

QIAamp[®] DSP Circulating NA Kit -sarjan käyttöohje (käsikirja)



Versio 2



In vitro -diagnostiikkaan



61504



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Saksa



1127632FI

Sisältö

Käyttötarkoitus.....	4
Käyttötarkoituksen mukainen käyttäjä.....	4
Kuvaus ja toimintaperiaate	5
Näytemäärät	5
Lyysausnäytteet	7
Adsorptio QIAamp Mini -kalvoon	7
Jäännöskontaminanttien poistaminen	7
Puhtaiden nukleiinihappojen eluoiminen.....	8
Nukleiinihappojen saanti ja koko	8
Protokollien kuvaus	9
Yhteenveto ja selitykset.....	9
Toimitetut materiaalit	10
Sarjan sisältö	10
Sarjan komponentit.....	11
Tarvittavat materiaalit, jotka eivät kuulu toimitukseen.....	12
Lisäreagenssit	12
Tarvikkeet.....	12
Varusteet	13
Varoitukset ja varotoimet	14
Turvallisuustiedot	14
Tiedot hätätilanteeseen.....	15
Varotoimet.....	15

Hävittäminen	16
Reagenssien säilytys ja käsittely.....	17
Käytöstabiilius	17
Näytteiden säilytys ja käsittely.....	18
Toimenpide.....	19
Puskureiden ja reagenssien valmistelu	26
Breeze-tuuletusprotokolla: Kiertävien nukleiinihappojen puhdistaminen ihmisen 1–5 ml:n veriplasmasta	29
Tavallinen protokolla: Kiertävien nukleiinihappojen puhdistaminen 1–5 ml:sta ihmisen veriplasmaa	34
Laadunvalvonta	38
Rajoitukset	39
Suorituskykyominaisuudet	40
Lähdeviitteet	41
Vianmääritysopas	42
Symbolit	45
Liite A: Suositus veriplasman erottamiselle ja säilyttämiseksi.....	48
Liite B Yleisiä huomautuksia RNA:n käsittelystä.....	50
Tilautiedot	51
Asiakirjan muutoshistoria	52

Käyttötarkoitus

QIAamp DSP Circulating NA Kit -tarvikesarja on järjestelmä, joka hyödyntää piidioksidikalvoteknologiaa (QIAamp-teknologia) kiertävän soluttoman DNA:n ja RNA:n manuaaliseen eristämiseen ja puhdistamiseen ihmisen veriplasmanäytteistä.

QIAamp DSP Circulating NA Kit -tarvikesarja on tarkoitettu in vitro -diagnostiikkaan.

Käyttötarkoituksen mukainen käyttäjä

Tuote on tarkoitettu ammattihenkilöiden, kuten molekyylibiologisen koulutuksen saaneiden teknikoiden ja lääkäreiden, käyttöön.

Kuvaus ja toimintaperiaate

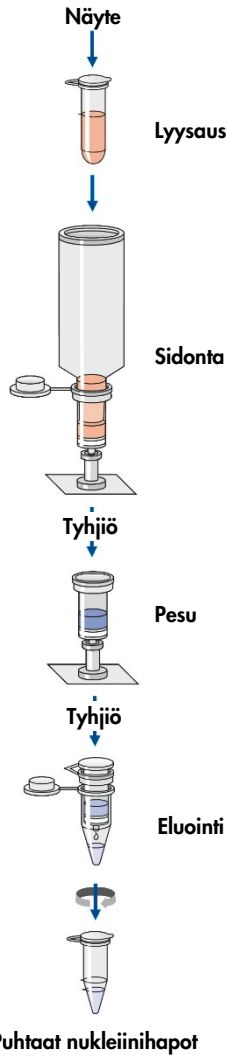
QIAamp DSP Circulating NA -testi sisältää 4 vaihetta (lyysaus, sidonta, pesu ja eluointi), ja se suoritetaan QIAvac-järjestelmän QIAamp Mini -putkien avulla. Tämä luotettava testitapa vähentää näytteiden välistä ristikontaminaatiota ja on käyttäjille turvallisempi mahdollisesti tarttuvien näytteitä käsiteltäessä.

Testi on yksinkertainen ja sopii siksi jopa 24 näytteen käsittelyyn samanaikaisesti alle 2 tunnin aikana.

Näytemäärät

QIAamp Mini -putket sitovat fragmentoidut nukleiinihapot, jotka ovat vain 20 nt:n pituisia. Niiden saanti riippuu kuitenkin näytemäärästä ja näytteen kiertävien nukleiinihappojen pitoisuudesta (plasmassa yleensä 1–100 ng/ml). QIAamp DSP Circulating NA -testi on optimoitu jopa 5 ml:n näytemäärille.

QIAamp DSP Circulating
NA Kit -testi



Kuva 1. Yleiskatsaus QIAamp DSP Circulating NA Kit -testiin.

Lyysausnäytteet

Biologisten nesteiden vapaasti kiertävät nukleiinihapot ovat yleensä sitoutuneet proteiineihin tai rakkuloiden sisälle, jolloin tehokas lyysausvaihe on välttämätön nukleiinihappojen vapauttamiseen QIAamp Mini -putken valintaan perustuvaa sidontaa varten. Tällöin näytteet lysataan erittäin denaturoivissa olosuhteissa korkeissa lämpötiloissa proteinaasi K:n ja Buffer ACL:n läsnäollessa, mikä takaa DNAasiin ja RNAasiin inaktivoitumisen ja nukleiinihappojen vapautumisen proteiineista, lipideistä ja rakkuloista, joihin ne olivat sitoutuneet.

Adsorptio QIAamp Mini -kalvoon

Jotta kiertävien nukleiinihappojen optimaalinen sitoutuminen kalvoon on mahdollista, sidontaolosuhteissa lysaattiin on lisätty Buffer ACB. Lysaatit siirretään tämän jälkeen QIAamp Mini -putkeen, ja kiertävät nukleiinihapot adsorboidaan suuresta määrästä piidioksidikalvoon samalla, kun lysaatti viedään sen läpi tyhjiöpaineen avulla. Suola ja pH-olosuhteet varmistavat, että suurin osa proteiineista ja muista kontaminanteista, jotka voivat estää PCR-reaktioita ja muita myöhempiä entsymaattisia reaktioita, eivät jää QIAamp Mini -kalvolle.

Tyhjiöputkisto (esim. QIAvac 24 Plus, jossa QIAvac Connecting System) ja alipainepumppu, jonka avulla pystytään tuottamaan ~800–900 mbarin tyhjiö (esim. QIAGEN® Vacuum Pump) ovat tässä protokollassa pakollisia. Vacuum Regulator -ohjauslaitetta (osa QIAvac Connecting System -järjestelmää) pitää käyttää, jotta tyhjiöpaineen ja tyhjiön kätevä vapautuksen seuraaminen on helppoa.

Jäännöskontaminanttien poistaminen

Nukleiinihapot jäävät sidotuiksi kalvoon, kun taas kontaminantit pestään tehokkaasti pois 3 pesuvaiheen aikana.

Puhtaiden nukleiinihappojen eluoiminen

Eluoiminen suoritetaan Buffer AVE:n avulla. Yhden vaiheen aikana hyvin puhtaat kiertävät nukleiinihapot eluoidaan Buffer AVE:ssä, joka on tasapainotettu huoneenlämpöiseksi. Joustava eluutiilavuus (50–150 µl) on mahdollinen. Jos tarvitaan suurempia nukleiinihappopitoisuuksia, eluutiilavuutta voidaan laskea jopa 20 µl:n tasolle. Eluution alle 50 µl:n tilavuus johtaa suurempaan nukleiinihappotilavuuteen, mutta saattaa aiheuttaa myös matalamman kokonaissaannin.

Saatu eluaattimäärä voi olla noin 5 µl pienempi kuin column-putkeen lisätyn eluutiopuskurin määrä.

Nukleiinihappojen saanti ja koko

Vapaasti kiertävien ja biologisista näytteistä eristettyjen nukleiinihappojen saanti on yleensä alle 1 µg, minkä takia niitä on vaikeaa määrittää spektrofotometrillä. Kiertävän DNA:n ja RNA:n absoluuttinen saanti, joka on saatu näytteestä QIAamp DSP Circulating NA Kit -tarvikesarjan avulla, vaihtelee näytteestä ja yksilöstä riippuen. Siihen vaikuttavat myös muut tekijät (esim. tietyt sairaudet). Lisäksi eristettyjen nukleiinihappojen kantaja-RNA todennäköisesti dominoi UV-absorbanssilukemia (katso sivu 27). Kvantitatiivisia monistusmenetelmiä suositellaan saannin määrittämiseen.

QIAamp DSP Circulating NA Kit -tarvikesarjan avulla puhdistettujen kiertävien nukleiinihappojen kokojakauma voidaan tarkistaa agarosigeelielektrofooresilla, kohteelle spesifioidun merkityn koettimen (1) hybridisaatiolla tai mikrofluidisella elektrofooresiliouksella (esim. Agilent® Bioanalyzer -järjestelmällä).

Protokollien kuvaus

Tässä käsikirjassa esitellään kaksi erilaista protokollaa.

- ”Breeze-tuuletusprotokolla: Kiertävien nukleiinihappojen puhdistaminen ihmisen 1–5 ml:n veri-plasmasta” (sivu 29) on tarkoitettu jopa 5 ml:n plasman prosessointiin 1 ml:n osissa, ja se on optimoitu matalamman kynnyksen käytännöllisyyttä ja lyhyttä läpimenoaikaa varten.
- ”Tavallinen protokolla: Kiertävien nukleiinihappojen puhdistaminen 1–5 ml:sta ihmisen veri-plasmaa” (sivu 34) on tarkoitettu jopa 5 ml:n plasman prosessointiin 1 ml:n osissa, ja se koostuu *QIAamp DSP Circulating NA Kit -tarvikesarjan käsikirjan* version 1 päivitetystä versiossa 3 (R3) esitetystä muuttumattomasta protokollasta.

Yhteenveto ja selitykset

Vapaasti kiertävät nukleiinihapot ovat ihmisen plasmassa yleensä lyhyinä fragmentteina (< 1000 bp (DNA), < 1000 nt (RNA)) tai jopa niin pieninä kuin 20 nt (miRNAs). Vapaasti kiertävien nukleiinihappojen pitoisuus ihmisen veri-plasmassa on yleensä matala ja vaihtelee huomattavasti yksilöiden välillä. Vaihteluväli on 1–100 ng/ml ihmisten näytteissä (2–6).

