

# Návod k použití sady QIAamp<sup>®</sup> DSP Virus Spin Kit (příručka)



Verze 2



Pro diagnostické použití in vitro

Pro použití se sadou QIAamp<sup>®</sup> DSP Virus Spin Kit



61704



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Německo



1127542CS

# Obsah

Účel použití.....	4
Určený uživatel.....	4
Popis a principy .....	5
Lýza proteázou QIAGEN Protease (QP).....	5
Adsorpce na membránu QIAamp MinElute .....	5
Odstranění reziduálních kontaminantů.....	6
Eluce virových nukleových kyselin .....	6
Výtěžek a kvalita virových nukleových kyselin .....	7
Přídavek interních kontrol .....	8
Automatizovaná purifikace virové nukleové kyseliny na přístroji QIAcube Connect MDx.....	8
Shrnutí a vysvětlení.....	11
Dodávané materiály .....	12
Obsah sady.....	12
Součásti sady.....	13
Potřebné materiály, které nejsou součástí dodávky .....	14
Další reagensie .....	14
Spotřební materiály .....	14
Vybavení .....	14
Pouze pro automatizovaný postup .....	14
Varování a bezpečnostní opatření.....	16
Informace o bezpečnosti .....	16

Nouzová linka.....	17
Bezpečnostní opatření .....	18
Likvidace .....	19
Skladování reagensů a manipulace s nimi .....	20
Stabilita při používání.....	20
Odběr, skladování a nakládání se vzorky.....	22
Důležité poznámky .....	24
Důležité body před zahájením používání .....	24
Manipulace s kolonkami QIAamp MinElute .....	25
Centrifugace.....	25
Zpracování kolonek QIAamp MinElute v mikrocentrifuze.....	25
Příprava reagensů a pufrů.....	26
Protokol: Purifikace virových nukleových kyselin z plazmy nebo séra pomocí mikrocentrifugy nebo přístroje QIAcube Connect MDx.....	31
Kontrola kvality .....	35
Omezení.....	36
Charakteristika funkčních vlastností .....	37
Řešení potíží .....	38
Symboly.....	42
Příloha.....	45
Informace o způsobu objednávání .....	46
Historie revizí dokumentu .....	48

## Účel použití

Sada QIAamp® DSP Virus Spin Kit je určena k manuální nebo, při použití ve spojení s přístrojem QIAcube® Connect MDx, k automatizované izolaci a purifikaci virových nukleových kyselin ze vzorků lidské plazmy a séra.

Sada QIAamp DSP Virus Spin Kit využívá technologii silikátové membrány (technologie QIAamp) k izolaci a purifikaci virových nukleových kyselin ze vzorků lidské plazmy a séra.

Tento produkt je určen pro diagnostické použití in vitro a pro použití profesionálními uživateli, např. techniky a lékaři vyškolenými v technikách molekulární biologie.

## Určený uživatel

Produkt je určen pro použití profesionálními uživateli, např. techniky a lékaři školenými v technikách molekulární biologie.

## Popis a principy

Postup QIAamp DSP Virus Spin obsahuje 4 kroky (lýza, vázání, promývání, eluce) a provádí se pomocí kolon QIAamp MinElute® na standardní mikrocentrifuze nebo automaticky na přístroji QIAcube Connect MDx. Postup je navržen k minimalizaci potenciální zkřížené kontaminace mezi alikvoty a tak, aby umožnil bezpečné zacházení s potenciálně infekčními alikvoty. Jednoduchý postup QIAamp DSP Virus Spin je vhodný pro simultánní zpracování několika vzorků. Sadu QIAamp DSP Virus Spin Kit lze použít pro izolaci virové RNA a DNA z široké řady RNA a DNA virů. Charakteristiky funkčních vlastností pro jednotlivé druhy virů nebyly stanoveny, uživatel je musí validovat sám.

### Lýza proteázou QIAGEN Protease (QP)

Alikvoty jsou lyzovány za vysoce denaturačních podmínek při zvýšených teplotách. Lýza se provádí za přítomnosti proteázy QIAGEN Protease (QP) a lyzačního pufru (AL), které společně zajišťují inaktivaci RNázy.

### Adsorpce na membránu QIAamp MinElute

Pro optimalizaci vázání virové DNA a RNA k membráně se nejprve podmínky vázání upraví přidáním etanolu. Lyzáty se poté nanesou na kolonku QIAamp MinElute a virové nukleové kyseliny se adsorbují na silikagelovou membránu při průchodu lyzátu indukovaném centrifugací. Koncentrace soli a hodnoty pH zajistí, že protein a další kontaminanty, které mohou inhibovat PCR a ostatní enzymatické reakce v dalších stupních, nebudou vázány na membránu QIAamp MinElute.

Během kroků vkládání a promývání je kolonka QIAamp MinElute doplněna o 2ml promývací zkumavky (součást dodávky).

## Odstranění reziduálních kontaminantů

Zatímco nukleové kyseliny zůstávají vázány na membránu, kontaminanty se účinně vymyjí během 3 promývacích kroků.

## Eluce virových nukleových kyselin

V jediném kroku se vysoce čisté virové RNA a DNA eluují z membrány kolonky QIAamp MinElute v elučním pufru (AVE), který je vytemperován na teplotu místnosti. Kolonky QIAamp MinElute umožňují minimální eluční objemy pouze 20 µl při manuálním postupu a 60 µl při automatizovaném postupu. Nízký eluční objem poskytuje vysoce koncentrované eluáty nukleových kyselin.

Pro aplikace v dalších stupních, které vyžadují malé počáteční objemy (např. některé analýzy PCR a RT-PCR), může koncentrovaný eluát zvyšovat citlivost analýzy.

Pro následné aplikace, které vyžadují větší počáteční objem, lze eluční objem zvýšit až na 150 µl při manuálním postupu a až na 100 µl při automatickém postupu. Zvýšení elučního objemu ovšem sníží koncentraci nukleových kyselin v eluátu.

Vzhledem ke zbývajícimu elučnímu pufru zadrženému membránou centrifugační kolonky po odstředění může být objem získaného eluátu nižší než objem elučního pufru naneseného na kolonku. Objem získaného eluátu navíc závisí na povaze alikvoty.

Eluované nukleové kyseliny se shromažďují v 1,5ml elučních zkumavkách (ET), které jsou součástí dodávky a lze je skladovat při teplotě 2–8 °C po dobu až 24 hodin. Pro dlouhodobé skladování nad 24 hodin doporučujeme skladovat purifikované nukleové kyseliny při teplotě –20 °C.

**Poznámka:** Stabilita eluátů je značně závislá na různých faktorech a souvisí s konkrétní následnou aplikací. Byla vyhodnocena pro sadu QIAamp DSP Virus Spin Kit ve spojení s modelovými následnými aplikacemi. Je na odpovědnosti uživatele, aby se seznámil s návodem k použití konkrétní následné aplikace používané v jeho laboratoři a/nebo aby si ověřil celý pracovní postup za účelem stanovení vhodných podmínek skladování.

## Výtěžek a kvalita virových nukleových kyselin

Výnosy virové nukleové kyseliny izolované z biologických alikvotů jsou normálně nižší než 1 µg. Ke stanovení výtěžků se doporučují metody kvantitativní amplifikace. Při kvantifikaci nukleových kyselin izolovaných při použití protokolu QIAamp DSP Virus Spin nezapomeňte, že ve vzorku bude významně více nosiče RNA než virové RNA.

Nosič RNA slouží ke dvěma účelům: Zaprvé, podporuje vázání virových nukleových kyseliny na membránu QIAamp, zvláště pokud je v alikvotu velmi málo cílových molekul. Zadruhé, přídavek velkého množství nosiče RNA snižuje možnost degradace virové RNA ve vzácném případě, kdy molekuly RNázy uniknou denuraci chaotropními solemi a detergentem v lyzačním pufru (AL). Pokud se nosič RNA do lyzačního pufru (AL) nepřidá, může to vést ke snížení výtěžku virové RNA nebo DNA.

Nosič RNA může být také zahrnut do některých interních kontrolních činidel komerčních následných analýz. V těchto případech se podívejte na příslušné návody k použití od výrobce navazující analýzy.

Různé amplifikační systémy mají proměnlivou účinnost v závislosti na celkovém množství nukleových kyselin přítomných v reakci. Eluáty z této sady obsahují jak virové nukleové kyseliny, tak nosič RNA s tím, že množství nosiče RNA vysoce překračuje množství virových nukleových kyselin. Výpočty množství eluátu, který se má přidat k následným amplifikacím, by proto měly brát v úvahu množství přidaného nosiče RNA. K dosažení nejvyšších hladin senzitivity při amplifikačních reakcích možná bude nezbytné upravit množství nosiče RNA přidaného do lyzačního pufru (AL).

