

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



Version 2



Til in vitro-diagnostisk brug



61504



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Tyskland



1127632DA

# Indhold

Tilsligtet anvendelse .....	4
Tilsligtet bruger .....	4
Beskrivelse og princip .....	5
Prøvevolumener .....	5
Lysering af prøver .....	7
Adsorption på QIAamp Mini-kolonmembranen .....	7
Fjernelse af restkontaminanter .....	7
Elution af rene nukleinsyrer .....	8
Udbytte og størrelse af nukleinsyrer .....	8
Beskrivelse af protokoller .....	9
Oversigt og forklaring .....	9
Medfølgende materialer .....	10
Kit-indhold .....	10
Sættets komponenter .....	11
Nødvendige materialer, som ikke medfølger .....	12
Yderligere reagenser .....	12
Forbrugsartikler .....	12
Udstyr .....	13
Advarsler og forholdsregler .....	14
Sikkerhedsinformation .....	14
Nødoplysninger .....	15
Forholdsregler .....	15

<b>Bortskaffelse</b> .....	16
Opbevaring og håndtering af reagenser .....	17
<b>Stabilitet under brug</b> .....	17
Prøveopbevaring og -håndtering.....	18
Procedure .....	19
Klargøring af buffere og reagenser .....	26
Breeze-protokol: Oprensning af cirkulerende nukleinsyrer fra 1-5 ml humant blodplasma .....	29
Klassisk protokol: Oprensning af cirkulerende nukleinsyrer fra 1-5 ml humant blodplasma .....	34
Kvalitetskontrol .....	39
Begrænsninger .....	39
Ydelseskarakteristika .....	40
Litteraturhenvisninger.....	41
Fejlfindingsvejledning.....	42
Symboler .....	45
Bilag A: Anbefalinger for separation og opbevaring af blodplasma .....	48
Bilag B: Generelle bemærkninger om håndtering af RNA.....	50
Bestillingsinformation.....	51
Revisionshistorik for dokumentet .....	52

## Tilsigtet anvendelse

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

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

## Tilsigtet bruger

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

# Beskrivelse og princip

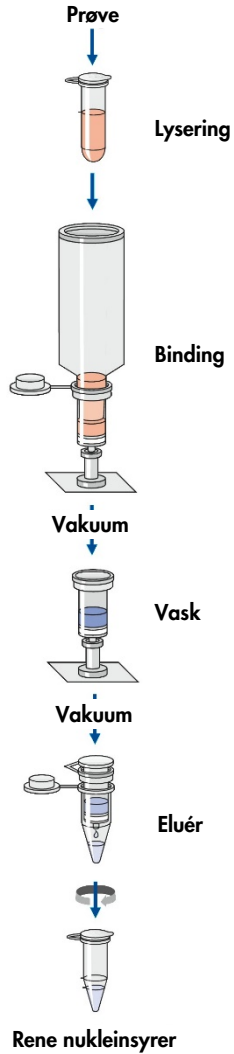
QIAamp DSP Circulating NA-proceduren omfatter 4 trin (lysis, binding, vask og elution) og udføres ved anvendelse af QIAamp Mini-kolonner på QIAvac-systemet. Den robuste procedure medvirker til at minimere krydskontaminering fra prøve til prøve og øger brugernes sikkerhed ved håndtering af potentielt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

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

## Prøvevolumener

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

QIAamp DSP Circulation  
NA Kit-proceduren



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

## Lysering af prøver

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

## Adsorption på QIAamp Mini-kolonmembranen

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

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

## Fjernelse af restkontaminanter

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

## Elution af rene nukleinsyrer

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

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

## Udbytte og størrelse af nukleinsyrer

Udbytter af frit cirkulerende nukleinsyrer isoleret fra biologiske prøver er normalt under 1 µg og er derfor vanskelige at bestemme med et spektrofotometer. Det absolutte udbytte af cirkulerende DNA og RNA, der opnås fra en prøve ved anvendelse af QIAamp DSP Circulating NA Kit, varierer mellem prøver fra forskellige personer og afhænger også af andre faktorer (eksempelvis nogle sygdomstilstande). Desuden vil carrier-RNA, der er til stede i de ekstraherede nukleinsyrer, sandsynligvis dominere UV-absorbansmålinger (se side 27). Kvantitative amplifikationsmetoder anbefales til bestemmelse af udbytte.