QIAamp DSP Circulating NA Kit -tarvikesarja mahdollistaa kiertävien nukleiinihappojen tehokkaan puhdistamisen ihmisen plasmasta. Näytteet voivat olla joko tuoreita tai pakastettuja. QIAvac 24 Plus -järjestelmän pidennysputket ja tyhjiökäsittely mahdollistavat aloitusnäytteiden enintään 5 ml:n tilavuuden, ja joustavat eluotiotilavuudet (20–150 µl) sallivat matalissa pitoisuuksissa olevien nukleiinihappolajien keskittämisen.

Eluoitu ja vapaasti kiertävä genominen DNA tai RNA on valmista käytettäväksi myöhemmissä käyttötarkoituksissa, tai sen voi varastoida. Käyttäjien kannattaa optimoida omassa laboratorioissaan plasman määrä ja eluotiotilavuus kyseessä olevan kohteen ja myöhemmän sovelluksen perusteella.

Toimitetut materiaalit

Sarjan sisältö

QIAamp DSP Circulating NA Kit	(50)
Tuotenumero	61504
Preparaatioiden määrä	50

	Nimi	Symbolit	Määrä
QIAamp Mini	QIAamp Mini columns with Wash Tubes (WT) (2 ml) (QIAamp Mini -putket ja Wash Tubes (WT) -pesuputket, 2 ml)	COL	50
EXT	Column Extenders (20 ml) (putkenpidentäjät, 20 ml)	COL EXT	2 x 25
WT	Wash Tubes (2 ml) (pesuputket, 2 ml)	WASH TUBE	50
ET	Elution Tubes (1,5 ml) (eluutioputket, 1,5 ml)	ELU TUBE	50
VC	VacConnectors (VacConnector-liittimet)	VAC CON	50
ACL*	Lysis Buffer (lyysauspuskuri)*	LYS BUF	220 ml
ACB*	Binding Buffer* (sidospuskuri*, tiiviste)	BIND BUF CONC	300 ml
ACW1*	Wash Buffer 1 (pesupuskuri 1*, tiiviste)	WASH BUF 1 CONC	19 ml
ACW2†	Wash Buffer 2† (pesupuskuri 2†, tiiviste)	WASH BUF 2 CONC	13 ml
AVE†	Elution Buffer† (eluutiopuskuri†, violetit korkit)	ELU BUF	5 x 2 ml
PROTK	QIAGEN Proteinase K (QIAGEN-proteinaasi K)	PROTK	4 x 7 ml
Carrier	Carrier RNA (kantaja-RNA, punaiset korkit)	CAR RNA	310 µg
QIAamp Mini	QIAamp Mini columns with Wash Tubes (WT) (2 ml) (QIAamp Mini -putket ja Wash Tubes (WT) -pesuputket, 2 ml)	COL	50
	Käsikirja	H B	1

* Sisältää kaotrooppista suolaa. Katso sivulta 14 Varoitukset ja varoitoimet.

† Sisältää natriumatsidia säilöntäaineena.

Sarjan komponentit

Sarjan tärkeimmät osat on esitelty alla.

Taulukko 1. Toimitettujen reagenssien vaikuttavat ainesosat

Reagenssi		Vaikuttava ainesosa	Pitoisuus
Symboli	Nimi		
ACL	Lysis Buffer (lyysauspuskuri)	Guanidiiniitiosyanaatti	≥ 30 – < 50 % w/w
ACB	Binding Buffer (sidospuskuri, tiiviste)	Guanidiiniitiosyanaatti	≥ 30 – < 50 % w/w
ACW1	Wash Buffer 1 (pesupuskuri 1, tiiviste)	Guanidiinihydrokloridi	≥ 30 – < 60% w/w
ACW2	Wash Buffer 2 (pesupuskuri 2, tiiviste)	Ei mitään	–
AVE	Elution Buffer (eluutiopuskuri, violetit korkit)	Ei mitään	–
PROTK	QIAGEN Proteinase K (QIAGEN-proteinaasi K)	Proteinaasi K	≥ 1 – < 3 % w/w
Carrier	Carrier RNA (kantaja-RNA, punaiset korkit)	Ei mitään	–

Kontrollit ja kalibraattorit

Jotta voidaan minimoida nukleiinihapon eristyksen jälkeen luotuihin diagnostisiin tuloksiin kohdistuvan negatiivisen vaikutuksen riski, myöhemmissä käyttötarkoituksissa on hyödynnettävä riittävää laaduntarkkailua.

Tarvittavat materiaalit, jotka eivät kuulu toimitukseen

Lisäreagenssit

- Etanolia (96–100 %)*
- Isopropanoli (100%)
- Jäämurskaa (vain "Tavallinen protokolla: Kiertävien nukleiinihappojen puhdistaminen 1–5 ml:sta ihmisen veri-plasmaa".)
- Jotkin näytteet saattavat vaatia fosfaattipuskuroidulla keittosuolalla laimennusta

Tarvikkeet

- Pipettejä (säädettäviä)
- Steriilejä pipetinkärkiä (on suositeltavaa käyttää aerosoliesteillä varustettuja pipetinkärkiä, jotta ristikontaminaatio voidaan estää)
- 1,5 tai 2 ml:n nukleasittomia mikroputkia
- 50 ml:n sentrifugiputkia

* Älä käytä denaturoitua alkoholia, joka sisältää muita aineita, kuten metanolia tai metyylietyyliketonia.

Varusteet

- Vesihaude tai lämmitin, johon mahtuu 50 ml:n sentrifugiputkia lämpötilassa 56 °C tai 60 °C.*
- Lämmitin tai samantapainen laite, johon mahtuu 2 ml:n pesuputket lämpötilassa 56 °C (vain tavallinen protokolla)*
- Vortex-laite
- Mikrosentrifugi (jossa on roottori 2 ml:n putkille)*
- QIAvac 24 Plus vacuum manifold (tuotenro 19413)
- QIAvac Connecting System -järjestelmä (tuotenro 19419) tai vastaava
- Vacuum Pump (tuotenro 84010 [USA ja Kanada], 84000 [Japani] tai 84020 [muut maat]) tai vastaava pumppu, jolla voidaan tuottaa –800...–900 mbarin tyhjiö.
- Valinnainen: VacValves (tuotenro 19408)

* Varmista, että välineet on tarkastettu ja kalibroitu valmistajan ohjeiden mukaan.

Varoitukset ja varotoimet

Huomaa, että saatat joutua tarkistamaan paikalliset määräykset laitteeseen liittyvien vakavien vaaratilanteiden raportoinnista valmistajalle ja käyttäjän ja/tai potilaan oleskelumaan toimivaltaiselle viranomaiselle.

In vitro -diagnostiikkaan

Turvallisuustiedot

Työskenneltäessä kemikaalien kanssa on aina käytettävä asianmukaista laboratoriotakkia, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoa saa tuotekohtaisista käyttöturvallisuustiedoista. Ne ovat saatavana PDF-tiedostoina Internet-osoitteessa www.qiagen.com/safety. Voit hakea, lukea ja tulostaa kaikkien QIAGEN-tarvikesarjojen ja niiden osien käyttöturvallisuustiedotteet (Safety Data Sheet, SDS).

VAROITUS

Loukkaantumisvaara



ÄLÄ lisää valkaisuainetta tai happamia liuoksia suoraan näytteen preparointijätteeseen.

Buffer ACL, Buffer ACB ja Buffer ACW1 sisältävät guanidiinisuoloja, jotka valkaisuaineen kanssa yhdistettyinä voivat muodostaa herkästi reagoivia aineita.

Jos näitä puskureita sisältävää nestettä läikkyä, puhdista se laboratorioskäyttöön sopivalla puhdistusaineella ja vedellä. Jos läikkyneet neste sisältää mahdollisia tartunnanaiheuttajia, puhdista alue ensin laboratorioskäyttöön sopivalla puhdistusaineella ja vedellä sekä sen jälkeen 1-prosenttisellä (v/v) natriumhypokloriitilla.

- Näytteet voivat olla tartuntavaarallisia. Hävitä näyte- ja määritysäte paikallisten turvallisuuskäytäntöjen mukaisesti.

Tiedot hätätilanteeseen

CHEMTREC

Yhdysvaltojen ja Kanadan ulkopuolella 1-800-424-9300

Yhdysvaltojen ja Kanadan ulkopuolella +1 703-527-3887

Varotoimet

Seuraavat varoitus- ja varotoimenpidelausunnot pätevät QIAamp DSP Circulating NA Kit -tarvikesarjan osiin.

Buffer ACB



Sisältää: guanidiiniytosyanaattia. Vaara! Terveydelle haitallista nieltynä. Voi olla haitallista ihokosketuksessa tai hengitettynä. Aiheuttaa vakavia palo- ja silmävammoja. Haitallista vesieliölle, pitkäaikaisia haittavaikutuksia. Kosketus happoihin vapauttaa erittäin myrkyllistä kaasua. Käytä suojakäsineitä/suojavaatetusta/silmäsuojaimia/kasvosuojainta. JOS KEMIKAALIA JOUTUU SILMIIN: huuhtelee huolellisesti vedellä useiden minuuttien ajan. Poista mahdolliset piilolinssit, jos ne ovat helposti poistettavissa. Jatka huuhtelua. Soita heti MYRKYTYSTIETOKESKUKSEEN tai lääkärille.

Buffer ACL



Sisältää: guanidiiniytosyanaattia. Vaara! Terveydelle haitallista nieltynä. Voi olla haitallista ihokosketuksessa tai hengitettynä. Aiheuttaa vakavia palo- ja silmävammoja. Haitallista vesieliölle, pitkäaikaisia haittavaikutuksia. Kosketus happoihin vapauttaa erittäin myrkyllistä kaasua. Käytä suojakäsineitä/suojavaatetusta/silmäsuojaimia/kasvosuojainta. JOS KEMIKAALIA JOUTUU SILMIIN: huuhtelee huolellisesti vedellä useiden minuuttien ajan. Poista mahdolliset piilolinssit, jos ne ovat helposti poistettavissa. Jatka huuhtelua. Soita heti MYRKYTYSTIETOKESKUKSEEN tai lääkärille.

Buffer ACW1



Sisältää: guanidiinihydrokloridi. Varoitus! Haitallista nieltynä tai hengitettynä. Aiheuttaa ihoärsytystä. Aiheuttaa vakavaa silmien ärsytystä. Käytä suojakäsineitä/suojavaatetusta/silmäsuojaimia/kasvosuojainta. Riisu altistuneet vaatteet, ja pese ne ennen seuraavaa käyttöä. Hävitä sisältö tai säiliö toimittamalla se hyväksytyyn jätealaitukseen.