## Přídavek interních kontrol

Použití protokolu QIAamp DSP Virus Spin v kombinaci s komerčně dostupnými amplifikačními systémy může vyžadovat zavedení interní kontroly do postupu purifikace. Interní kontrolní RNA nebo DNA by se měly přidávat do lyzačního pufru společně s nosičem RNA. Pro optimální účinnost purifikace by molekuly interní kontroly měly být delší než 200 nukleotidů, protože menší molekuly se efektivně neregenerují.

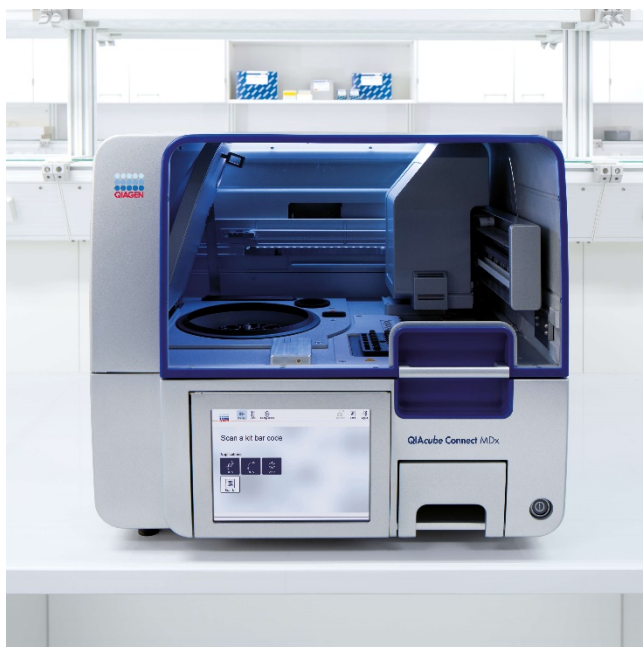
Viz pokyny výrobce s cílem stanovit optimální koncentraci. Použití jiné koncentrace než doporučené může snižovat účinnost amplifikace.

## Automatizovaná purifikace virové nukleové kyseliny na přístroji QIAcube Connect MDx

Přístroj QIAcube Connect MDx provádí automatizovanou izolaci a purifikaci nukleových kyselin. Přístroj může zpracovat až 12 alikvotů v jednom cyklu.

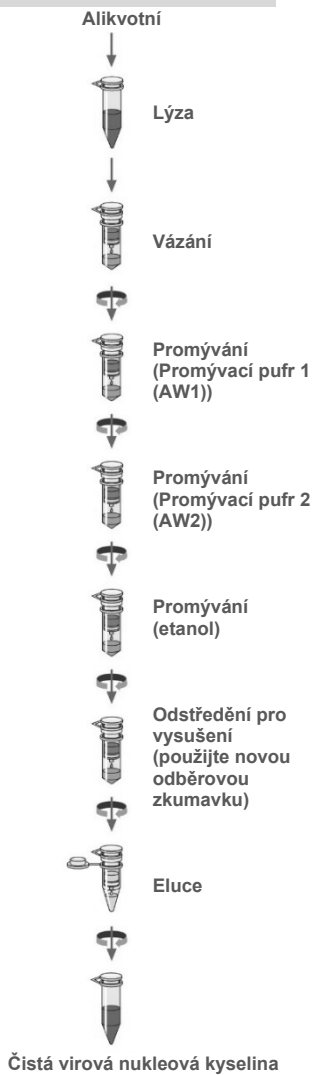
Při automatizovaném zpracování sady QIAamp DSP Virus Spin Kit na přístroji QIAcube Connect MDx může přístroj zpracovat méně než 50 alikvotů, a to z důvodu mrtvých objemů, odpařování a další spotřeby reagentů automatizovaným pipetováním. Při manuálním použití sady QIAamp DSP Virus Spin Kit společnost QIAGEN garantuje pouze 50 stanovení alikvotů.





Obrázek 1. QIAcube Connect MDx.

## Postup QIAamp DSP Virus Spin



Automatizovatelné na přístroji QIAcube Connect MDx

## Shrnutí a vysvětlení

Sada QIAamp DSP Virus Spin Kit využívá dobře známou technologii simultánní purifikace virové DNA a RNA. Sada kombinuje selektivní vazebné vlastnosti membrány založené na oxidu křemičitém s flexibilními elučními objemy v rozmezí 20 až 150 µl v manuálním pracovním postupu.

Tento postup je vhodný k použití s plazmou a sérem. Buď mohou obsahovat citrát, nebo EDTA. Vzorky mohou být buď čerstvé nebo zmražené s tím, že nebyly zmrazeny a neroztály více než jedenkrát.

Postup lze použít pro izolaci virové RNA a DNA ze široké řady RNA a DNA virů. Jednoduché postupy QIAamp DSP s centrifugací jsou vhodné pro simultánní zpracování několika alikvotů. Postup lze plně automatizovat na přístroji QIAcube Connect MDx (strana 9) pro větší standardizaci a snadnější použití s elučními objemy 60–100 µl s přírůstkem 5 µl. Postup je navržen tak, aby se zabránilo křížové kontaminaci mezi alikvoty a umožnilo se bezpečné zacházení s potenciálně infekčními alikvoty. Virové nukleové kyseliny se eluují v elučním pufru (AVE) a jsou připraveny k použití v amplifikačních reakcích (PCR) nebo pro skladování pro pozdější použití při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

# Dodávané materiály

## Obsah sady


### QIAamp DSP Virus Spin Kit

Katalogové č.

61704

Počet stanovení

50<sup>§</sup>

QIAamp MinElute	QIAamp MinElute columns with Wash Tube (WT)s (Kolonky QIAamp MinElute s promývacími zkumavkami Wash tube) (2 ml)	<b>COL</b>	50
LT	Lysis Tubes (Lyzační zkumavky) (2 ml)	<b>LYS TUBE</b>	50
ET	Elution Tubes (Eluční zkumavky) (1,5 ml)	<b>ELU TUBE</b>	50
WT	Wash tube (WT)s (Promývací zkumavky WT) (2 ml)	<b>WASH TUBE</b>	5 × 50
AL	Lysis Buffer (Lyzační pufr)*	<b>LYS BUF</b>	33 ml
AW1	Wash Buffer 1 (Promývací pufr 1) (AW1)* (koncentrát)	<b>WASH BUF 1 CONC</b>	19 ml
AW2	Wash Buffer 2 (Promývací pufr 2) (AW2) <sup>†</sup> (koncentrát)	<b>WASH BUF 2 CONC</b>	13 ml
AVE	Elution Buffer (Eluční pufr) <sup>‡</sup> (fialové krytky)	<b>ELU BUF</b>	4 × 2 ml
PS	Protease Solvent <sup>†</sup> (Rozpuštědlo proteázy)	<b>QPROT SOLV</b>	4,4 ml
Carrier	Carrier RNA (Nosič RNA) (červené krytky)	<b>CAR RNA</b>	310 µg
QP	QIAGEN Protease (QP) <sup>‡</sup> (Proteáza QIAGEN)	<b>QPROT</b>	1 lahvička
–	Návod k použití (příručka)		1

\* Obsahuje chaotropní sůl. Při práci používejte odpovídající bezpečnostní opatření a noste rukavice. Není kompatibilní s dezinfekčními přípravky obsahujícími bělicí prostředky. Další informace viz str. 16.

<sup>†</sup> Obsahuje azid sodný jako konzervační látku.

<sup>‡</sup> Viz „Příprava reagensí a pufrů“, strana 26.

<sup>§</sup> Při automatizované zpracování sady QIAamp DSP Virus Spin Kit na přístroji QIAcube Connect MDx může přístroj zpracovat méně než 50 alikvotů, a to z důvodu mrtvých objemů, odpařování a další spotřeby reagensí automatizovaným pipetováním. Při manuálním použití sady QIAamp DSP Virus Spin Kit společnost QIAGEN garantuje pouze 50 stanovení alikvotů.

## Součásti sady

Hlavní součásti sady obsahující účinné přísady jsou vysvětleny níže.

