indeholder tilstrækkelige reagenser til <N> test
	Holdbarhedsdato
	Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik
	Ved levering
	Åbnes ved levering; opbevar QIAamp Mini Spin-kolonner ved 2-8 °C
	Katalognummer
	Antal
	Lotnummer
	Materialenummer
	Komponenter
	Volumen
	Tilsætter
	Temperaturbegrænsning



Producent



Læs brugsanvisningen



Skriv dags dato ned efter tilsætning af ethanol i flasken



Ethanol



Skriv dags dato ned efter tilsætning af isopropanol i flasken



Isopropanol



Indeholder



Fører til



Guanidin-thiocyanat



Guanidinhydrochlorid



BRJ 58



Globalt handelsvarenummer

---

## Litteraturhenvisninger

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.

## Kontaktoplysninger

Vedrørende teknisk bistand og yderligere information henvises til vores tekniske supportcenter på [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com), eller du kan henvende dig til en af QIAGENs tekniske serviceafdelinger eller lokale forhandlere (se bagsiden eller besøg [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).



# Fejlfindingsvejledning

Denne fejlfindingsvejledning kan være nyttig til at afhjælpe eventuelle problemer. Kontaktoplysninger findes på bagsiden eller på [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

## Kommentarer og forslag

### Lidt eller ingen nukleinsyre i eluatet

- |    |  |   |
|----|--|---|
| a) | Brug af ikke-stabiliseret plasma                                     | Ikke-stabiliserede plasmaer kan føre til hurtigere DNA- nedbrydning. Vi anbefaler at følge CEN/TS 16835-3:2015. Gentag oprensingsproceduren med nye prøver.   |
| b) | Længere tid mellem blodtapning og klargøring af plasma               | Kerneholdige blodlegemer kan gå i opløsning og frigive genomisk DNA i plasmaet og derved fortynde målnukleinsyren.  |
| c) | Prøver, der har været frosset og optøet mere end én gang             | Undgå gentagen optøning og nedfrysning, da dette kan resultere i forringelse af DNA. Brug altid friske prøver eller prøver, der kun har været optøet én gang.   |
| d) | Lav koncentration af mål-DNA i prøverne                              | Plasmaer har stået for længe ved stuetemperatur. Gentag oprensingsproceduren med nye prøver<br>Bemærk: Nogle personer kan have en lav cellefri NA-koncentration i plasma, og her bør der vælges et større prøvevolumen og et lavt eluatvolumen. |
| e) | Utilstrækkelig prøvelysis i Buffer ACL                               | Hvis QIAGEN Proteinase K har været udsat for forhøjet temperatur i længere tid, kan det miste aktivitet. Gentag proceduren med nye prøver og frisk QIAGEN Proteinase K.   |
| f) | Blandingen af Buffer ACL og bærer-RNA er ikke blandet tilstrækkeligt | Bland Buffer ACL med bærer-RNA ved at vende røret med Buffer ACL og bærer-RNA forsigtigt op og ned mindst 10 gange.   |
| g) | Der er anvendt ethanol med procent frem for 96-100 %                 | Gentag oprensingsproceduren med nye prøver og 96-100 % ethanol. Der må ikke bruges denatureret alkohol, som indeholder andre stoffer, såsom metanol eller methylethylketon.   |
| h) | Buffer ACB er klargjort forkert                                      | Kontrollér, at Buffer ACB-koncentratet blev rekonstitueret med den korrekte mængde isopropanol (ikke ethanol, se side 24).  |
| i) | Buffer ACW1 eller Buffer ACW2 er klargjort forkert                   | Kontrollér, at Buffer ACW1- og Buffer ACW2-koncentraterne blev fortyndet med den rette mængde ethanol (se side 24). Gentag oprensingsproceduren med nye prøver.   |
| j) | Buffer ACW1 eller Buffer ACW2 er klargjort med 70 % ethanol          | Kontrollér, at Buffer ACW1- og Buffer ACW2-koncentraterne blev fortyndet med 96-100 % ethanol (se side 24). Gentag oprensingsproceduren med nye prøver.   |