Proteinaasi K



Sisältää: proteinaasi K:ta. Vaara! Aiheuttaa vähäistä ihoärsytystä. Voi aiheuttaa hengitettynä allergia- tai astmaoireita tai hengitysvaikeuksia. Vältä pölyn/savun/kaasun/sumun/höyryn/suihkeen hengittämistä. Käytä suojakäsineitä/suojavaatetusta/silmäsuojaimia/kasvosuojainta. Käytä hengityksensuojainta. Aaliistumistapauksessa tai epävarmoissa tilanteissa: Ota yhteys MYRKYTYSTIETOKESKUKSEEN tai lääkäriin. Vie altistunut henkilö raittiiseen ilmaan ja pidä hänet hengityksen kannalta mukavassa asennossa. Hävitä sisältö tai säiliö toimittamalla se hyväksytyyn jätelaitokseen.

Hävittäminen

Jätteet sisältävät näytteitä ja reagensseja. Ne saattavat sisältää myrkyllistä tai tartuntavaarallista materiaalia, joten ne on hävitettävä asianmukaisesti. Selvitä asianmukainen hävitystapa paikallisista turvamääräyksistä.

Lisätietoa saa tuotekohtaisista käyttöturvatiedotteista (Safety Data Sheet, SDS). Ne ovat saatavilla PDF-muotoisina verkossa sivulla www.qiagen.com/safety, jossa voit tarkastella ja tulostaa kaikkien QIAGEN-sarjan ja sarjakomponentin käyttöturvallisuustiedotteita (Safety Data Sheet, SDS).

Reagenssien säilytys ja käsittely

QIAamp Mini -putkia pitää säilyttää kuivassa, 2–8 °C:n lämpötilassa. Kaikkia puskuireita on säilytettävä huoneenlämmössä (15–25 °C). QIAamp Mini -putket ja QIAamp Mini -puskurit voidaan säilyttää näissä olosuhteissa tarvikesarjan pakkauksessa lukevaan viimeiseen käyttöpäivään asti ilman, että tuotteiden suorituskyky huononee.

Kylmäkuivattua kantaja-RNA:ta pitää säilyttää huoneenlämmössä (15–25 °C) pakkauksessa ilmoitettuun vanhenemispäivään asti. Kantaja-RNA pitää laimentaa Buffer AVE:ssä, ja laimennettu kantaja-RNA pitää lisätä Buffer ACL:ään välittömästi sivun 30 ohjeiden mukaisesti (Breeze-tuuletusprotokolla) tai sivun 35 ohjeiden mukaisesti (tavallinen protokolla). Tämä liuos pitää valmistaa juuri ennen käyttöä. Käyttämättömät kantaja-RNA-annokset, jotka on laimennettu Buffer AVE:ssä, pitää jäädä alikvooteiksi –30...–15 °C:n lämpötilassa.

QIAamp DSP Circulating NA Kit -tarvikesarja sisältää käyttövalmiin proteinaasi K -liuoksen, joka laimennetaan erityisesti valmistetussa varastopuskurissa. Proteinaasi K on vakaa pakkauksessa ilmoitettuun vanhenemispäivään asti, kun se säilytetään huoneenlämmössä (15–25 °C).

Käyttöstabiilius

Sarja voidaan käyttää 12 kuukauden sisällä ensimmäisestä käyttökerrasta tai viimeiseen käyttöpäivään asti, sen mukaan, kumpi on ensin.

Näytteiden säilytys ja käsittely

Veren säilytys ja käsittely

Jotta soluttomien nukleiinihappojen hajoamiselta ja solujen nukleiinihappojen vapautumiselta vällyttäisiin, suosittelemme kokoveren säilyttämistä enintään 6 tunnin ajan 2–8 °C:n lämpötilassa (esim. EDTA-näytteet). Jos käytössäsi on stabiloituja verinäyteputkia, ota huomioon valmistajan suosittelemat säilytysolosuhteet. Suosittelemme näiden säilytysolosuhteiden validointia sen mukaan, millaisia myöhempiä käyttötarkoituksia ja kohteita sinulla on näytteille.

Plasman säilytys ja käsittely

Plasman erottaminen ja nukleiinihappojen eristäminen on suositeltavaa välittömästi verenluovutuksen jälkeen, jos EDTA:ta on käytetty antikoagulaattina (erityisesti RNA:ta käsiteltäessä). Plasmaa voi säilyttää lyhytaikaisesti jopa 24 tuntia 2–8°C:n lämpötilassa.

Pidemmän säilytyksen aikana plasman alikvootit sekä stabiloimattomat verinäyteputket voidaan säilyttää –20 °C:n tai –80 °C:n lämpötilassa 12 kuukauden ajan (kun kohteena on DNA) tai –80 °C:n lämpötilassa 4 viikon ajan (kun kohteena on RNA).

Eluoitujen nukleiinihappojen säilytys

Eluoidut nukleiinihapot voidaan kerätä 1,5 ml:n eluutioputkiin (kuuluvat pakkaukseen). Puhdistetut kiertävät nukleiinihapot voidaan säilyttää jopa 24 tunnin ajan 2–8 °C:n lämpötilassa. Jos säilytystä tarvitaan yli 24 tunniksi, lämpötilan suositellaan olevan –30...–15 °C (DNA) ja –90...–60 °C (RNA) myöhempiä käyttötarkoituksia varten.

Toimenpide

Tärkeitä huomioita ennen kuin aloitat

QIAvac 24 Plus

QIAvac 24 Plus on suunniteltu nopeaan ja tehokkaaseen 24:n QIAGEN-pyörityskolonnin yhtäaikaiseen tyhjiökäsittelyyn. Näytteet ja pesuliukset viedään putken kalvon läpi tyhjiön avulla sen sijaan että ne sentrifugoitaisiin, jolloin toimenpide tapahtuu nopeammin ja sen ihmisen toimia edellyttäviin puhdistustoimenpiteisiin käytetty aika vähenee.

QIAvac Connecting System -järjestelmän avulla QIAvac 24 Plus -järjestelmää voidaan käyttää läpivirtausjärjestelmänä. Läpivirtausnäyte kerätään erilliseen jätetulloon.

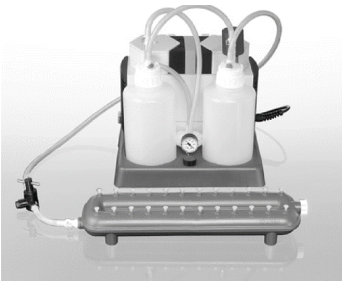
QIAvac 24 Plus -järjestelmän huollosta on tietoa käsittelyohjeissa, katso *QIAvac 24 Plus -käsikirja*.

QIAamp Mini -putkien käsittely QIAvac 24 Plus -järjestelmässä

QIAamp Mini -putkia käsitellään QIAvac 24 Plus -järjestelmässä kertakäyttöisten VacConnectors-liittimien ja uudelleenkäytettävien VacValves-venttiilien avulla. VacValves-venttiilit (valinnaisia) on asennettu suoraan QIAvac 24 Plus -putkiston luer-aukkoihin, jolloin ne takaavat tasaisen huuhtelunopeuden ja eri näytemäärien samanaikaisen käsittelyn. Niitä pitää käyttää, jos näytteiden huuhtelunopeudet eroavat toisistaan merkittävästi. Näin voidaan varmistaa tyhjiön yhdenmukaisuus. VacConnectors-liittimet ovat kertakäyttöisiä, ja ne sopivat QIAamp Mini -putkien ja VacValves-venttiilien tai QIAamp Mini -putkien ja QIAvac 24 Plus -järjestelmän luer-aukkojen väliin. Ne estävät pyörityskolonnin ja VacValves-venttiilin suoran kontaktin puhdistuksen aikana. Näin myös mahdolliset näytteiden väliset ristikontaminaatiot vältetään. VacConnectors-liittimet on hävitettävä käytön jälkeen. QIAvac Connecting System -järjestelmä (tai samankaltainen kokoonpano, jossa on jätetulot) vaaditaan suurten liuosmäärien käytön vuoksi (katso kuva 2).

Käsittelyohjeet QIAvac 24 Plus -järjestelmälle

- Aseta QiAvac 24 Plus aina tasaiselle pöydälle tai työskentelytasolle. Jos QiAvac 24 Plus -järjestelmä tippuu tasolta, sen putkisto saattaa haljeta.
- Säilytä QiAvac 24 Plus -järjestelmää aina puhtaana ja kuivana. Katso järjestelmän puhdistustoimenpiteet *QIAvac 24 Plus -käsikirjasta*.
- QIAvac 24 Plus -järjestelmän osat eivät kestä tiettyjä liuottimia (taulukko 2). Jos näitä liuottimia läikkyy järjestelmälle, huuhtele se perusteellisesti vedellä.
- Älä levitä silikonista tai tyhjiörasvaa QIAvac 24 Plus -putkiston osiin. Näin taataan järjestelmän yhdenmukainen suorituskyky.
- Ole aina varovainen ja käytä suojalaseja työskennellessäsi paineistetun tyhjiöputkiston lähellä.
- Ota yhteyttä QIAGENin tekniseen palvelupisteeseen tai paikalliseen jälleenmyyjään, jos haluat lisätietoja varaosista tai vaihtotuotteista.
- Tyhjiöpaine tarkoittaa paine-eroa tyhjiöputkiston sisäosien ja sen ulkopuolisen tilan välillä (tavallinen ilmanpaine on 1013 mbar tai 760 mmHg), ja se voidaan mitata QIAvac Connecting System -järjestelmän avulla (katso kuva 2). Protokollat vaativat tyhjiöpumppua, joka pystyy tuottamaan tyhjiön -800...-900 mbarin paineen (esim. QIAGEN Vacuum Pump -tyhjiöpumppu). Korkeampia tyhjiöpaineita on vältettävä. Suositeltujen tyhjiöpaineiden alittaminen saattaa johtaa nukleiinihappojen saantiin ja puhdistukseen, mikä saattaa aiheuttaa kalvojen tukkeutumista.



Kuva 2. QIAvac 24 Plus -järjestelmä, QIAvac Connecting System -järjestelmä ja Vacuum Pump -tyhjiöpumppu.