Reagencie	Účinné přísady	Koncentrace (w/w) [%]
QIAGEN Protease (QP) (Proteáza QIAGEN)	Subtilisin	≥ 90 až ≤ 100
AL	Guanidinhydrochlorid Kyselina maleinová	≥ 30 až < 50 ≥ 0,1 až < 1
AW1	Guanidinhydrochlorid	≥ 50 až < 70

# Potřebné materiály, které nejsou součástí dodávky

## Další reagensie

- Etanol (96–100%)\*

## Spotřební materiály

- Pipety† a pipetovací špičky (pro zamezení zkřížené kontaminace důrazně doporučujeme používat pipetovací špičky s aerosolovými bariérami)
- Jednorázové rukavice

## Vybavení

- Topný blok† pro lýzu alikvotů při teplotě 56 °C
- Mikrocentrifuga† (s rotorem pro zkumavky 1,5 ml a 2 ml)
- Odměrný válec (50 ml)
- Třepačka vortex
- Pro alikvoty < 200 µl: 0,9% roztok NaCl

## Pouze pro automatizovaný postup

- QIAcube Connect MDx† (kat. č. 9003070)
- Rotor Adapters (kat. č. 990394)
- Rotor Adapter Holder (kat. č. 990392)
- Sample Tubes CB (2 ml; kat. č. 990382, vstupní zkumavka na alikvot)
- Shaker Rack Plugs (kat. č. 9017854)
- Reagent Bottles, 30 ml (kat. č. 990393)

\* Nepoužívejte denaturovaný alkohol, který obsahuje další látky, jako například metanol nebo metyletylketon.

† Před použitím zajistěte, aby byly přístroje zkontrolovány a nakalibrovány podle doporučení výrobce.

- Filter-Tips, 1000 µl (kat. č. 990352)
- Filter-Tips, 1000 µl, wide-bore (kat. č. 990452)
- Filter-Tips, 200 µl (kat. č. 990332)
- SafeSeal Tube, 1,5 ml, Sarstedt®; kat. č. 72.706

# Varování a bezpečnostní opatření

Vezměte prosím na vědomí, že podle místních předpisů od vás může být vyžadováno nahlášení závažných událostí, ke kterým došlo v souvislosti se zařízením, a to výrobci a/nebo jeho autorizovanému zástupci a regulačnímu orgánu, pod nějž uživatel a/nebo pacient spadá.

Pro diagnostické použití in vitro

Před použitím sady si pečlivě přečtěte všechny pokyny.

## Informace o bezpečnosti

Při manipulaci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní pracovní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Bližší informace jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech (BL). Bezpečnostní listy jsou k dispozici také online v PDF formátu na stránkách [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), kde můžete najít, přečíst a vytisknout bezpečnostní listy všech sad a součástí sad QIAGEN.



**UPOZORNĚNÍ:** NEPŘIDÁVEJTE roztoky bělicích prostředků nebo kyselin přímo do odpadních materiálů z přípravy vzorků.

- Lyzační pufr (AL) a promývací pufr 1 (AW1) obsahují guanidinydrochlorid, který může v kombinaci s bělicími prostředky vytvářet vysoce reaktivní látky. V případě rozlití tekutin obsahujících tyto pufrы vyčistěte kontaminované místo vhodným laboratorním detergentem a vodou. Pokud rozlitá tekutina obsahuje potenciálně infekční látky, vyčistěte zasaženou oblast nejprve laboratorním detergentem a vodou a poté 1 % (obj.) roztokem chlornanu sodného.



- Jestliže jsou lahve s pufrem poškozeny nebo prosakují, použijte při likvidaci těchto lahví rukavice a ochranné brýle, abyste zabránili poškození vlastního zdraví nebo zdraví jiných osob.
- Společnost QIAGEN netestovala kapalný odpad vzniklý postupy QIAamp DSP Virus Spin z hlediska zbytkových infekčních materiálů. Kontaminace odpadní tekutiny reziduálními infekčními materiály je vysoce nepravděpodobná, nelze ji však zcela vyloučit. Tekutý odpad je proto nutné považovat za infekční a je nutné s ním zacházet a likvidovat jej v souladu s místními bezpečnostními předpisy.
- Vzorky a alikvoty jsou potenciálně infekční. Vzorky a odpad z analýzy zlikvidujte v souladu s místními bezpečnostními předpisy.

## Nouzová linka

CHEMTREC

USA a Kanada 1-800-424-9300

Země mimo USA a Kanadu +1 703-527-3887

## Bezpečnostní opatření

Pro jednotlivé komponenty sady QIAamp DSP Virus Spin Kit platí následující pokyny týkající se rizika a bezpečnostních opatření:

### Lysis Buffer (AL)



Obsahuje: guanidinydrochlorid; kyselinu maleinovou. Varování! Může být škodlivý při požití nebo při vdechnutí. Způsobuje podráždění kůže. Může vyvolat alergickou kožní reakci. Způsobuje vážné podráždění očí. Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranné brýle / obličejový štít. Necítíte-li se dobře, volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO/lékaře. Při podráždění kůže nebo vyrážce: Vyhledejte lékařskou pomoc. Kontaminovaný oděv svlékněte a před opětovným použitím vyperte. Odstraňte obsah/obal ve schváleném zařízení na likvidaci odpadu.

### Wash Buffer 1 (AW1)



Obsahuje: guanidinydrochlorid. Varování! Škodlivý při požití nebo při vdechnutí. Způsobuje podráždění kůže. Způsobuje vážné podráždění očí. Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranné brýle / obličejový štít. Kontaminovaný oděv svlékněte a před opětovným použitím vyperte. Odstraňte obsah/obal ve schváleném zařízení na likvidaci odpadu.

### QIAGEN Protease (QP)



Obsahuje: subtilisin. Nebezpečí! Zdraví škodlivý při požití. Způsobuje podráždění kůže. Způsobuje vážné poškození očí. Při vdechnutí může vyvolat příznaky alergie nebo astmatu, případně dechové obtíže. Může způsobit podráždění dýchacích cest. Vyvarujte se vdechování prachu/dýmu/plynu/mlhy/výparů/aerosolů. Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranné brýle / obličejový štít. Používejte ochranný respirátor. PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Opatrně oplachujte vodou po dobu několika minut. Pokud zasažená osoba používá kontaktní čočky, vyjměte je (pokud je to možné). Pokračujte v oplachování. POKUD dojde k zasažení nebo důvodné obavě, že došlo k zasažení: Ihned kontaktujte TOXIKOLOGICKÉ CENTRUM nebo lékaře. Přeneste osobu na čerstvý vzduch a ponechte ji v poloze usnadňující dýchání.

## Likvidace

Odpad obsahuje alikvoty a reagenty. Tento odpad může obsahovat toxické nebo infekční materiály a musí být řádně zlikvidován. Postupujte při likvidačních procedurách v souladu s místními bezpečnostními předpisy.

Bližší informace jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech (BL). Bezpečnostní listy jsou k dispozici online ve formátu PDF na stránkách [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), kde si uživatelé mohou vyhledat, zobrazit a vytisknout bezpečnostní listy pro každou sadu QIAGEN a pro každou součást příslušné sady.

# Skladování reagensů a manipulace s nimi

Je třeba věnovat odpovídající pozornost datům expirace a podmínkám skladování vytištěným na obalu a štítcích všech součástí. Nepoužívejte součásti s prošlým datem expirace ani nesprávně skladované součásti.

Kolonky QIAamp MinElute je po doručení zapotřebí skladovat při teplotě 2–8 °C. Při správném uchování jsou kolonky QIAamp MinElute stabilní až do konce doby použitelnosti uvedené na krabici sady.

**Poznámka:** Aby nedošlo ke smíchání součástí sady z různých sad, označte kolonky QIAamp MinElute příslušným číslem šarže sady.

Všechny pufrы se mohou uchovávat při laboratorní teplotě (15–25 °C) až do doby expirace uvedené na krabici sady.

Lyofilizovaný nosič RNA lze uložit při pokojové teplotě až do konce doby expirace uvedené na krabici sady.

Lyofilizovanou proteázu QIAGEN Protease (QP) lze uchovávat při pokojové teplotě až do doby expirace, aniž by to ovlivnilo účinnost.

## Stabilita při používání

Nosič RNA se může rozpouštět pouze v elučním pufru (AVE). U manuálního postupu se rozpouštěný nosič RNA musí okamžitě přidat do lyzačního pufru (AL), jak je popsáno pouze na straně 27. Tento roztok by se měl připravit čerstvý a je stabilní při teplotě 2–8 °C až po dobu 48 hodin. Nepoužité podíly nosiče RNA rozpouštěné v elučním pufru (AVE) je zapotřebí zmrazit v alikvotních podílech při teplotě –20 °C.

Proteáza QIAGEN Protease (QP) rekonstituovaná v rozpouštědle proteázy (PS) je stabilní až jeden rok, pokud se uchovává při teplotě 2–8 °C, ale pouze do vypršení doby expirace sady. Udržování zásobního roztoku proteázy QIAGEN Protease (QP) při pokojové teplotě po dlouhou dobu není vhodné.

Rekonstituovaný promývací pufr 1 (AW1) a rekonstituovaný promývací pufr 2 (AW2) jsou stabilní po dobu 1 roku, pokud jsou uchovávány při pokojové teplotě, ale pouze do doby expirace uvedené na krabici sady. Při přípravě pufrů pro automatizovaný postup postupujte podle pokynů v *uživatelské příručce QIAcube Connect MDx*.