### DNA eller RNA opfører sig ikke korrekt i efterfølgende enzymreaktioner

- |    |                                |  |
|----|--------------------------------|--|
| a) | Lidt eller intet DNA i eluatet | Se "Lidt eller ingen nukleinsyre i eluatet" ovenfor for at se de mulige årsager. Forøg om muligt den mængde eluat, der tilsættes til reaktionen. |
|----|--------------------------------|--|

## Kommentarer og forslag

- |    |   |  |
|----|---|--|
| b) | Der er anvendt en forkert elueringsmængde | Fastslå den maksimale mængde eluat, der er egnet til din efterfølgende anvendelse. Reducer eller forøg mængden af eluat, der er tilsættes til efterfølgende anvendelse, tilsvarende. Elueringsmængden kan tilpasses proportionalt.<br><br>Bemærk: Eluering med mindre mængder Buffer AVE giver højere koncentrationer af nukleinsyre men kan resultere i et lavere samlet udbytte. |
| c) | Bufferne er ikke blandet grundigt         | Salt- og ethanolkomponenter i vaskebuffer ACW2 have udskilt sig, mens bufferen har henstået i en lang periode mellem kørsler. Bland altid bufferne grundigt før hver kørsel.   |
| d) | Interferens på grund af bærer-RNA         | Hvis tilstedeværelsen af bærer-RNA i eluatet interfererer med den efterfølgende enzymreaktion, kan det være nødvendigt at reducere mængden af bærer-RNA eller udelade det helt.  |

## Generel håndtering

- |    |  |  |
|----|--|--|
| a) | QIAamp Mini-kolonnen er tilstoppet                 | Hvis flowhastigheden reduceres, kan det forlænge vakuumtiden.<br><br>Alternativt skal du lukke VacValve, hvis den anvendes, og forsigtigt fjerne samlingen med kolonneforlænger, VacConnector og VacValve fra QIAamp Mini-kolonnen uden at miste noget af lysatet i kolonneforlængerne.<br><br>Tag QIAamp Mini-kolonnen ud fra vakuumanifolden, anbring den i et 2 ml vaskerør, og centrifuger den på fuld hastighed, indtil prøven er passeret fuldstændigt gennem membranen. Udskift hele den kolonneforlænger-VacConnector-VacValve-enhed, der indeholder det resterende lysat. Tænd vakuumpumpen, åbn VacValve, og fortsæt isætning af det resterende lysat.<br><br>Gentag ovenstående procedure, hvis QIAamp Mini-kolonnen begynder at tilstoppe.<br><br>Der kan være dannet kryopræcipitater i plasmaet grundet gentagen nedfrysning og optøning. Disse kan blokere QIAamp Mini-kolonnen. Der må ikke anvendes plasma, som har været frosset og optøet mere end én gang.<br><br>Hvis der er synlige kryopræcipitater, skal prøven klares ved centrifugering i 5 minutter ved 16.000 x g. |
| b) | Variable elueringsvolumener                        | Forskellige prøver kan påvirke mængden af endeligt eluat. Det genvundne eluatvolumen kan være op til 5 µl mindre end det elueringsvolumen, der blev tilsat på QIAamp Mini-kolonnen.  |
| c) | Vakuumtrykket på -800 til -900 mbar er ikke opnået | Vakuumanifolden er ikke lukket stramt nok. Tryk ned på vakuumanifoldens låg, efter at vakuummet er slået til. Kontrollér, om vakuumtrykket er opnået.<br><br>Pakning på QIAvac-låg er slidt op. Kontrollér pakningen på manifolden visuelt, og udskift den eventuelt.<br><br>VacValves er slidt op. Fjern alle VacValves, og isæt VacConnectors direkte i luer-forlængerne. Sæt QIAamp Mini-kolonner i VacConnectors, luk låget på kolonnerne, og tilslut vakuum. Kontrollér, om vakuumtrykket er opnået. Udskift om nødvendigt VacValves.<br><br>Forbindelsen til vakuumpumpen er utæt. Luk alle luer-forlængere med luer-hætter, og tænd vakuumpumpen. Kontrollér, om vakuumtrykket er stabilt, når pumpen er tændt (og ventilen på Vacuum Regulator er lukket). Udskift om nødvendigt forbindelserne mellem pumpe og vakuumanifold.<br><br>Hvis vakuumtrykket stadig ikke er opnået, skal vakuumpumpen udskiftes med en kraftigere type.  |

# Bilag A: Anbefalinger for separation og opbevaring af blodplasma

For at opnå stabilisering af blodprøvetagningsrør (f.eks. PAXgene ccfDNA-rør eller Streck Cell-Free DNA-rør) skal du følge producentens instruktioner for plasmaseparation og -opbevaring. Vi anbefaler at validere disse opbevaringsbetingelser i kombination med din specifikke efterfølgende anvendelse og dine specifikke mål.