Taulukko 2. QIAvac 24 Plus -järjestelmän kemikaalinkestävyys

Kestää seuraavia aineita		Ei kestä seuraavia aineita
Etikkahappo	Kaatrooppiset suolat	Bentseeni
Kromihappo	Alkoholiivisteet	Fenoli
SDS	Natriumkloridi	Kloroformi
Tween™ 20	Urea	Tolueeni
Klooripohjainen valkaisuaine	Suolahappo	Eetterit
Natriumhydroksidi		

QIAvac 24 Plus vacuum manifold -tyhjiöjärjestelmän valmisteleminen

1. Yhdistä QIAvac 24 Plus -järjestelmä tyhjiön tuottajaan. Jos käytössä on QIAvac Connecting System, yhdistä järjestelmä putkistoon ja tyhjiön tuottajaan *QIAvac 24 Plus -käsikirjan* liitteen A ohjeiden mukaan.
2. Aseta VacValve-venttiili (valinnainen) jokaiseen QIAvac 24 Plus -järjestelmän käyttöön tulevaan luer-aukkoon (katso kuva 3). Sulje käyttämättömät luer-aukot luer-tulpilla tai sulje asetettu VacValve-venttiili.
VacValves-venttiilejä tulee käyttää, jos näytteiden virtausnopeudet eroavat merkittävästi. Näin varmistetaan yhdenmukainen tyhjiö.
3. Aseta VacConnector-liitin jokaiseen VacValve-venttiiliin (katso kuva 3).
Suorita tämä vaihe välittömästi ennen puhdistamisen aloittamista, jotta VacConnectors-liittimet eivät kontaminoituisi ilmasta.
4. Aseta QIAamp Mini -putket putkiston VacConnector-liittimiin (katso kuva 3).
Huomautus: Ota pesuputki talteen kuplamuovipakkauksesta puhdistusprotokollaa varten.
5. Aseta putkenpidentäjä (20 ml) jokaiseen QIAamp Mini -putkeen (katso kuva 3).
Huomautus: Varmista, että putkenpidentäjä on asetettu QIAamp Mini -putkeen tiukasti, jotta näytteen vuotamiselta vältytään.
6. Seuraa protokollien ohjeita nukleinihappojen puhdistamisessa. Hävitä VacConnectors-liittimet asianmukaisesti käytön jälkeen.

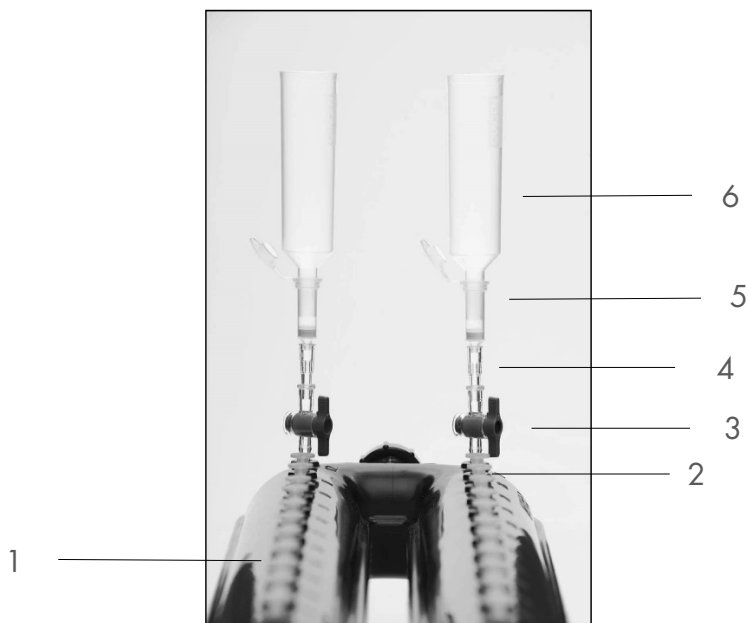
Jätä QIAamp Mini -putken kansi auki, kun muodostat tyhjiötä.

Katkaise tyhjiön muodostaminen vaiheiden välillä. Näin varmistetaan käsittelyn yhdenmukainen ja tasainen tyhjiö. Jos haluat vapauttaa tyhjiön nopeammin, Vacuum Regulator -säätöastetta on käytettävä (osa QIAvac Connecting System -järjestelmää).

Huomautus: VacValve-venttiilit voidaan sulkea yksitellen sen jälkeen, kun näyte on viety kokonaan pyörityskolonnin läpi. Tämä mahdollistaa eri kokoisten ja viskoosisuudeltaan eroavien näytteiden samanaikaisen käsittelyn.

7. Puhdista QiAvac 24 Plus -järjestelmä näytteiden käsittelyn jälkeen (katso "QiAvac 24 Plus -järjestelmän puhdistus ja dekontaminointi" julkaisussa *QiAvac 24 Plus -käsikirja*).

Huomautus: ACL-, ACB- ja ACW1-puskurit eivät ole yhteensopivia valkaisuaineita sisältävien desinfiointiaineiden kanssa. Katso sivulta 14 Varoitukset ja varotoimet.

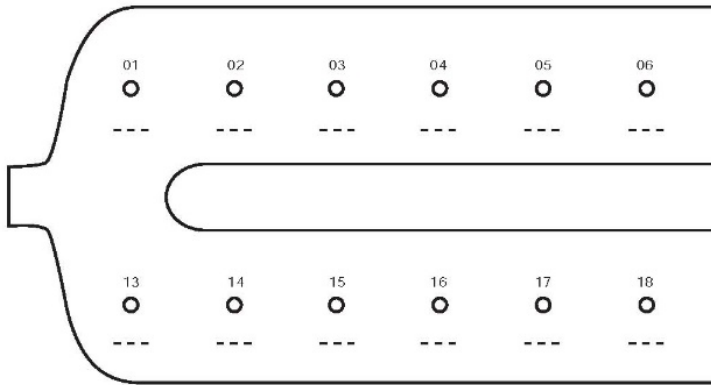


Kuva 3. QIAamp Mini -putkien asentaminen QIAvac 24 Plus -järjestelmään VacValves-venttiilien, VacConnector-liittimien ja putkenpidentäjien avulla.

- | | | | |
|---|--|---|------------------------|
| 1 | QIAvac 24 Plus vacuum manifold -tyhjiöputkisto | 4 | VacConnector-liittimet |
| 2 | QIAvac 24 Plus -järjestelmän luer-aukko (suljettu luer-
tulpalla) | 5 | QIAamp Mini -putki |
| 3 | VacValve-venttiili* | 6 | Putkenpidentäjä |

Suosittellemme putkien ja QIAvac 24 Plus -tyhjiöjärjestelmän käytössä olevien QIAamp Mini -putkien merkitsemistä kuvassa 4 esitetyn mallin mukaan, jotta näytteet eivät sekoitu keskenään. Tämän kuvan voi kopioida ja siihen voi merkitä näytteiden nimet.

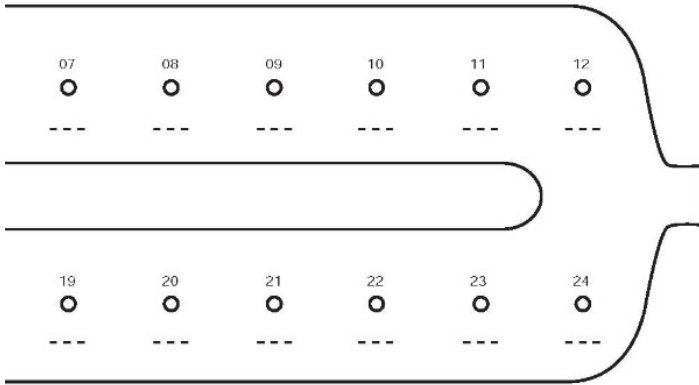
* Pitää ostaa erikseen.



Päiväys: _____

Käyttäjä: _____

Ajon tunnist: _____



Kuva 4. Putkien ja QIAamp Mini -putkien merkintämalli käytettäväksi QIAvac 24 Plus -tyhjiöjärjestelmässä.

Puskureiden ja reagenssien valmistelu

Buffer ACB

Lisää 200 ml isopropanolia (100 %) 300 ml:aan Buffer ACB -liuosta ennen käyttöä, jotta saat 500 ml Buffer ACB:tä. Sekoita hyvin isopropanolin lisäämisen jälkeen.

Buffer ACW1 *

Lisää 25 ml etanolia (96–100 %) 19 ml:aan Buffer ACW1 -puskuriliuosta ennen käyttöä, jotta saat 44 ml Buffer ACW1 -puskuria. Sekoita hyvin etanolin lisäämisen jälkeen.

Buffer ACW2 †

Lisää 30 ml etanolia (96–100 %) 13 ml:aan Buffer ACW2 -puskuriliuosta ennen käyttöä, jotta saat 43 ml Buffer ACW2 -puskuria. Sekoita hyvin etanolin lisäämisen jälkeen.

Kantaja-RNA:n lisääminen Buffer ACL:ään *

Kantaja-RNA:lla on kaksi tarkoitusta: ensinnäkin se tehostaa nukleiinihappojen sitoutumista QIAamp Mini -kalvoon erityisesti silloin, kun näytteessä on hyvin vähän kohdemolekyylejä. Suuren kantaja-RNA-määrän lisääminen myös vähentää RNA:n pilaantumisen mahdollisuutta siinä harvinaisessa tapauksessa, että RNAasi-molekyylit eivät välty denaturoitumiselta kaatrooppisten suolojen ja Buffer ACL:n sisältämän puhdistusaineiden vaikutuksesta.

Lyofilisoidun kantaja-RNA:n määrä on riittävä tarvikepakkauksessa mukana tulleelle Buffer ACL -määrälle. Kantaja-RNA:n suositeltu pitoisuus on säädetty niin, että QIAamp DSP Circulating NA -protokollaa voidaan käyttää yleisenä puhdistusjärjestelmänä. Se on yhteensopiva monien eri monistusjärjestelmien kanssa ja se sopii monenlaisten RNA- ja DNA-kohteiden käsittelyyn.

* Sisältää kaatrooppista suolaa. Katso sivulta 14 Varoitukset ja varotoimet.

† Sisältää natriumatsidia säilöntäaineena.

Erilaisten monistusjärjestelmien tehokkuus vaihtelee reaktiossa läsnä olevien nukleiinihappojen kokonaismäärän mukaan. Tarvikesarjan eluaatit sisältävät sekä kiertäviä nukleiinihappoja että kantaja-RNA:ta, ja useimmissa tapauksissa kantaja-RNA:n määrä ylittää kiertävien nukleiinihappojen määrän selvästi. Tämän takia eristettyjen kiertävien nukleiinihappojen UV-absorbanssilukeman kvantifiointi ei anna luotettavaa tulosta, sillä kantaja-RNA vaikuttaa tällaisten mittaustapojen tuloksiin.

Jotta saadaan korkeimmat herkkyytasot monistusreaktioissa, voi olla tarpeen vähentää lisätyn kantaja-RNA-liuoksen määrää Buffer ACL:ssä.

Kantaja-RNA:ta ei pidä lisätä vapaasti kiertävien nukleiinihappojen eristämisen aikana sellaisissa monistusjärjestelmissä, joissa on oligo-dT-alukkeita.

Lisää 1550 µl Buffer AVE:tä * 310 µg lyofilisoitua kantaja-RNA:ta sisältävään putkeen, jotta saat pitoisuudeltaan 0,2 µg/µl liuoksen. Liuota kantaja-RNA perusteellisesti, jaa se kätevän kokosiini alikvootteihin ja säilytä niitä -30...-15 °C:ssa. Älä pakasta ja sulata kantaja-RNA:n alikvootteja toistuvasti.