## Odběr, skladování a nakládání se vzorky

**Poznámka:** Stabilita alikvoty je značně závislá na různých faktorech a souvisí s konkrétní následnou aplikací. Byla vyhodnocena ve spojení s modelovými následnými aplikacemi. Je na odpovědnosti uživatele, aby se seznámil s návodem k použití konkrétní následné aplikace používané v jeho laboratoři a/nebo aby si ověřil celý pracovní postup za účelem stanovení vhodných podmínek skladování.

Obecná doporučení pro odběr, transport a skladování jsou uvedena ve schváleném pokynu CLSI MM13-A „Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods“ (Odběr, transport, příprava a skladování vzorků pro molekulární metody). Dále je třeba při přípravě, skladování, přepravě a obecné manipulaci s alikvoty dodržovat pokyny výrobce vybraného prostředku pro odběr vzorků.

Postup purifikace je optimalizován pro použití se vzorky lidské plazmy a séra. K přípravě plazmy lze použít alikvoty krve upravené EDTA nebo citrátem jako antikoagulantem. Vzorky mohou být buď čerstvé nebo zmrazené s tím, že nebyly zmrazeny a neroztály více než jedenkrát. Rozmrazte zmrazené alikvoty pomocí jemného třepání, aby se zajistilo důkladné promíchání.

Po odběru a centrifugaci mohou být plazma nebo sérum uchovávány při teplotě 2–8 °C až po dobu 6 hodin. Pro dlouhodobé uchovávání se doporučuje zmrazení při –20 °C až –80 °C v alikvotních množstvích. Zmrazené vzorky plazmy nebo séra nesmí roztát více než jednou. Opakované zmrazování a roztátí vede k denaturaci a precipitaci proteinů, což má za následek snížené virové titry, a proto dává snížené výtěžky virových nukleových kyselin. Kromě toho kryoprecipitáty vzniklé během cyklu zmrazení–roztuštění budou ucpávat membránu QIAamp MinElute. Pokud budou kryoprecipitáty viditelné, mohou být peletovány při centrifugaci přibližně 6 800 × *g* po dobu 3 minut. Vyčištěný supernatant je zapotřebí odstranit a zpracovat okamžitě bez narušení pelety. Ihned zahajte purifikační postup. Odstředováním při nízkých silách *g* nedochází ke snížení virových titrů.

**Poznámka:** Podle modelových interferenčních studií pro sadu QIAamp DSP Virus Spin Kit a v souladu s normou ISO 20186-2:2019(E) může heparin ze zkumavek pro odběr krve ovlivnit čistotu izolovaných nukleových kyselin a případný přenos do eluátů může způsobit inhibici v některých následných aplikacích. Proto doporučujeme používat alikvoty krve ošetřené antikoagulantem EDTA nebo citrátem.

# Důležité poznámky

## Důležité body před zahájením používání

- Po obdržení sady zkontrolujte, zda nejsou její komponenty poškozeny. V případě poškození blistrových obalů nebo láhví s pufrem kontaktujte oddělení technických služeb QIAGEN nebo místního distributora. V případě rozlití tekutiny postupujte podle pokynů uvedených v části „Varování a bezpečnostní opatření“ (str. 16). Nepoužívejte poškozené komponenty sady, protože použití poškozených komponent by mohlo negativně ovlivnit účinnost sady.
- Vždy používejte zařízení bez RNázy.
- Před každým přenosem kapalných materiálů vždy vyměňte pipetovací špičky. Pro minimalizaci zkřížené kontaminace doporučujeme používat pipetovací špičky s aerosolovou bariérou.
- Používejte vždy rukavice na jedno použití a pravidelně kontrolujte, zda nedošlo k jejich kontaminaci testovaným alikvotem. Pokud dojde ke kontaminaci rukavic, vyhoďte rukavice do odpadu.
- Pro minimalizaci zkřížené kontaminace neotevírejte více zkumavek současně.
- Po všech krocích pulzního protřepávání ve vortexu mikrocentrifugační zkumavky krátce odstředte, aby se odstranily kapky z vnitřní strany víčka.
- Všechny kroky centrifugace se provádějí při pokojové teplotě (15–25 °C).
- Uživatel by měl zajistit, aby byla během celého postupu zachována sledovatelnost alikvotů.
- Při práci se sadou nepoužívejte součásti jiných sad, pokud nemají stejné číslo šarže.
- Zamezte mikrobiální kontaminaci reagentů sady.
- Pro zajištění ochrany před potenciálně infekčními materiály doporučujeme pracovat za podmínek laminárního proudění až do lýzy vzorků.
- Při automatizaci postupujte podle pokynů v uživatelském rozhraní (QIAcube Connect MDx) a nahlédněte do příslušné uživatelské příručky (pro QIAcube Connect MDx).
- Tuto sadu smí používat pouze personál školený v laboratorních metodách in-vitro.



## Manipulace s kolonkami QIAamp MinElute

Kvůli senzitivitě amplifikačních technologií nukleových kyselin jsou následující bezpečnostní opatření nezbytná při manipulaci s kolonkami QIAamp MinElute, aby nedošlo ke zkřížené kontaminaci během příprav vzorků:

- Vzorek nebo roztok vkládejte do kolonky QIAamp MinElute opatrně. Odpipetujte vzorek do kolonky QIAamp MinElute, aniž byste navlhčili okraj kolonky.
- Před každým přenosem kapalných materiálů vždy vyměňte pipetovací špičky. Doporučujeme používat pipetovací špičky s aerosolovou bariérou.
- Nedotýkejte se pipetovací špičkou membrány QIAamp MinElute.
- Otevírejte kolonky QIAamp MinElute jednu podruhé a dbejte na to, aby nevznikaly aerosoly.

## Centrifugace

- Společně se sadou se dodávají promývací zkumavky (WT) a eluční zkumavky pro všechny centrifugační kroky.
- Centrifugace kolonek QIAamp MinElute se provádí přibližně při  $6\ 000 \times g$ , aby se snížil hluk odstředivky. Odstředování kolonek QIAamp MinElute při plných otáčkách neovlivní výtěžek DNA nebo RNA.
- Při suchém odstředování na konci promývacího procesu a pro eluci by se centrifugace měla provádět při plných otáčkách.
- Veškeré centrifugační kroky je nutno provádět při pokojové teplotě (15–25 °C).

## Zpracování kolonek QIAamp MinElute v mikrocentrifuze

- Kolonku QIAamp MinElute před jejím vložením do mikrocentrifugy uzavřete. Odstředujte popsáním způsobem.
- Vyjměte kolonku QIAamp MinElute a promývací zkumavku z mikrocentrifugy.

- Vložte kolonku QIAamp MinElute do nové promývací zkumavky. Zlikvidujte filtrát a promývací zkumavku (WT). Nezapomeňte, že filtrát může obsahovat nebezpečný odpad a že je zapotřebí jej odpovídajícím způsobem zlikvidovat.
- Otevírejte kolonky QIAamp MinElute jednu podruhé a dbejte na to, aby nevznikaly aerosoly.

Pro efektivní paralelní zpracování více aliokvotů doporučujeme naplnit držák na zkumavky promývacími zkumavkami, aby bylo možné kolonky QIAamp MinElute po centrifugaci přenést. Použité promývací zkumavky obsahující filtrát lze zlikvidovat a nové promývací zkumavky obsahující kolonky QIAamp MinElute lze umístit přímo do mikrocentrifugy.

## Příprava reagensů a pufrů

### Příprava RNA

Když připravujete virovou RNA, pracujte během manuálních kroků postupu rychle a před zahájením si přečtěte Příloha na straně 45.

### Příprava proteázy QIAGEN Protease (QP)

Přidejte celý obsah lahvičky obsahující 4,4 ml rozpouštědla proteázy do lahvičky s lyofilizovanou proteázou QIAGEN Protease (QP) a pečlivě promíchejte. Aby obsah nezpěnil, míchání proveďte několikanásobným obrácením lahvičky. Ujistěte se, že je proteáza QIAGEN Protease (QP) zcela rozpuštěná.



Nepřidávejte proteázu QIAGEN Protease (QP) přímo do lyzačního pufru (AL).\*

\* Obsahuje chaotropní sůl. Při práci přijměte odpovídající laboratorní bezpečnostní opatření a během manipulace noste rukavice. Není kompatibilní s dezinfekčními přípravky obsahujícími bělicí prostředky. Viz informace o bezpečnosti na straně 16.