Ved brug af ikke-stabiliseret BCT anbefaler vi at følge CEN/TS 16835-3:2015.

For at isolere cirkulerende, cellefri nukleinsyrer fra blodprøver anbefaler vi at følge denne protokol, der inkluderer et centrifugeringstrin med høj g-kraft for at fjerne cellerester, hvorved mængden af cellulært eller genomisk DNA og RNA i prøven reduceres.

1. Anbring EDTA-fuldblod i BD Vacutainer®-rør (eller andre primære blodrør, der indeholder EDTA som antikoagulant) i en centrifuge, der er afkølet til 4 °C og har udsvingsrotor og passende spande.
2. Blodprøverne centrifugeres i 10 minutter ved 1900 x g (3000 o/min.) ved 4 °C.
3. Aspirer forsigtigt plasmasupernatanten uden at forstyrre det plasma-cellulære kontaktag. Der kan indhentes 4-5 ml plasma fra ét 10 ml primærrør med blod.

Bemærk: Plasma kan bruges til cirkulation af nukleinsyreekstraktion på dette tidspunkt. Følgende højhastighedscentrifugering vil imidlertid fjerne yderligere cellerester og kontaminering af de cirkulerende nukleinsyrer med genomisk DNA og RNA fra beskadigede kerneholdige blodceller.

4. Aspireret plasma overføres til et rent centrifugeringsrør.
5. Centrifuger plasmaprøverne i 10 minutter ved 16.000 x g (i en rotor med fast vinkel) ved 4 °C. Dette vil fjerne yderligere cellulære nukleinsyrer, der er bundet til cellerester.

6. Fjern omhyggeligt supernatanten, og overfør den til et nyt rør uden at forstyrre pelletet.
7. Hvis plasmaet skal anvendes til ekstraktion af nukleinsyrer den samme dag, skal det opbevares ved 2-8 °C frem til videre behandling. Ved længere tids opbevaring kan alikvoter af plasma fra stabiliserede såvel som ikke-stabiliserede blodprøvetagningsrør opbevares ved -20 °C (DNA som mål) eller -80 °C (RNA som mål) i mindst 4 uger. Inden du bruger plasmaet til ekstraktion af cirkulerende nukleinsyre, skal du optø plasmarørene ved stuetemperatur.
8. Valgfrit: For at fjerne eventuelle kryopræcipitater skal du centrifugere plasmaprøverne i 5 minutter ved 16.000 x g (i en rotor med fast vinkel).  
Valgfrit: Overfør supernatanten til et nyt rør, og start derefter protokollen til ekstraktion af cirkulerende nukleinsyre.

---

# Bilag B: Generelle bemærkninger om håndtering af RNA

## Håndtering af RNA

Ribonukleaser (RNase) er meget stabile og aktive enzymer, som normalt ikke kræver kofaktorer, for at være aktive. RNaser er svære at deaktivere og selv små mængder er nok til at nedbryde RNA. Derfor må der ikke anvendes laboratoriematerialer af glas eller plastik uden først at eliminere en eventuel RNase-kontaminering. Vær meget forsigtig med ikke utilsigtet at introducere RNaser til RNA-prøven under eller efter oprensningsproceduren. For at skabe og bevare et RNase-fri miljø, når der arbejdes med RNA, skal de følgende forholdsregler overholdes under forbehandling og brug af engangs- og flegangsbeholdere og opløsninger.

## Generel håndtering

Arbejdet med RNA skal altid følge principperne for korrekt mikrobiologisk og aseptisk arbejdsteknik. Hænder og støvpartikler kan bære bakterier og skimmelsvampe og leverer dermed den hyppigste årsag til RNase-kontaminering. Derfor skal der altid bæres latex- eller vinylhandsker, når der arbejdes med reagenser eller RNA-prøver, for at undgå RNase-kontaminering via huden eller fra støvet laboratorieudstyr. Skift laboratoriehandskerne hyppigt, og hold rørene lukket, når det er muligt. Lad den oprensede RNA forblive på is, når den opdeles til efterfølgende anvendelser.