Huomaa, että kantaja-RNA ei liukene Buffer ACL:ään. Se pitää ensin liuottaa Buffer AVE:hen ja lisätä sitten Buffer ACL:ään.

Laske, kuinka paljon Buffer ACL:n ja kantaja-RNA:n muodostamaa seosta tarvitaan kuhunkin näyte-erään, protokollien taulukoiden avulla. Valitse samanaikaisesti käsiteltävien näytteiden määrä.

Sekoita kääntelemällä putkea tai pulloa varovasti 10 kertaa. Älä vorteksoi, jotta vaahtoamiselta vältytään.

*Sisältää natriumatsidia säilöntäaineena.

Huomautus: Näytteen valmistelutoimenpide on optimoitu enintään 1,0 µg:lle kantaja-RNA:ta näytettä kohden. Jos monistusjärjestelmäsi todistettavasti toimii paremmin pienemmällä määrällä kantaja-RNA:ta, siirrä vain vaadittu määrä liuennutta kantaja-RNA:ta Buffer ACL:ää sisältäviin putkiin. Lisää Buffer ACL:ään 5 µl liuennutta kantaja-RNA:ta jokaista valmisteluvaiheessa vaadittua kantaja-RNA:n mikrogrammaa kohden. (Alle 1,0 µg:n kantaja-RNA-määrän käyttö näytettä kohden voi olla hyödyllistä, ja se on validoitava kunkin näytetyypin ja myöhemmän määrityksen osalta.)

Breeze-tuuletusprotokolla: Kiertävien nukleiinihappojen puhdistaminen ihmisen 1–5 ml:n veriplasmasta

Tätä protokollaa käytetään kiertävän DNA:n tai RNA:n puhdistamiseen 1–5 ml:stä ihmisen veriplasmasta, ja se on optimoitu matalan kynnyksen käytännöllisyyttä ja lyhyttä läpimenoaikaa varten. Jos haluat lisätietoja käyttäjien validoiduista työkuluista QIAamp DSP Circulating NA Kit -tarvikesarjan 1/R3-versioon liittyen, katso ”Tavallinen protokolla: Kiertävien nukleiinihappojen puhdistaminen 1–5 ml:stä ihmisen veriplasmasta” (sivu 34).

Tärkeitä huomioita ennen kuin aloitat

- Kaikki sentrifugointivaiheet on suoritettava huoneenlämmössä (15–25 °C).
- Katkaise tyhjiön virta vaiheiden välillä, jotta voit varmistua yhdenmukaisesta ja tasaisesta tyhjiöstä protokollan eri vaiheiden välillä.
Huomautus: Vacuum Pump -tyhjiöpumpun paineen pitää olla –800...–900 mbar.
- Tasapainota näytteet huoneenlämpöön.
- Täydennä näytteen määrää lähimpään tarkkaan lukuun (1–5 ml) fosfaattipuskuroidulla keittosuolalla.
- Valmistele QIAvac 24 Plus -järjestelmä sivun 21 kuvauksen mukaan.
- Kuumenna vesihaude tai lämmitin 56 °C:n lämpötilaan, jotta niitä voidaan käyttää 50 ml:n sentrifugiputkien kanssa vaiheessa 3.
- Tasapainota QIAamp Mini -pyörityskolonne huoneenlämpöön vähintään yhtä tuntia ennen käyttöä.
- Varmista, että Buffer ACB, Buffer ACW1 ja Buffer ACW2 on valmisteltu (lisäämällä isopropanolia tai etanolia), sivulla 26 olevien ohjeiden mukaan.
- Lisää Buffer AVE:ssä käyttövalmiiksi saatettua kantaja-RNA:ta Buffer ACL:ään taulukon 3 ohjeiden mukaan.

Taulukko 3. Buffer ACL:n ja kantaja-RNA:n määrä (Buffer AVE:hen liuenneet), joka vaaditaan 1–5 ml:n ihmisen veriplasmanäytteiden käsittelyyn

Plasman määrän (ml) asetukset	A	B	C	D	E	
	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	
Näytteiden määrä	Buffer ACL (ml)					Kantaja-RNA:n määrä Buffer AVE:ssä (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

Toimenpide: Breeze-tuuletusprotokolla

1. Pipetoi QIAGEN Proteinase K, plasma ja Buffer ACL **tässä järjestyksessä** 50 ml:n sentrifugiputkeen (ei sisälly pakkaukseen).

Asetus	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. Sulje korkki ja sekoita pulssivorteksilla 5 x 2 sekunnin ajan.

Varmista, että näkyvä nestepyörre syntyy putkessa. Jotta saadaan aikaan tehokas lyysi, näytteen ja Buffer ACL:n läpikotainen sekoittuminen ja liuoksen homogeenisuus on tärkeää.

Huomautus: Älä keskeytä toimenpidettä tämän ajan sisällä. Siirry heti vaiheeseen 3 ja aloita lysin inkuboiminen.

3. Inkuboi 56 °C:ssa (± 1 °C) 15 (± 1) minuutin ajan.
4. Aseta putki takaisin laboratorion pöydälle ja kierrä korkki auki.
5. Lisää Buffer ACB putkessa olevaan lysaattiin. Valitse määrä vaiheen 1 valmisteluosion mukaan.

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

6. Sulje korkki ja sekoita huolellisesti pulssivorteksilla 5 x 2 sekunnin ajan.

Varmista, että näkyvä nestepyörre syntyy putkessa. Jotta saadaan aikaan tehokas lyysi, lysaatin ja Buffer ACB:n läpikotainen sekoittuminen ja liuoksen homogeenisuus on tärkeää.

- Inkuboi lysaatin ja Buffer ACB:n muodostamaa seosta putkessa 5 (\pm 1) minuutin ajan huoneenlämmössä.
- Aseta QIAamp Mini -putki QIAvac 24 Plus -järjestelmän VacConnector-liittimeen (katso "QIAvac 24 Plus vacuum manifold -tyhjiöjärjestelmän valmisteleminen" sivulla 21). Aseta 20 ml:n putkenpidentäjä avoimeen QIAamp Mini -putkeen.

Varmista, että putkenpidentäjä on asetettu tiukasti QIAamp Mini -putkeen, jotta näytteen vuotamiselta vältytään.

Huomautus: Laita pesuputki talteen vaiheen 13 kuivapyöritystä varten.

- Laita vaiheen 7 lysaatti varovasti QIAamp Mini -putken putkenpidentäjäan. Kytke virta tyhjiöpumpuun. Kun kaikki lysaattit on viety putkien läpi kokonaan, katkaise tyhjiöpumpun virta ja vapauta paine 0 millibaariin. Poista putkenpidentäjä varovasti ja hävitä se.

Huomaa, että näytteiden suurilla lysaattimäärillä (noin 18 ml, jos aloitetaan 5 ml:n näytteellä) saattaa kestää jopa 20 minuuttia kulkea läpi QIAamp Mini -kalvon tyhjiöpaineen vaikutuksesta.

Jotta tyhjiöpaineen vapauttaminen on nopeaa ja kätevää, Vacuum Regulator -säätönelin suositellaan käytettäväksi (osa QIAvac Connecting System -järjestelmää).

Huomautus: Jotta ristikontaminaatiolta vältytään, älä laita QIAamp Mini -putkia ristiin putkenpidentäjiä poistettaessa.

- Laita 600 μ l Buffer ACW1:tä QIAamp Mini -putkeen. Jätä putken korkki auki ja avaa tyhjiöpumppu. Kun kaikki Buffer ACW1 on viety QIAamp Mini -putken läpi, katkaise tyhjiöpumpun virta ja vapauta paine 0 millibaariin.
- Laita 750 μ l Buffer ACW2:tä QIAamp Mini -putkeen. Jätä putken korkki auki ja avaa tyhjiöpumppu. Kun kaikki Buffer ACW2 on viety QIAamp Mini -putken läpi, katkaise tyhjiöpumpun virta ja vapauta paine 0 millibaariin.
- Laita 750 μ l etanolia (96–100 %) QIAamp Mini -putkeen. Jätä putken korkki auki ja avaa tyhjiöpumppu. Kun kaikki etanoli on viety pyörityskolonniin läpi, katkaise tyhjiöpumpun virta ja vapauta paine 0 millibaariin.

13. Sulje QIAamp Mini -putken kansi. Poista se tyhjiöputkistosta ja hävitä VacConnector-liitin. Aseta QIAamp Mini -putki puhtaaseen 2 ml:n pesuputkeen (vaiheesta 8) ja sentrifugoi täydellä teholla (20 000 x g; 14 000 rpm) 3 ($\pm 0,5$) minuutin ajan.
14. Aseta QIAamp Mini -putki uuteen 2 ml:n pesuputkeen. Avaa kansi ja inkuboi kokoonpanoa huoneenlämmössä 3 minuutin ajan, jotta kalvo kuivuu kokonaan.
15. Aseta QIAamp Mini -putki puhtaaseen 1,5 ml:n eluutioputkeen (sisältyy pakkaukseen) ja hävitä 2 ml:n pesuputki (jota käytettiin vaiheessa 14). Laita 20–150 μ l Buffer AVE:tä QIAamp Mini -putken kalvon keskelle. Sulje korkki ja inkuboi huoneenlämpötilassa 3 ($\pm 0,5$) minuutin ajan.

Tärkeää: Varmista, että Buffer AVE -eluutiopuskuri on tasapainotettu huoneenlämpöiseksi (15-25 °C). Jos elutio suoritetaan pienille määrille (< 50 μ l), elutiopuskuri on annosteltava kalvon keskelle, jotta sitoutuneet nukleiinihapot eluoituvat kokonaan.

Eluutiotilavuus on joustava, ja sitä voi säätää vastaamaan myöhempien käyttötarkoitusten vaatimuksia.

Buffer AVE:n pienempien määrien elutio johtaa korkeampaan nukleiinihappopitoisuuteen, mutta saattaa myös aiheuttaa pienempää kokonaissaantia.

Saatu eluaattimäärä voi olla jopa 5 μ l vähemmän kuin QIAamp Mini -putken kalvolle levitetty eluutiotilavuus.

Huomautus: Jos NA-saannin odotetaan olevan vähäistä, vähän sitovan putken käyttäminen eluution aikana on suositeltavaa (ei sisälly pakkaukseen).

16. Käytä mikrosentrifugissa täydellä teholla (20 000 x g tai 14 000 rpm) 1 minuutin ajan, jotta nukleiinihapot eluoituvat.

Huomautus: Suuntaa eluutioputkien korkit niin, että ne osoittavat päinvastaiseen suuntaan roottorin pyörimiseen nähden (esim. jos roottori pyörii myötäpäivään, aseta korkit vastapäivään).