## Přidání nosiče RNA a interní kontroly do lyzačního pufru (AL)\* (pouze pro manuální postup)

Interní kontrola se velmi doporučuje v případě, že se sada QIAamp DSP Virus Spin Kit používá v kombinaci s diagnostickými amplifikačními systémy. Pro další informace viz pokyny od výrobce. Interní kontrolu a rekonstituovaný nosič RNA je potřeba přidat do lyzačního pufru (AL) a jemně promíchat převrácením zkumavky 10krát. Aby nedošlo k tvorbě pěny, nemíchejte ve vortexu. Pokud se používá interní kontrola, snižte odpovídajícím způsobem objem lyzačního pufru (AL) (další podrobnosti viz tabulka 1).

Viz pokyny výrobce pro stanovení optimální koncentrace interní kontroly. Použití jiné než doporučené koncentrace může vést k chybným výsledkům. Při vypočítávání správného množství interní kontroly, která bude použita, vezměte v úvahu počáteční objem vzorku a eluční objem. Pamatujte, že sada QIAamp DSP Virus Spin Kit používá počáteční objem alikvotu 200  $\mu$ l.

Pro přípravu roztoku nosiče RNA přidejte 310  $\mu$ l elučního pufru (AVE) do zkumavky obsahující 310  $\mu$ g lyofilizovaného nosiče RNA, abyste získali roztok 1  $\mu$ g/ $\mu$ l. Nosič RNA důkladně rozpustíte, rozdělte jej na alikvotní podíly vhodné velikosti a uchovávejte při teplotě  $-20$  °C. Alikvotní množství nosiče RNA nezmrazujte/nerozmrazujte více než 3krát.



Nosič RNA se v lyzačním pufru (AL) nerozpouští. Musí se nejprve rozpustit v elučním pufru (AVE) a poté přidat do lyzačního pufru (AL). Zajistěte, aby se nosič RNA před smícháním s lyzačním pufrém (AL) zcela rozpustil ve správném objemu elučního pufru (AVE).

Vypočítejte objem směsi lyzační pufr (AL) – nosič RNA potřebný na šarži vzorků podle volby počtu alikvotů, které budou zpracovávány současně, z tabulky 1, strana 29. Pro větší počty alikvotů lze objemy vypočítat pomocí vzorového výpočtu uvedeného níže:

$$n \times 0,22 \text{ ml} = y \text{ ml}$$

$$y \text{ ml} \times 28 \text{ } \mu\text{l/ml} = z \text{ } \mu\text{l}$$

kde:  $n$  = počet vzorků, které mají být zpracovány současně

$y$  = vypočítaný objem lyzačního pufru (AL)

$z$  = objem směsi nosič RNA – eluční pufr (AVE), který má být přidán do lyzačního pufru (AL)

Jemně promíchejte 10× otočením zkumavky dnem vzhůru. Aby nedošlo k tvorbě pěny, nemíchejte ve vortexu.

**Tabulka 1. Objemy (obj.) lyzačního pufru (AL) a směsi nosiče RNA – elučňí pufr (AVE) požadované pro konkrétní počet (poč.) alikvotů u postupu QIAamp DSP Virus Spin\***

Počet alikvotů	Obj. lyzačního pufru (AL)* (ml)	Obj. nosiče RNA-AVE (μl)	Počet alikvotů	Obj. lyzačního pufru (AL)* (ml)	Obj. nosiče RNA-AVE (μl)
1	0,22 ml	6,2 μl	13	2,86 ml	80,1 μl
2	0,44 ml	12,3 μl	14	3,08 ml	86,3 μl
3	0,66 ml	18,5 μl	14	3,30 ml	92,4 μl
4	0,88 ml	24,6 μl	16	3,52 ml	98,6 μl
5	1,10 ml	30,8 μl	17	3,74 ml	104,7 μl
6	1,32 ml	37,0 μl	18	3,96 ml	110,9 μl
7	1,54 ml	43,1 μl	19	4,18 ml	117,0 μl
8	1,76 ml	49,3 μl	20	4,40 ml	123,2 μl
9	1,98 ml	55,4 μl	21	4,62 ml	129,4 μl
10	2,20 ml	61,6 μl	22	4,84 ml	135,5 μl
11	2,42 ml	67,8 μl	23	5,06 ml	141,7 μl
12	2,64 ml	73,9 μl	24	5,28 ml	147,8 μl



Postup přípravy alikvotu je optimalizován na 5,6 μg nosiče RNA na alikvot. Pokud se ukáže, že je pro váš amplifikační systém lepší použít méně nosiče RNA, převedte pouze požadované množství rozpuštěného nosiče RNA do zkumavek obsahujících lyzační pufr (AL). Na každý mikrogram nosiče RNA požadovaný pro přípravu přidejte 5 μl nosiče RNA rozpuštěného v elučňím pufru (AVE) na mililitr lyzačního pufru (AL). Použití méně než 5,6 μg nosiče RNA na alikvot musí být validováno pro každý konkrétní typ alikvotu a následnou analýzu.

\*Pokud se používá interní kontrola, snižte odpovídajícím způsobem objem lyzačního pufru (AL).

Pro automatizovaný postup připravte nosič RNA v AVE, jak je popsáno výše (abyste získali roztok o koncentraci 1 μg/μl). V dalším kroku dodejte do přístroje QIAcube Connect MDx dostatečné množství roztoku nosiče RNA pro požadovaný počet alikvotů plus dva další alikvoty. Požadované množství se zobrazí během vkládání na uživatelském rozhraní. Přidání nosiče RNA do lyzačního pufru (AL) se provádí pomocí přístroje QIAcube Connect MDx.

Směs interní kontroly se připraví podle popisu na obrazovce přístroje QIAcube MDx. Interní kontrola se přidá ke směsi nosiče RNA-AVE.

## Příprava promývacího pufru 1 (AW1)\*

Pomocí odměrného válce přidejte 25 ml etanolu (96–100%) do lahve obsahující 19 ml koncentrátu promývacího pufru 1 (AW1), jak je napsáno na lahvi. Zaškrtněte zaškrťovací políčko na štítku jako označení, že byl přidán etanol. Rekonstituovaný promývací pufr 1 (AW1) uchovávejte při pokojové teplotě.



Před zahájením postupu vždy promíchejte rekonstituovaný promývací pufr 1 (AW1) několikanásobným převrácením lahve.

## Příprava promývacího pufru 2 (AW2)†

Pomocí odměrného válce přidejte 30 ml etanolu (96–100%) do lahve obsahující 13 ml koncentrátu promývacího pufru 2 (AW2), jak je napsáno na lahvi. Zaškrtněte zaškrťovací políčko na štítku jako označení, že byl přidán etanol. Rekonstituovaný promývací pufr 2 (AW2) uchovávejte při pokojové teplotě.



Před zahájením postupu vždy promíchejte rekonstituovaný promývací pufr 2 (AW2) několikanásobným převrácením lahve.

## Příprava elučního pufru (AVE)

Čtyři zkumavky elučního pufru (AVE) jsou součástí sady. Dbejte na to, abyste nekontaminovali pufr s RNázami. Při provádění 4 nebo méně postupů purifikace za použití jedné sady doporučujeme na konci každého postupu zlikvidovat zkumavku elučního pufru (AVE).

\* Obsahuje chaotropní sůl. Při práci přijměte odpovídající laboratorní bezpečnostní opatření a během manipulace noste rukavice. Není kompatibilní s dezinfekčními přípravky obsahujícími bělicí prostředky. Viz informace o bezpečnosti na straně 16.

† Obsahuje azid sodný jako konzervační látku.

# Protokol: Purifikace virových nukleových kyselin z plazmy nebo séra pomocí mikrocentrifugy nebo přístroje QIAcube Connect MDx

K purifikaci virových nukleových kyselin z 200 µl séra nebo plazmy ošetřené EDTA nebo citrátem pomocí sady QIAamp DSP Virus Spin Kit a za použití mikrocentrifugy, případně automaticky na přístroji QIAcube Connect MDx.

## Důležité body před zahájením používání

- Níže uvedený postup obsahuje pokyny pro zpracování jednoho alikvotu. Souběžně je však možné zpracovat několik krevních vzorků; jejich počet závisí na kapacitě použité mikrocentrifugy.
- Na přístroji QIAcube Connect MDx lze provádět automatizované zpracování 2–10 nebo 12 alikvotů.
- Při automatizaci postupujte podle pokynů v uživatelském rozhraní (QIAcube Connect MDx) a prostudujte si uživatelskou příručku k přístroji QIAcube Connect MDx.

## Co je třeba udělat, než začnete

- Vytemperujte vzorky na pokojovou teplotu (15–25 °C) a důkladně je promíchejte.
- Ujistěte se, že jsou všechny reagenty a kolony QIAamp MinElute (v uzavřených blistrech) vytemperovány na pokojovou teplotu.
- Nastavte topný blok na teplotu 56 °C pro použití v kroku 4 (vyžadováno pro manuální postup a automatizovaný postup s manuální lýzou mimo přístroj).
- Zajistěte, aby promývací pufr 1 (AW1), promývací pufr 2 (AW2) a proteáza QIAGEN Protease (QP) byly připraveny podle pokynů uvedených na stranách 26–30.
- Pokud se v lyzačním pufru (AL) vytvořil precipitát, rozpusťte jej inkubací při teplotě 56 °C.