## Plastartikler engangsbrug

Det anbefales at bruge sterile, RNase-fri engangspolypropylenrør under hele proceduren.

# Bestillingsinformation

Produkt	Indhold	Kat.-nr.
QIAamp DSP Circulating NA Kit (50)	Til 50 præparater: QIAamp Mini-kolonner, kolonneforlængere, VacConnectors, QIAGEN Proteinase K, reagenser, buffere og prøvetagningsrør	61504
Tilbehør		
QIAvac 24 Plus vacuum manifold*	Vakuumanifold til behandling af 1-24 spinkolonner: QIAvac 24 Plus Vacuum manifold, luser-stik og lynkoblinger	19413
Vacuum Pump*	Universal vakuumpumpe	84010 [USA og Canada] 84000 [Japan] 84020 [resten af verden]
QIAvac Connecting System*	System til forbindelse af vakuumanifold med vakuumpumpe: Omfatter bakke, flasker til spildvæske, slanger, koblinger, ventil, måler og 24 VacValves	19419

\* Anvendes med vakuumprotokoller.

For opdateret licensinformation og produktspecifikke ansvarsfraskrivelser henvises til den aktuelle QIAGEN kit-håndbog eller -brugervejledning. QIAGEN kit-håndbøger og brugervejledninger kan fås via [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) eller kan rekvireres hos QIAGENS tekniske service eller den lokale distributør.

# Revisionshistorik for håndbogen

Dato	Ændringer
R4 09/2019	Ændring af Tilsigtet anvendelse udelukkende til cellefri nukleinsyrer fra human plasma. Medtagelse af "Breeze"-protokol. Ingen protokoller for urin og miRNA medtaget. Opdatering af sikkerhedsinformation.

Aftale om begrænset licens til QIAamp DSP Circulating NA Kit

Brug af dette produkt betyder, at enhver køber eller bruger af produktet accepterer følgende vilkår:

1. Produktet må kun anvendes i overensstemmelse med protokoller leveret med produktet og denne håndbog og kun med de komponenter, der er i kittet. QIAGEN giver ingen licens, under nogen intellektuel ejendomsret, til at bruge eller inkludere komponenterne i dette kit med komponenter, der ikke er inkluderet i dette kit, undtagen som beskrevet i de protokoller, der følger med produktet, denne håndbog og andre protokoller, der er tilgængelige på [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Nogle af disse andre protokoller er stillet til rådighed af QIAGEN-brugere for QIAGEN-brugere. Disse protokoller er ikke grundigt testet eller optimeret af QIAGEN. QIAGEN hverken garanterer for dem eller for, at de ikke overtræder tredjeparts rettigheder.
2. Ud over de udtrykkeligt givne licenser giver QIAGEN ingen garanti for, at dette kit og/eller brugen af det, ikke overtræder tredjeparts rettigheder.
3. Dette kit og dets komponenter er under licens til engangsbrug og må ikke genbruges, gendannes eller videresælges.
4. QIAGEN afviser specifikt alle andre licenser, udtrykte eller underforståede, end dem, der udtrykkeligt er angivet.
5. Køberen og brugeren af kittet indvilliger i ikke at tage, eller lade andre tage, skridt, der kunne føre til, eller fremme, handlinger der forbydes ovenfor. QIAGEN kan håndhæve forbuddene i denne begrænsede licensaftale ved enhver domstol og vil inddrive alle undersøgelses- og retsomskostninger, herunder advokatsalærer, i ethvert søgsmål for at håndhæve denne begrænsede licensaftale samt alle deres intellektuelle ejendomsrettigheder i forbindelse med kittet og/eller komponenterne deri.

Opdaterede licensbetingelser kan findes på [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Varemærker: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp® (QIAGEN Group); BD Vacutainer® (Becton, Dickinson and Company); Tween® (ICI Americas Inc.). Registrerede navne, varemærker osv. anvendt i dette dokument må ikke, selv når de ikke specifikt er markeret som sådan, betragtes som værende juridisk ubeskyttede.

1118364 10/2019 HB-0466-005 © 2019 QIAGEN, alle rettigheder forbeholdes.