Tavallinen protokolla: Kiertävien nukleiinihappojen puhdistaminen 1–5 ml:sta ihmisen veri-plasmaa

Tämä protokolla koostuu QIAamp DSP Circulating NA Kit -tarvikesarjan käsikirjan 3. version (R3) muuttumattomasta protokollasta, jota käytetään esim. olemassa olevissa käyttäjien validoimissa työvaiheissa 1–5 ml:lle ihmisen plasmaa.

Tärkeitä huomioita ennen kuin aloitat

- Kaikki sentrifugointivaiheet on suoritettava huoneenlämmössä (15–25 °C).
- Katkaise tyhjiön virta vaiheiden välillä, jotta voit varmistua yhdenmukaisesta ja tasaisesta tyhjiöstä protokollan eri vaiheiden välillä.
Huomautus: Vacuum Pump -tyhjiöpumpun paineen pitää olla –800...–900 mbar.
- Tasapainota näytteet huoneenlämpöön.
- Täydennä näytteen määrää lähimpään tarkkaan lukuun (1–5 ml) fosfaattipuskuroidulla keittosuolalla.
- Valmistele QIAvac 24 Plus -järjestelmä sivun 21 kuvauksen mukaan.
- Kuumenna vesihaude tai lämmitin 60°C lämpötilaan, jotta niitä voidaan käyttää 50 ml:n sentrifugiputkien kanssa vaiheessa 3.
- Aseta lämmitin 56 °C lämpötilaan. Lämmitintä käytetään 2 ml:n pesuputkien kanssa vaiheessa 14.
- Tasapainota QIAamp Mini -pyörityskolonnia huoneenlämmössä vähintään 1 tunnin ajan ennen käyttöä.
- Varmista, että Buffer ACB, Buffer ACW1 ja Buffer ACW2 on valmisteltu (lisäämällä isopropanolia tai etanolia) sivulla 26 olevien ohjeiden mukaan.
- Lisää Buffer AVE:ssä käyttövalmiiksi saatettua kantaja-RNA:ta Buffer ACL:ään taulukon 4 ohjeiden mukaan.

Taulukko 4. Buffer ACL:n ja kantaja-RNA:n määrä (Buffer AVE:hen liuennet), joka vaaditaan 1–5 ml:n ihmisen veriplasmanäytteiden käsittelyyn

Plasman määrän (ml) asetukset	A	B	C	D	E	
	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	
Näytteiden määrä	Buffer ACL (ml)					Kantaja-RNA:n määrä Buffer AVE:ssä (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

Toimenpide: Tavallinen protokolla

1. Pipetoi QIAGEN Proteinase K, plasma ja Buffer ACL tässä järjestyksessä 50 ml:n sentrifugiputkeen (ei sisälly pakkaukseen).

Asetus	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. Sulje korkki ja sekoita pulssivorteksilla 30 sekunnin ajan.

Varmista, että näkyvä nestepyörre syntyy putkessa. Jotta saadaan aikaan tehokas lyysi, näytteen ja Buffer ACL:n läpikotainen sekoittuminen ja liuoksen homogeenisuus on tärkeää.

Huomautus: Älä keskeytä toimenpidettä tämän ajan sisällä. Siirry heti vaiheeseen 3 ja aloita lysin inkuboiminen.

3. Inkuboi 60 °C:ssa (± 1 °C) 30 (± 2) minuutin ajan.
4. Aseta putki takaisin laboratorion pöydälle ja kierrä korkki auki.
5. Lisää Buffer ACB putkessa olevaan lysaattiin. Valitse määrä vaiheen 1 valmisteluosion mukaan.

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

6. Sulje korkki ja sekoita huolellisesti pulssivorteksilla 30 sekunnin ajan.

Varmista, että näkyvä nestepyörre syntyy putkessa. Jotta saadaan aikaan tehokas lyysi, lysaatin ja Buffer ACB:n läpikotainen sekoittuminen ja liuoksen homogeenisuus on tärkeää.

7. Inkuboi lysaatin ja Buffer ACB:n sekoitus putkessa 5 (± 1) minuutin ajan jäähäuteessa.

8. Aseta QIAamp Mini -putki QIAvac 24 Plus -järjestelmän VacConnector-liittimeen (katso "QIAvac 24 Plus vacuum manifold -tyhjiöjärjestelmän valmisteleminen" sivulla 21). Aseta 20 ml:n putkenpidentäjä avoimeen QIAamp Mini -putkeen.

Varmista, että putkenpidentäjä on asetettu tiukasti QIAamp Mini -putkeen, jotta näyteen vuotamiselta vältytään.

Huomautus: Laita pesuputki talteen vaiheen 13 kuivapyöritystä varten.

9. Laita vaiheen 7 lysaatti varovasti QIAamp Mini -putken putkenpidentäjänsä. Kytke virta tyhjiöpumppuun säätämällä siihen -800...-900 millibaarin paine. Kun kaikki lysaatit on viety putkien läpi kokonaan, katkaise tyhjiöpumpun virta ja vapauta paine 0 millibaariin. Poista putkenpidentäjä varovasti ja hävitä se.

Huomaa, että näytteiden suurilla lysaattimäärillä (noin 18 ml, jos aloitetaan 5 ml:n näytteellä) saattaa kestää jopa 20 minuuttia kulkea läpi QIAamp Mini -kalvon tyhjiöpaineen vaikutuksesta.

Jotta tyhjiöpaineen vapauttaminen on nopeaa ja kätevää, Vacuum Regulator -säätönelin suositellaan käytettäväksi (osa QIAvac Connecting System -järjestelmää).

Huomautus: Jotta ristikontaminaatiolta vältytään, älä laita QIAamp Mini -putkia ristiin putkenpidentäjiä poistettaessa.

10. Laita 600 µl Buffer ACW1:tä QIAamp Mini -putkeen. Jätä putken korkki auki ja avaa tyhjiöpumppu. Kun kaikki Buffer ACW1 on viety QIAamp Mini -putken läpi, katkaise tyhjiöpumpun virta ja vapauta paine 0 millibaariin.
11. Laita 750 µl Buffer ACW2:tä QIAamp Mini -putkeen. Jätä putken korkki auki ja avaa tyhjiöpumppu. Kun kaikki Buffer ACW2 on viety QIAamp Mini -putken läpi, katkaise tyhjiöpumpun virta ja vapauta paine 0 millibaariin.
12. Laita 750 µl etanolia (96–100 %) QIAamp Mini -putkeen. Jätä putken korkki auki ja avaa tyhjiöpumppu. Kun kaikki etanoli on viety pyörityskolonnin läpi, katkaise tyhjiöpumpun virta ja vapauta paine 0 millibaariin.
13. Sulje QIAamp Mini -putken kansi. Poista se tyhjiöputkistosta ja hävitä VacConnector-liitin. Aseta QIAamp Mini -putki puhtaaseen 2 ml:n pesuputkeen (vaiheesta 8) ja sentrifugoi täydellä teholla (20 000 x g; 14 000 rpm) 3 (±0,5) minuutin ajan.

14. Aseta QIAamp Mini -putki uuteen 2 ml:n pesuputkeen. Avaa kansi ja inkuboi kokoonpanoa 56 °C (± 1 °C) lämpötilassa 10 (± 1) minuutin ajan, jotta kalvo kuivuu kokonaan.
15. Aseta QIAamp Mini -putki puhtaaseen 1,5 ml:n eluutioputkeen (sisältyy pakkaukseen) ja hävitä 2 ml:n pesuputki (jota käytettiin vaiheessa 13). Laita 20–150 μ l Buffer AVE:tä QIAamp Mini -putken kalvon keskelle. Sulje korkki ja inkuboi huoneenlämpötilassa 3 ($\pm 0,5$) minuutin ajan.

Tärkeää: Varmista, että Buffer AVE -eluutiopuskuri on tasapainotettu huoneenlämpöiseksi (15-25 °C). Jos eluutio suoritetaan pienille määrille (< 50 μ l), eluutiopuskuri on annosteltava kalvon keskelle, jotta sitoutuneet nukleiinihapot eluoiutuvat kokonaan.

Eluutiotilavuus on joustava, ja sitä voi säätää vastaamaan myöhempien käyttötarkoitusten vaatimuksia.

Buffer AVE:n pienempien määrien eluutio johtaa korkeampaan nukleiinihappopitoisuuteen, mutta saattaa myös aiheuttaa pienempää kokonaissaantia. Saatua eluaattimäärä voi olla jopa 5 μ l vähemmän kuin QIAamp Mini -putkeen levitetty eluutiotilavuus.

Huomautus: Jos NA-saannin odotetaan olevan vähäistä, vähän sitovan putken käyttäminen eluution aikana on suositeltavaa (ei sisälly pakkaukseen).

16. Käytä mikrosentrifugissa täydellä teholla (20 000 x g tai 14 000 rpm) 1 minuutin ajan, jotta nukleiinihapot eluoiutuvat.

Huomautus: Suuntaa eluutioputkien korkit niin, että ne osoittavat päinvastaiseen suuntaan roottorin pyörimiseen nähden (esim. jos roottori pyörii myötäpäivään, aseta korkit vastapäivään).

Laadunvalvonta

QIAGENin ISO-sertifioidun laadunvarmistusjärjestelmän mukaisesti jokainen QIAamp DSP Circulating NA Kit -tarvikesarjaerä testataan määrättyjen vaatimusten mukaisesti tuotteiden yhdenmukaisen laadun takaamiseksi.

Rajoitukset

Järjestelmän suorituskyky kiertävien ja soluttomien nukleiinihappojen eristämistä varten on luotu ihmisen plasmanäytteiden pohjalta seuraavista Blood Collection Tubes -verinäyteputkista johtamalla:

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

Käyttäjän vastuulla on validoida järjestelmän suorituskyky kaikissa niissä laboratoriossa käytetyissä menetelmissä, joita QIAGENin tekemät suorituskykytutkimukset eivät kata.

Jotta voidaan minimoida diagnostiin tuloksiin kohdistuvan negatiivisen vaikutuksen riski, myöhemmissä käyttötarkoituksissa on hyödynnettävä riittävää laaduntarkkailua. Lisävalidointiin suositellaan käytettäväksi seuraavia ohjeita: International Conference on Harmonization of Technical Requirements (ICH), julkaisussa ICH Q2(R1) Validation Of Analytical Procedures: Test And Methodology.

Saatu diagnostinen tulos on tulkittava yhdessä muiden kliinisten löydösten tai laboratoriolöydösten kanssa.

Suorituskykyominaisuudet

Soveltuvat suorituskykyominaisuudet ovat saatavilla tuotesivun materiaalivälilehdestä osoitteessa www.qiagen.com.