- Přidejte nosič RNA rekonstituovaný v elučním pufru (AVE) do lyzačního pufru (AL) podle pokynů uvedených na straně 27 (pouze pro manuální postup).
- Pokud je to možné, použijte eluční pufr (AVE) pro každý postup (k dispozici jsou 4 zkumavky).
- Postupy kontroly kvality ve společnosti QIAGEN popisují funkční testování sady před vydáním pro každou jednotlivou šarži sady. Nemíchejte proto reagenty z různých šarží sad ani nekombinujte jednotlivé reagenty z různých šarží reagentů.

## Postup

- U manuálního postupu s mikrocentrifugou postupujte podle kroků 1–15.
  - Tento postup lze na přístroji QIAcube Connect MDx automatizovat ve dvou různých verzích:
    - Plasma or Serum\_Standard (Plazma nebo sérum\_standard): Plně automatizované s použitím 200 µl alikvoty (automatizace od kroku 1)
    - Plasma or Serum\_Manual lysis (Plazma nebo sérum\_manuální lýza): Částečně automatizované s manuální lýzou mimo přístroj s použitím objemu 200 µl počáteční alikvoty (automatizace od kroku 5)
1. Do lyzační zkumavky (LT) napipetujte 25 µl proteázy QIAGEN Protease (QP).
 

i

 Před použitím zkontrolujte datum použitelnosti rekonstituované proteázy.
  2. Do lyzační zkumavky (LT) přidejte 200 µl plazmy nebo séra.
 

**Poznámka:** Pokud je objem alikvoty menší než 200 µl, přidejte odpovídající množství roztoku 0,9% chloridu sodného a upravte objem proteázy a alikvoty až na celkových 225 µl.
  3. Přidejte 200 µl lyzačního pufru (AL) (obsahujícího 28 µg/ml nosiče RNA a případně i interní kontrolu). Uzavřete víčko a promíchejte pulzním protřepáváním po dobu ≥ 15 s. Pro zajištění efektivní lýzy je zásadně důležité, abyste důkladně promíchali alikvot lyzační pufr (AL), čímž se získá homogenní roztok.





Lyzační pufr (AL) obsahuje interní kontrolu. Vzhledem k vysoké viskozitě lyzačního pufu (AL) dbejte na přidání správného objemu lyzačního pufu (AL) pečlivým odpipetováním.



Nepřidávejte proteázu QIAGEN Protease (QP) přímo do lyzačního pufu (AL).

- Inkubujte při teplotě 56 °C po dobu 15 minut v topném bloku.
- Lyzační zkumavku (LT) krátce odstředujte pro odstranění kapek z vnitřní strany víčka.

**Poznámka:** Pokud byla manuální lýza (kroky 1–15) provedena mimo přístroj, lze automatizovat následující kroky (kroky 6–15): „Protokol manuální lýzy“ na přístroji QIAcube Connect MDx.

- K alikvotu přidejte 250 µl etanolu (96–100%), uzavřete víčko a důkladně promíchejte po dobu  $\geq 15$  s na pulsním vortexu. Lyzát inkubujte s etanolem po dobu 5 minut při pokojové teplotě (15–25 °C).
- Zkumavku krátce odstředujte pro odstranění kapek z vnitřní strany víčka.
- Opatrně naneste veškerý lyzát z kroku 7 na kolonku QIAamp MinElute, aniž byste navlhčili její okraj. Uzavřete víčko a odstředujte při přibližně 6 000  $\times$  g po dobu > 1 minuta. Umístěte kolonku QIAamp MinElute do čisté 2ml promývací zkumavky (wash tube, WT) a promývací zkumavku (WT) obsahující filtrát zlikvidujte.



Pokud lyzát po centrifugaci zcela neprošel kolonkou, odstředujte znovu při vyšší rychlosti, dokud se kolonka QIAamp MinElute nevyprázdní.

- Kolonku QIAamp MinElute opatrně otevřete a přidejte 500 µl promývacího pufu 1 (AW1), aniž byste navlhčili její okraj. Uzavřete víčko a odstředujte při přibližně 6 000  $\times$  g po dobu  $\geq 1$  minuta. Umístěte kolonu QIAamp MinElute do čisté 2ml promývací zkumavky (wash tube, WT) a promývací zkumavku (WT) obsahující filtrát zlikvidujte.
- Kolonku QIAamp MinElute opatrně otevřete a přidejte 500 µl promývacího pufu 2 (AW2), aniž byste navlhčili její okraj. Uzavřete víčko a odstředujte při přibližně 6 000  $\times$  g po dobu > 1 minuta. Umístěte kolonku QIAamp MinElute do čisté 2ml promývací zkumavky (WT) a promývací zkumavku (WT) obsahující filtrát zlikvidujte.

11. Opatrně otevřete kolonku QIAamp MinElute a přidejte 500 µl etanolu (96–100%), aniž byste navlhčili její okraj. Uzavřete víčko a odstředíte při přibližně 6 000 × g po dobu > 1 minuta. Promývací zkumavku (WT) obsahující filtrát zlikvidujte.



Přenos etanolu do eluátu může způsobovat problémy v následných aplikacích. Rotory některých odstředivek mohou při zpomalení vibrovat, což má za následek průsak obsahující etanol, který přijde do styku s kolonkou QIAamp MinElute. Průsak, který přijde do styku s kolonkou QIAamp MinElute, může být rovněž způsoben vyjmutím kolonky QIAamp MinElute a promývací zkumavky z rotoru.

12. Vložte kolonku QIAamp MinElute do čisté 2ml promývací zkumavky. Odstředíte při plných otáčkách (přibližně 20 000 × g) po dobu 3 minut, aby se membrána zcela vysušila.



Vynechání této centrifugace, při níž dochází k vysušení kolonky, může vést k inhibici následné analýzy.

13. Umístěte kolonku QIAamp MinElute do nové 2ml promývací zkumavky, otevřete víčko a sestavu inkubujte při teplotě 56 °C po dobu 3 minut, aby se membrána zcela vysušila a odpařila se veškerá zbývající tekutina.

14. Vložte kolonku QIAamp MinElute do nové eluční zkumavky a promývací zkumavku s filtrátem zlikvidujte. Opatrně otevřete víčko kolonky QIAamp MinElute a do středu membrány přidejte 20–150 µl elučního pufru (AVE).



Je třeba použít novou eluční zkumavku, aby nedošlo ke kontaminaci zbytky promývacích pufrů, které by mohly vést k inhibici následné analýzy.




Dávkování elučního pufru na střed membrány je důležité zejména u menších elučních objemů, aby se zajistilo optimální získání nukleových kyselin a elučního pufru.



Eluční objem lze upravovat podle požadavků následné aplikace. V automatizovaném pracovním postupu jsou možné eluční objemy 60–100 µl s přírůstkem 5 µl. Nezapomeňte, že objem získaného eluátu může být nižší než objem elučního pufru naneseného na kolonku, a to v důsledku zbývajícího elučního pufru zadržitého membránou centrifugové kolonky po odstředění.

 Zajistěte, aby byl eluční pufr vytemperován na pokojovou teplotu.

15. Zavřete víčko a inkubujte při pokojové teplotě po dobu  $\geq 3$  minut. Odstředujte při plných otáčkách (přibližně  $20\,000 \times g$ ) po dobu 1 minuty.

 Víčka elučních zkumavek otočte tak, aby směřovala proti směru otáčení rotoru (např. pokud se rotor otáčí ve směru hodinových ručiček, otočte víčka proti směru hodinových ručiček).

 V případě všech automatizovaných postupů odstraňte eluáty z přístroje ihned po dokončení cyklu a řádně je uložte.

## Kontrola kvality

V souladu se systémem řízení kvality ve společnosti QIAGEN, certifikovaným podle norem ISO, se testuje každá šarže sady QIAamp DSP Virus Spin Kit vůči předem stanoveným specifikacím, aby se zajistila konzistentní kvalita výrobku.

## Omezení

Funkční vlastnosti systému byly stanoveny ve studiích hodnocení funkčních vlastností při purifikaci virových nukleových kyselin ze vzorků lidské plazmy a séra.

Každý uživatel je zodpovědný za kontrolu funkčních vlastností systémů u všech postupů používaných v dané laboratoři, které nejsou zahrnuty ve studiích funkčních vlastností výrobků společnosti QIAGEN.

Pro minimalizaci rizika negativního dopadu na diagnostický výsledek je zapotřebí používat pro následné aplikace odpovídající kontroly. Jakékoliv získané diagnostické výsledky se musejí interpretovat v kontextu ostatních klinických nebo laboratorních nálezů.

## Charakteristika funkčních vlastností

Příslušné charakteristiky funkčních vlastností naleznete pod kartou zdroje na produktové stránce na adrese [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Řešení potíží

Uvedené návody mohou pomoci při řešení potíží, které mohou nastat při práci se systémem. Další informace můžete najít také mezi častými dotazy (Frequently Asked Questions, FAQ) na stránkách našeho centra technické podpory: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Vědci z technické podpory společnosti QIAGEN vždy rádi zodpoví vaše otázky ohledně údajů a/nebo protokolů v tomto manuálu i obecně k technologiím pro přípravu alikvotů a jejich analýz (kontaktní údaje naleznete na webových stránkách [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Komentáře a návrhy

---

### Obecné pokyny k manipulaci

- a) Ucpávání špiček pipet při přenosu alikvotu
- Zmrazené alikvoty nebyly po rozmrazení důkladně promíchány. Rozmrazte zmrazené alikvoty pomocí jemného třepání, aby se zajistilo důkladné promíchání. Kryoprecipitáty vzniklé během cyklu zmrazení–rozmrazení budou ucpávat membránu QIAamp MinElute. V případě, že jsou viditelné kryoprecipitáty, vyčistíte alikvot odstředěním po dobu 5 minut při  $16\ 000 \times g$ .
- b) Zanesená kolonka QIAamp MinElute
- Pokud veškerý lyzát neprojde přes membránu po centrifugaci při  $6\ 000 \times g$  ( $8\ 000$  ot./min), centrifugujte znovu při plných otáčkách (přibližně  $20\ 800 \times g$ ) po dobu 1 min.
- Pokud lyzát během centrifugace neprojde zcela membránou, alikvot zlikvidujte a opakujte izolaci a purifikaci s novým testovaným alikvotem, počínaje krokem 1. Kryoprecipitáty vzniklé během zmrazení a rozmrazení budou ucpávat membránu kolonky QIAamp MinElute. V případě, že jsou viditelné kryoprecipitáty, vyčistíte alikvot odstředěním po dobu 5 minut při  $16\ 000 \times g$ .
- Použití ledem chlazeného ethanolu během lýzy může pomoci snížit riziko zanesení membrány. Dále je nezbytné přidávat pufrý pro lýzu ve správném pořadí popsáném výše. Nepřidávejte proteázu QIAGEN Protease (QP) přímo do lyzačního pufru (AL).

## Komentáře a návrhy

---

- c) V lyzačním pufru se vytvořila sraženina      Rozpusťte inkubační lyzační pufru (AL) při teplotě 56 °C.
- d) Variabilní eluční objemy      Objem získaného eluátu závisí na povaze alikvotu.  
Vzhledem ke zbývajícímu elučnímu pufru zadrženému membránou centrifugační kolonky po odstředění může být objem získaného eluátu nižší než objem elučního pufru naneseného na kolonku.  
Naneste eluční pufr do středu membrány. Dávkování elučního pufru na střed membrány je důležité zejména u menších elučních objemů, aby se zajistilo optimální získání nukleových kyselin a elučního pufru.
- e) Problémy při automatizovaném pracovním postupu      *Viz uživatelská příručka k přístroji QIAcube Connect MDx.*
- 

### DNA nemá dobrou účinnost v následných aplikacích

- a) Neúplná lýza alikvotů      Pokud byla proteáza QIAGEN Protease (QP) dlouhodobě vystavena zvýšené teplotě, může u ní dojít ke ztrátě aktivity. Opakujte postup s použitím nových alikvotů a čerstvou proteázou QIAGEN Protease (QP).  
Dbejte na to, abyste proteázu QIAGEN Protease (QP) rozpustili s rozpouštědlem proteázy podle výše uvedených pokynů. Aby obsah nezpěnil, míchání proveďte několikanásobným obrácením lahvičky. Ujistěte se, že je proteáza QIAGEN Protease (QP) zcela rozpuštěná. Nepřidávejte proteázu QIAGEN Protease (QP) přímo do lyzačního pufru (AL).  
Pro zajištění efektivní lýzy je zásadní, abyste důkladně promíchali alikvot a lyzační pufr (AL), čímž se získá homogenní roztok. Vzhledem k vysoké viskozitě lyzačního pufru (AL) dbejte na přidání správného objemu lyzačního pufru (AL) pečlivým odpipetováním a použitím vhodné pipety.
- b) Namísto 96–100% byl použit nízkoprocentní etanol      Zopakujte purifikační proceduru s novými alikvoty a 96–100% etanolem. Nepoužívejte denaturovaný alkohol, který obsahuje další látky, jako například metanol nebo metyletylketon.

## Komentáře a návrhy

---

- c) Promývací pufr 1 (AW1) nebo promývací pufr 2 (AW2) byl připraven nesprávně
- Před zahájením postupu se ujistěte, že koncentráty promývacího pufru 1 (AW1) a promývacího pufru 2 (AW2) byly naředěny správným objemem 96–100% ethanolu a promíchány několikerým převrácením lahvičky.
- d) Vzorky plazmy a séra nebyly připraveny, skladovány nebo smíchány správně
- Postup purifikace je optimalizován pro použití se vzorky lidské plazmy a séra. K přípravě plazmy lze použít alikvoty krve upravené EDTA nebo citrátem jako antikoagulantem. Po odběru a centrifugaci mohou být plazma nebo sérum uchovávané při teplotě 2–8 °C až po dobu 6 hodin. Pro dlouhodobé uchování se doporučuje zmrazení při –80 °C až –20 °C v alikvotních množstvích.
- Zmrazené vzorky plazmy nebo séra nesmí roztát více než jednou. Opakované zmrazování a roztátí vede k denaturaci a precipitaci proteinů, což má za následek snížené virové titry, a proto dává snížené výtěžky virových nukleových kyselin.
- Rozmrazte zmrazené alikvoty pomocí jemného třepání, aby se zajistilo důkladné promíchání.
- e) V eluátu je málo DNA nebo žádná
- Pokud je to možné, snižte eluční objem nebo zvýšte množství eluátu přidaného do reakce.
- f) Použit nevhodný eluční objem
- Stanovte maximální objem eluátu vhodný pro vaši následnou aplikaci. V souladu s tím snižte nebo zvýšte objem eluátu přidaného do následné aplikace. Eluční objem může být úměrně upraven. Eluce s menšími objemy elučního pufru (AVE) vede k vyšším koncentracím nukleových kyselin.



## Komentáře a návrhy

---

- g) Přenos potenciálního inhibitoru
- Před elucí nezapomeňte provést krok suché centrifugace, abyste zabránili potenciální inhibici následné analýzy.
- Je třeba použít novou eluční zkumavku, aby nedošlo ke kontaminaci zbytky promývacích pufrů, které by mohly vést k inhibici následné analýzy.
- Podle modelových interferenčních studií pro sadu QIAamp DSP Virus Spin Kit a v souladu s normou ISO 20186-2:2019(E) může heparin ze zkumavek pro odběr krve ovlivnit čistotu izolovaných nukleových kyselin a případný přenos do eluátů může způsobit inhibici v některých následných aplikacích. Proto doporučujeme používat alikvoty krve ošetřené antikoagulantem EDTA nebo citrátem.
- h) Nesprávně degradovaný/připravený nosič RNA
- Nosič RNA slouží ke dvěma účelům: Zaprvé, podporuje vázání virových nukleových kyselin na membránu QIAamp, zvláště pokud je v alikvotu velmi málo cílových molekul. Zadruhé, přídavek velkého množství nosiče RNA snižuje možnost degradace virové RNA ve vzácném případě, kdy molekuly RNÁzy uniknou denaturaci chaotropními solemi a detergentem v lyzačním pufru (AL).
- Pokud se nosič RNA do lyzačního pufru (AL) nepřidá, může to vést ke snížení výtěžku virové RNA nebo DNA.
- Nosič RNA se může rozpouštět pouze v elučním pufru (AVE). Rozpuštěný nosič RNA se musí okamžitě přidat do lyzačního pufru (AL).
- Nosič RNA může být také zahrnut do některých interních kontrolních činidel komerčních následných analýz. V těchto případech se podívejte na příslušné návody k použití od výrobce navazující analýzy.

# Symboly

V návodu k použití anebo na obalu a značení se objevují následující symboly:

## Symbol

## Definice symbolu



<N>

Obsahuje dostatek reagentů pro <N> reakcí



Viz návod k použití



Použijte do



Tento výrobek splňuje požadavky evropského nařízení 2017/746 pro diagnostické zdravotnické prostředky in vitro.