Lähdeviitteet

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.

Vianmääritysopas

Tämä vianmääritysopas voi auttaa mahdollisissa esiin tulevissa ongelmissa. Katso myös usein kysytyjä kysymyksiä (Frequently Asked Questions, FAQ) teknisen tuen sivulta: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. QIAGENin teknisen palvelun asiantuntijat vastaavat mielellään kysymyksiisi joko tähän käsikirjaan liittyvistä tiedoista ja/tai protokollista tai näyte- ja määritystekniikoista (katso yhteystiedot osoitteesta www.qiagen.com).

Huomautuksia ja ehdotuksia

Vähän tai ei yhtään nukleiinihappoja eluaatissa

- | | | |
|----|--|---|
| a) | Stabiloimattoman plasman käyttö | Stabiloimattomien plasmanäytteiden käyttö saattaa johtaa DNA:n lisääntyneeseen hajoamiseen. Suosittelemme CEN/TS 16835-3:2015 -ohjeen noudattamista. Toista puhdistustoimenpide uusille näytteille. |
| b) | Pidentynyt aika verinäytteen oton ja plasman valmistelun välillä | Nukleoituneet verisolut saattavat hajota ja vapauttaa genomista DNA:ta plasmaan, jolloin kohteen nukleiinihappo laimenee. |
| c) | Näytteet, jotka on jäädytetty ja sulatettu useammin kuin kerran. | Toistuvaa pakastamista ja sulattamista on vältettävä, sillä se saattaa johtaa DNA:n hajoamiseen. Käytä aina tuoreita näytteitä tai vain kerran sulatettuja näytteitä. |
| d) | Näytteiden kohde-DNA:n pieni pitoisuus | Plasmanäytteet jätettiin huoneenlämpöön liian pitkäksi aikaa. Toista puhdistustoimenpide uusille näytteille.
Huomautus: Joidenkin ihmisten plasman soluttoman NA:n pitoisuus saattaa olla pieni. Tällöin pitää valita suurempi määrä näytettä ja pieni eluaattimäärä. |
| e) | Näytteen tehoton lyysaus Buffer ACL:ssä | Jos QIAGEN Proteinase K on altistunut korkeille lämpötiloille pitkittyneesti, sen vaikutus saattaa heiketä. Toista toimenpide uusilla näytteillä ja tuoreella QIAGEN Proteinase K:lla. |
| f) | Buffer ACL:n ja kantaja-RNA:n muodostamaa seosta ei ole sekoitettu tarpeeksi | Sekoita Buffer ACL kantaja-RNA:n kanssa käänтелеillä näitä aineita sisältävää putkea varovasti ainakin 10 kertaa. |
| g) | Matalaprosenttisen etanolin käyttö 96–100-prosenttisen sijasta | Toista puhdistustoimenpide uusille näytteille 96–100-prosenttisellä etanolilla. Älä käytä denaturoitua alkoholia, joka sisältää muita aineita, kuten metanolia tai metyylietyyliketonia. |
| h) | Buffer ACB on valmisteltu väärin | Tarkista, että Buffer ACB:n pitoisuus saatettiin käyttövalmiiksi oikealla määrällä isopropanolia (ei etanolia, katso sivu 26). |

Huomautuksia ja ehdotuksia

- | | | |
|----|--|---|
| i) | Buffer ACW1 tai Buffer ACW2 on valmisteltu väärin | Tarkista, että Buffer ACW1- ja Buffer ACW2 -puskuriliuokset laimennettiin oikealla määrällä etanolia (katso sivu 26). Toista puhdistustoimenpide uusille näytteille. |
| j) | Buffer ACW1 tai 70-prosenttisella etanolilla valmisteltu Buffer ACW2 | Tarkista, että Buffer ACW1- ja Buffer ACW2 -puskuriliuokset on laimennettu 96–100-prosenttisellä etanolilla (katso sivu 26). Toista puhdistustoimenpide uusille näytteille. |

RNA tai DNA ei toimi hyvin entsyymireaktioissa

- | | | |
|----|--|--|
| a) | Vähän tai ei yhtään DNA:ta eluaatissa | Katso mahdolliset syyt kohdasta "Vähän tai ei yhtään nukleiinihappoja eluaatissa" yltä. Suurena reaktioissa käytettyä eluaatin määrää tarvittaessa. |
| b) | Käytetty väärä eluutiolavuus | Määritä sopiva eluaatin enimmäismäärä myöhempiä käyttötarkoituksia varten. Pienennä tai suurena myöhempiä käyttötarkoituksia varten lisättyä eluaattimäärää sen mukaisesti. Eluutiolavuutta voidaan säätää samassa suhteessa.
Huomaus: Buffer AVE:n pienempien määrien elutio johtaa korkeampaan nukleiinihappopitoisuuteen, mutta saattaa myös aiheuttaa pienempää kokonaissaantia. |
| c) | Puskureita ei ole sekoitettu perusteellisesti. | Buffer ACW2 -pesupuskurin suolo- ja etanolikomponentit ovat ehkä eronneet toisistaan, koska se on jätetty seisomaan pitkiksi ajoiksi ajojen välillä. Sekoita puskurit aina perusteellisesti ennen jokaista ajoa. |
| d) | Kantaja-RNA:n aiheuttama häiriö | Jos eluaatin kantaja-RNA aiheuttaa häiriötä myöhemmässä entsyymireaktiossa, voi olla tarpeen pienentää kantaja-RNA:n määrää tai jättää se kokonaan pois. |

Yleinen käsittely



- | | | |
|----|--------------------------------|--|
| a) | Tukkeutunut QIAamp Mini -putki | Jos virtausnopeutta on vähennetty, tyhjiön aikaa voidaan pidentää. Vaihtoehtoisesti voit sulkea VacValve-venttiilin, jos se on ollut käytössä, ja poistaa putkenpidentäjän, VacConnector-liittimen ja VacValve-venttiilin muodostaman kokoonpanon QIAamp Mini -putkesta ilman, että menetät putkenpidentäjän lysaatteja.
Poista QIAamp Mini -putki tyhjiöputkistosta, aseta se 2 ml:n pesuputkeen ja pyöritä sitä täydellä teholla kunnes näyte on läpäissyt kalvon kokonaan. Korvaa putkenpidentäjän, VacConnector-liittimen ja VacValve-venttiilin kokoonpano, joka sisältää jäljellä olevat lysaattit.
Kytke virta tyhjiöpumppuun, avaa VacValve-venttiili ja jatka lopun lysaatin asetelua.
Toista ylläoleva toimenpide, jos QIAamp Mini -putki tukkeutuu edelleen.
Plasmaan on saattanut muodostua kryosaostumia toistuvan jäädyttämisen ja sulattamisen vuoksi. Ne saattavat tukkia QIAamp Mini -putken. Älä käytä plasmaa, joka on jäädytetty ja sulatettu enemmän kuin kerran. |
|----|--------------------------------|--|

Huomautuksia ja ehdotuksia

- Jos kryosaostumat ovat näkyviä, puhdista näyte käyttämällä sitä sentrifugissa 5 minuutin ajan teholla 16 000 x g.
- b) Vaihtelevat eluutiotilavuudet Eri näytteet voivat vaikuttaa lopullisen eluaatin määrään. Saatua eluaattimäärä voi olla jopa 5 µl vähemmän kuin QIAamp Mini -putkeen levitetty eluutiotilavuus.
- c) -800...-900 millibaarin tyhjiöpainetta ei saavutettu Tyhjiöputkistoa ei ole suljettu tiukasti. Paina tyhjiöputkiston kantta alas kun tyhjiö on käynnistetty. Tarkista, onko tyhjiöpaine saavutettu. QIAvac-kannen tiiviste on loppuunkulunut. Tarkista putkiston tiiviste silmämääräisesti ja vaihda tarpeen vaatiessa. VacValves-venttiilit ovat loppuunkuluneet. Poista kaikki VacValves-venttiilit ja aseta VacConnectors-liittimet suoraan luerpidennyksiin. Aseta QIAamp Mini -putket VacConnectors-liittimiin, sulje putkien kansi ja käynnistä tyhjiö. Tarkista, onko tyhjiöpaine saavutettu. Vaihda VacValves-venttiilit tarpeen vaatiessa. Tyhjiöpumpun liitäntä vuotaa. Sulje kaikki luerpidennykset luerkorkeilla ja kytke virta tyhjiöpumppuun. Tarkista tyhjiöpaineen tasaisuus pumpun käynnistyksen jälkeen (ja onko Vacuum Regulator -säätöasettelijän venttiili suljettu). Vaihda pumpun ja tyhjiöputkiston liitännät keskenään tarpeen vaatiessa. Jos tyhjiöpainetta ei edelleenkään saavuteta, korvaa tyhjiöpumppu tehokkaammalla.








Symbolit

Käyttöohjeessa tai pakkauksessa ja etiketeissä käytetään seuraavia symboleita:

Symboli	Symbolin määritelmä
 Σ <N>	Sisältää reagensseja, jotka riittävät <N> reaktioon
	Viimeinen käyttöpäivämäärä
	Tämä tuote täyttää in vitro -diagnostisia lääkinällisiä laitteita koskevan eurooppalaisen säännöksen 2017/746 vaatimukset.
	Diagnostinen in vitro lääketieteellinen laite
	Tuotenumero
	Eränumero
	Materiaalinumero (ts. komponentin merkintä)
	Komponentit
	Sisältö
	Numero
	GTIN-numero









Symboli

Symbolin määritelmä

Rn	R tarkoittaa käyttöohjeiden versiota ja n on versionumero
	Lämpötilarajoitus
	Valmistaja
	Katso käyttöohjeet
	Säilytettävä auringonvalolta suojattuna
	Varoitus/huomio
	Vastaanotettaessa
	Avattava vastaanotettaessa. Säilytettävä QIAamp Mini Spin column -pyörityskolonnissa 2–8 °C:ssa
	Määrä
	Lisätty
	Kirjoita päivämäärä etanolin lisäämisen jälkeen

Symboli

Symbolin määritelmä

	Etanoli
	Kirjoita päivämäärä isopropanolin lisäämisen jälkeen
	Isopropanoli
→	Seurauksena
	Guanidiinitiosyanaatti
	Guanidiinihydrokloridi
	BRIJ 58
	Proteinaasi K
	Yksilöllinen laitetunniste

Liite A: Suositus veriplasman erottamiselle ja säilyttämiseksi

Lisätietoja verinäyteputkien (esim. PAXgene ccfDNA Tube- tai Streck Cell-Free DNA Tube -putket) stabilisoinnista saat valmistajan ohjeista plasman erottamiseen ja säilyttämiseen liittyen. Suosittelemme näiden säilytysolosuhteiden validointia sen mukaan, millaisia myöhempiä käyttötarkoituksia ja kohteita sinulla on näytteille.