Zdravotnický prostředek pro diagnostiku in vitro



Katalogové číslo



Důležitá poznámka



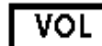
Číslo šarže



Číslo materiálu (tj. označení dílu)



Komponenty



Objem



Teplotní omezení



Výrobce

## Symbol

## Definice symbolu



Při dodání



Otevřít při převzetí; uchovávejte kolonky QIAamp MinElute při teplotě 2–8 °C



Zapište aktuální datum přidání etanolu do lahvičky

**ADD**

Přidání

**CONT**

Obsahuje

**LYOPH**

Lyofilizováno

**RCNS**

Rekonstituuje v

**EtOH**

Etanol

**GuHCl**

Guanidinhydrochlorid

**MALEIC ACID**

Kyselina maleinová

**SUBT**

Subtilisin

**GTIN**

Globální číslo obchodní položky (Global Trade Item Number, GTIN)



Způsobuje

**NUM**

Počet

Rn

R označuje revizi návodu k použití a n je číslo revize



Chraňte před slunečním světlem

## Symbol

## Definice symbolu

---



Varování/upozornění



Jedinečný identifikátor prostředku

# Příloha

## Manipulace s RNA

Ribonukleázy (RNázy) jsou velmi stabilní a aktivní enzymy, které obecně nevyžadují ke své funkci přítomnost kofaktorů. Protože se RNázy inaktivují obtížně a k destrukci RNA stačí jen nepatrná množství, nepoužívejte žádné plastové či skleněné předměty, aniž byste nejprve neodstranili případnou kontaminaci RNázou. Dbejte na to, aby nedošlo k neúmyslnému zavlečení RNáz do vzorku RNA během izolačního procesu nebo po něm. Pro vytvoření a udržení prostředí prostého RNáz se musejí uplatnit následující bezpečnostní opatření během předběžného zpracování a používání nádob a roztoků k jednorázovému a vícenásobnému použití při práci s RNA.

## Obecné pokyny k manipulaci

Při práci s RNA je vždy nutno používat správnou mikrobiologickou aseptickou techniku. Ruce a prachové částice mohou přenášet bakterie a plísňe a jsou to nejčastější zdroje kontaminace RNázou. Při manipulaci s reagensy a alikvoty RNA vždy noste latexové nebo vinylové rukavice, abyste zabránili kontaminaci RNázou z povrchu kůže nebo ze zaprášeného laboratorního vybavení. Rukavice často vyměňujte a zkumavky uchovávejte zavřené.

# Informace o způsobu objednávání

Produkt	Obsah	Kat. č.
QIAamp DSP Virus Spin Kit (50)	Na 50 příprav: Kolonky QIAamp MinElute, pufrý, reagentie, zkumavky, přípojky VacConnectors	61704
<b>Související produkty</b>		
QIAcube Connect MDx*	Přístroj a roční záruka na díly a servis	9003070
<b>Příslušenství</b>		
Rotor Adapters	Na 240 příprav: 240 adaptérů Disposable Rotor Adapters a 240 zkumavek Elution Tubes (1,5 ml) pro použití na přístroji QIAcube Connect MDx	990394
Rotor Adapter Holder	Držák na 12 jednorázových adaptérů do rotoru; pro použití s přístrojem QIAcube Connect MDx	990392
Sample Tubes CB	1 000 zkumavek se šroubovacím víčkem bez olemované základny (2 ml) pro použití na přístroji QIAcube Connect MDx	990382
Shaker Rack Plugs	Pro naplnění stojanu třepačky QIAcube Connect MDx	9017854
Reagent Bottles, 30 ml	Lahve Reagent Bottles (30 ml) s víčky; balíček po 6 kusech; pro použití s přístrojem QIAcube Connect MDx	990393

Filter-Tips, 1000 µl	Špičky Disposable Filter-Tips, ve stojanech; (8 × 128). Pro použití s přístrojem QIAcube Connect MDx	990352
Filter-Tips, 1000 µl, wide-bore	Špičky Disposable Filter-Tips, široký otvor, ve stojanech; (8 × 128); není vyžadováno pro všechny protokoly. Pro použití s přístrojem QIAcube Connect MDx	990452
Filter-Tips, 200 µl	Špičky Disposable Filter-Tips, ve stojanech; (8 × 128) Pro použití s přístroji QIAcube Connect MDx a QIASymphony SP/AS	990332

\* Přístroj QIAcube Connect MDx není k dispozici ve všech zemích. Pro další podrobnosti kontaktujte oddělení technických služeb společnosti QIAGEN.

Aktuální licenční informace a odmítnutí odpovědnosti specifické pro výrobek jsou uvedeny v příručce pro sadu QIAGEN nebo v návodu k použití. Návody k použití k sadám QIAGEN jsou k dispozici na webových stránkách [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) nebo si je lze vyžádat od oddělení technických služeb společnosti QIAGEN či místního distributora.

# Historie revizí dokumentu

## Revize

## Popis

R1, červen 2022

Verze 2, revize 1

- Aktualizace sady na verzi 2 kvůli souladu s nařízením IVDR
- Aktualizace oddílů Zamýšlené použití a Omezení
- Aktualizace oddílu Popis a principy
- Aktualizace oddílu Dodávané materiály (přidány účinné přísady) a Potřebné materiály, které nejsou součástí dodávky
- Aktualizace oddílu Varování a bezpečnostní opatření (přidán nouzový kontakt a část Likvidace)
- Aktualizace oddílu Skladování reagentů a manipulace s nimi
- Aktualizace oddílu Odběr, skladování a nakládání se vzorky
- Aktualizace oddílu Důležité poznámky a postupy
- Aktualizace oddílu Charakteristika funkčních vlastností
- Aktualizace části Příloha
- Přidány Pokyny pro řešení potíží
- Aktualizace části Symboly
- Aktualizace oddílu Informace o způsobu objednávání



Tato stránka je úmyslně ponechána prázdná

Tato stránka je úmyslně ponechána prázdná

### Omezené licenční ujednání pro sadu QIAamp® DSP Virus Spin Kit

Používáním tohoto produktu vyjadřuje každý kupující nebo uživatel produktu svůj souhlas s následujícími podmínkami:

1. Tento produkt se může používat výhradně v souladu s protokoly poskytnutými s tímto produktem a tímto návodem k použití a pro použití pouze se součástmi dodanými v tomto panelu. Společnost QIAGEN neposkytuje žádnou licenci svých duševních práv k používání nebo začlenění součástí, které jsou obsaženy v tomto panelu, společně s kterýmikoliv součástmi, které v tomto panelu obsaženy nejsou, s výjimkou případů popsaných v tomto návodu k použití a dalších protokolech dostupných na webových stránkách [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Některé z těchto doplňujících protokolů byly poskytnuty uživateli produktů společnosti QIAGEN pro jiné uživatele produktů QIAGEN. Tyto protokoly nebyly společností QIAGEN důkladně testovány ani optimalizovány. Společnost QIAGEN nezaručuje ani neposkytuje záruku na to, že neporušují práva třetích stran.
2. Společnost QIAGEN neposkytuje žádnou jinou záruku než výslovně stanovené licence v tom smyslu, že tento panel a/nebo jeho použití nenarušuje práva třetích stran.
3. Tento panel a jeho komponenty jsou licencovány k jednorázovému použití a nesmí se používat opakovaně, přeprocessovat ani opakovaně prodávat.
4. Společnost QIAGEN specificky odmítá jakékoliv další výslovné nebo nepřímé licence s výjimkou těch, které jsou uvedeny výslovně.
5. Kupující a uživatel tohoto panelu souhlasí s tím, že nepodnikne ani nikomu jinému neumožní podniknout žádné kroky, které by mohly vést k jakémukoli shora zakázané činnosti nebo ji usnadnily. Společnost QIAGEN může prosazovat zájazy tohoto ujednání o omezené licenci u kteréhokoliv soudu, a bude vyžadovat kompenzaci za veškeré náklady vynaložené na vyšetřování a soudní výlohy včetně poplatků za právní zástupce v případě jakéhokoliv soudního sporu s cílem prosadit toto ujednání o omezené licenci nebo kteréhokoliv ze svých práv k duševnímu vlastnictví v souvislosti s panelem a/nebo jeho součástmi.

Pro aktualizovaná licenční ustanovení viz [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Ochranné známky: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAcube®, QIAamp® (skupina QIAGEN). Registrované názvy, ochranné známky atd. použité v tomto dokumentu, i když nejsou výslovně takto označeny, nelze považovat za nechráněné zákonem.

1127542CS 06/2022 HB-3031-001 © 2022 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.

Objednávky [www.qiagen.com/shop](http://www.qiagen.com/shop) | Technická podpora [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) |  
Webová stránka [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)