Stabiloimatonta BCT:tä varten suosittelemme seuraamaan ISO 20186-3:2019 -standardia, In vitro -diagnostiset molekyyliutkimukset – Laskimokokoveren tutkimusta edeltävien prosessien tekniset tiedot – Osa 3: Eristetty kiertävä soluton DNA plasmasta, tai CEN/TS 17742, In vitro -diagnostiset molekyyliutkimukset – laskimokokoveren tutkimusta edeltävien prosessien tekniset tiedot – Eristetty kiertävä soluton RNA plasmasta.

Jotta kiertävät ja soluttomat nukleiinihapot voidaan erottaa verinäytteistä, suosittelemme tämän protokollan seuraamista. Se sisältää korkean g-voiman sentrifugointivaiheen, jotta solujäänteet saadaan poistettua ja näin vähennettyä näytteen solujen mahdollisesti genomista DNA:ta ja RNA:ta.

1. Aseta kaikki EDTA Blood in BD Vacutainer® tubes -putket (tai muut pääverinäyteputket, joissa EDTA on antikoagulaattina) sentrifugiin, joka on viilennetty 4 °C lämpötilaan ja jossa on ulos kääntyvä roottori ja asianmukaiset kotelot.
2. Sentrifugoi verinäytteitä 10 minuutin ajan teholla 1900 x g (3000 rpm) 4 °C:ssa.
3. Aspiroi plasman supernatantti varovasti ilman että plasmasolujen pintakerros häiriintyy. Yhteen 10 ml:n pääverinäyteputkeen mahtuu noin 4–5 ml plasmata.

Huomautus: Plasmata voidaan käyttää kiertävien nukleiinihappojen eristämiseen tässä vaiheessa. Seuraava suurella nopeudella toimiva sentrifugi kuitenkin poistaa ylimääräisen solujäänteen ja kiertävien nukleiinihappojen kontaminaatit vaurioituneista nukleoituneista verisoluista johdetun genomisen DNA:n ja RNA:n avulla.

4. Aspiroitu plasma siirretään tuoreeseen sentrifugiputkeen.
5. Sentrifugoi plasmanäytteitä 10 minuutin ajan nopeudella 16 000 x g (kiinteäkulmaisessa roottorissa) 4 °C:n lämpötilassa.

Näin ylimääräiset ja solulliset nukleiinihapot, jotka ovat kiinni solujäänteissä, poistetaan.

6. Poista supernatantti varovasti ja siirrä se uuteen putkeen pellettiä häiritsemättä.
7. Jos plasmaa käytetään nukleiinihappojen erottamiseen samana päivänä, säilytä sitä 2–8 °C:n lämpötilassa seuraavaan käsittelyyn asti. Pidemmän säilytyksen aikana plasman alikvootit sekä stabiloimattomat verinäyteputket voidaan säilyttää –20 °C:n (kun kohteena on DNA) tai –80 °C:n lämpötilassa (kun kohteena on RNA) ainakin 4 viikon ajan. Ennen kuin käytät plasmaa kiertävien nukleiinihappojen erottamiseen, sulata plasmaputket huoneenlämmössä.
8. **Valinnainen:** Sentrifugoi plasmanäytteitä 5 minuutin ajan nopeudella 16 000 x g (kiinteäkulmaisessa roottorissa), jotta saat poistettua kryosaostumat.

Valinnainen: Siirrä supernatantti uuteen putkeen ja aloita kiertävien nukleiinihappojen erottamisen protokolla.

Liite B Yleisiä huomautuksia RNA:n käsittelystä

RNA:n käsitteleminen

Ribonukleasit (RNAasit) ovat erittäin vakaita ja aktiivisia entsyymejä, jotka eivät tavallisesti edellytä kofaktoreita toimiakseen. Koska RNAaseja on vaikea inaktivoida ja jopa pikkuruiset määrät riittävät tuhoamaan RNA:ta, mitään muovi- tai lasitarvikkeita ei saa käyttää poistamatta ensin mahdollista RNAasi-kontaminaatiota. On oltava erittäin varovainen, ettei RNAaseja viedä vahingossa RNA-näytteeseen puhdistustoimenpiteen aikana tai sen jälkeen. Jotta voidaan luoda ja ylläpitää RNAasitonta ympäristöä, esikäsittelyn aikana on ryhdyttävä seuraaviin varotoimiin ja käytettävä kertakäyttöisiä ja ei-kertakäyttöisiä astioita ja liuoksia RNA:n kanssa työskennellessä.

Yleinen käsittely

Asianmukaista mikrobiologista, aseptista tekniikkaa on aina käytettävä työskennellessä RNA:n kanssa. Käsissä ja pölyssä voi olla bakteereita ja homeita, ja ne ovat yleisiä RNAasi-kontaminaation lähteitä. Estä ihon pinnan tai pölyisten laboratoriovälineiden aiheuttamat RNAasi-kontaminaatiot käyttämällä aina lateksi- tai vinyylikäsitteitä, kun käsittelet reagensseja ja RNA-näytteitä. Vaihda käsineet usein ja pidä putket suljettuina aina kun mahdollista. Pidä puhdistettu RNA jäässä, kun alikvootteja pipetoidaan myöhempiä käyttötarkoituksia varten.

Kertakäyttöiset muoviosat

Steriilien, RNAasittomien ja kertakäyttöisten polypropeeniputkien käyttö on suositeltavaa koko toimenpiteen ajan.

Tilaustiedot

Tuote	Sisälö	Tuotenro
QIAamp DSP Circulating NA Kit (50)	50 preparaatiota varten: QIAamp Mini -putket, putkenpidentäjät, VacConnector-liitimet, QIAGEN Proteinase K, reagenssit, puskurit ja näytteenottoputket	61504
Lisävarusteet		
QIAvac 24 Plus vacuum manifold -tyhjiöputkisto*	Tyhjiöputkisto 1–24 pyörityskolonnin käsittelyyn: QIAvac 24 Plus Vacuum manifold -tyhjiöputkisto, luer-tulpat, pikaliitännät	19413
Vacuum Pump*	Yleinen tyhjiöpumppu	84010 [USA ja Kanada] 84000 [Japani] 84020 [muut maat]
QIAvac Connecting System*	Järjestelmä, jolla yhdistetään tyhjiöputkisto ja tyhjiöpumppu: sisältää tarjottimen, jätepullot, putket, liitännät, venttiilin, mittarin ja 24 VacValves-venttiiliä	19419

* Käytettäväksi tyhjiöprotokollien kanssa.

Voimassa olevat lisenssitiedot ja tuotekohtaiset vastuuvapauslausekkeet ovat saatavilla tuotekohtaisista QIAGEN-sarjojen käyttöoppaista tai käsikirjoista. QIAGEN-sarjojen käsikirjat ja käyttöoppaat ovat saatavilla osoitteesta www.qiagen.com, tai niitä voi tiedustella QIAGENin teknisestä palvelusta tai paikalliselta jälleenmyyjältä.

Asiakirjan muutoshistoria

Versio

Kuvaus

R1, heinäkuu 2022

IVDR Kit -sarjan version 2 julkaisu, ei muutoksia protokolliin tai suorituskykytietoihin verrattuna sarjan versioon 1; lisäys "manuaalisesta" eristämisestä käyttötarkoitukseen; pieniä päivityksiä ja korjauksia

Tämä sivu on jätetty tarkoituksella tyhjäksi.

Tämä sivu on jätetty tarkoituksella tyhjäksi.

Rajoitettu lisenssisopimus QIAamp DSP Circulating NA Kit -tarvikesarjasta

Tämän tuotteen käyttö tarkoittaa ostajan tai käyttäjän suostumusta noudattaa seuraavia ehtoja:

1. Tuotetta saa käyttää ainoastaan tuotteen mukana toimitettujen protokollien ja tämän käsikirjan mukaisesti sekä ainoastaan paneelin sisältämien osien kanssa. QIAGEN ei myönnä immateriaalimaisuutensa lisenssiä tarkoitukseen käyttää tai liittää tämän paneelin sisältämiä osia muiden osien kanssa, jotka eivät sisälly tähän paneeliin lukuun ottamatta osia, jotka kuvataan tuotteen mukana toimitetuissa protokollissa, tässä käsikirjassa ja muissa protokollissa, jotka ovat saatavana osoitteessa www.qiagen.com. Osa lisämateriaalista on QIAGEN-käyttäjien toisille QIAGEN-käyttäjille laatimaa. QIAGEN ei ole testannut tai tarkistanut kyseistä materiaalia. QIAGEN ei anna takuuta lisämateriaalille eikä takaa, ettei se loukkaa kolmansien osapuolten oikeuksia.
2. Muutoin kuin selvästi ilmoitettujen lisenssien osalta QIAGEN ei takaa, että tämä paneeli ja/tai sen käyttäjä(t) ei (eivät) loukkaa kolmansien osapuolten oikeuksia.
3. Tämä paneeli ja sen osat on lisensoitu kertakäyttöön, ja niiden uudelleenkäyttö, kunnostaminen tai edelleenmyynti ovat kiellettyjä.
4. QIAGEN kiistää nimenomaisesti kaikki käyttöoikeudet, suorat tai epäsuorat, joita ei ole tässä nimenomaisesti ilmoitettu.
5. Paneelin ostaja tai käyttäjä suostuu siihen, ettei hän suorita tai anna muiden suorittaa toimenpiteitä, jotka voisivat johtaa edellä mainittuihin kiellettyihin tapahtumiin tai edesauttaa niiden syntymistä. QIAGEN saattaa vedota tämän rajoitetun lisenssisopimuksen kieltoihin tuomioistuimessa. QIAGEN perii kaikki tutkinta- ja oikeuskulut asianajajan palkkiot mukaan lukien, jotka aiheutuvat tämän rajoitetun lisenssisopimuksen tai sen henkistä omaisuutta koskevien oikeuksien toimeenpanemisesta paneeliin ja/tai sen osien osalta.

Katso päivitetyt käyttöoikeusehdot osoitteesta www.qiagen.com.

Tavaramerkit: QIAGEN[®], Sample to Insight[®], QIAamp[®], (QIAGEN Group); Agilent[®] (Agilent Technologies, Inc.); BD[™], Vacutainer[®] (Becton Dickinson and Company); PAXgene[®] (PreAnalytiX GmbH); Tween[™] (ICI Americas Inc.). Tässä asiakirjassa mainittuja rekisteröityjä nimiä, tavaramerkkejä jne. on pidettävä lain suojaamina, vaikkei niitä olisi erityisesti sellaisiksi merkitty.

Jun-2022 HB-3049-001 1 127632 © 2022 QIAGEN, kaikki oikeudet pidätetään.