Størrelsesfordelingen af cirkulerende nukleinsyrer, der er oprenset ved hjælp af QIAamp DSP Circulating NA Kit, kan kontrolleres ved agarosegel-elektroforese eller hybridisering til en målspecifik mærket probe (1) eller en mikrofluidikbaseret elektroforeseopløsning (f.eks. Agilent® Bioanalyzer).



## Beskrivelse af protokoller

I denne håndbog viser to forskellige protokoller.

- "Breeze-protokol: Oprensning af cirkulerende nukleinsyrer fra 1-5 ml humant blodplasma" (side 29) er beregnet til behandling af op til 5 ml plasma in 1 ml trin og er optimeret til minimal brugerhåndtering og hurtig behandlingstid.
- "Klassisk protokol: Oprensning af cirkulerende nukleinsyrer fra 1-5 ml humant blodplasma" (side 34) er beregnet til behandling af op til 5 ml plasma in 1 ml trin og består af den uændrede protokol i *håndbogen til QIAamp DSP Circulating NA Kit*, version 1, revision 3 (R3).

## Oversigt og forklaring

Frit cirkulerende nukleinsyrer findes i human plasma, som regel som korte fragmenter, <1000 bp (DNA) <1000 nt (RNA) eller helt ned til 20 nt (miRNA). Koncentrationen af frit cirkulerende nukleinsyrer i humant blodplasma er som regel lav og varierer betydeligt fra person til person i området fra 1-100 ng/ml i humane prøver (2-6).

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

Elueret, frit cirkulerende genomisk DNA eller RNA er klar til brug i efterfølgende anvendelser og er også egnet til opbevaring. Brugeren skal derfor optimere plasmainputtet og elveringsmængden for deres specifikke målanvendelse og efterfølgende anvendelse på deres laboratorie.

# Medfølgende materialer

## Kit-indhold

<b>QIAamp DSP Circulating NA Kit</b>	<b>(50)</b>
<b>Katalognr.</b>	<b>61504</b>
<b>Antal klargøringer</b>	<b>50</b>

	Identitet	Symboler	Mængde
QIAamp Mini	QIAamp Mini Columns with Wash Tubes (QIAamp Mini-kolonner med vaskerør) (WT) (2 ml)	<b>COL</b>	50
EXT	Column Extenders (kolonneforlængere) (20 ml)	<b>COL</b> <b>EXT</b>	2 x 25
WT	Wash Tubes (vaskerør) (2 ml)	<b>WASH</b> <b>TUBE</b>	50
ET	Elution Tubes (elutionsrør) (1,5 ml)	<b>ELU</b> <b>TUBE</b>	50
VC	VacConnectors (vakuumbekkeforbindere)	<b>VAC</b> <b>CON</b>	50
ACL*	Lysis Buffer* (lysisbuffer)	<b>LYS</b> <b>BUF</b>	220 ml
ACB*	Binding Buffer* (bindingsbuffer) (koncentrat)	<b>BIND</b> <b>BUF</b> <b>CONC</b>	300 ml
ACW1*	Wash Buffer 1* (vaskebuffer 1) (koncentrat)	<b>WASH</b> <b>BUF</b> <b>1</b> <b>CONC</b>	19 ml
ACW2†	Wash Buffer 2† (vaskebuffer 2) (koncentrat)	<b>WASH</b> <b>BUF</b> <b>2</b> <b>CONC</b>	13 ml
AVE†	Elution Buffer† (elutionsbuffer) (lilla hætter)	<b>ELU</b> <b>BUF</b>	5 x 2 ml
PROTK	QIAGEN Proteinase K	<b>PROTK</b>	4 x 7 ml
Carrier	Carrier-RNA (røde hætter)	<b>CAR</b> <b>RNA</b>	310 µg
QIAamp Mini	QIAamp Mini Columns with Wash Tubes (QIAamp Mini-kolonner med vaskerør) (WT) (2 ml)	<b>COL</b>	50
	Håndbog	<b>H</b> <b>B</b>	1

\* Indeholder et kaotopisk salt. Se side 14 for **Advarsler og forholdsregler**.

† Indeholder natriumazid som konserveringsmiddel.

## Sættets komponenter

Hovedkomponenterne i kittet er forklaret nedenfor.

**Table 1. Aktive indholdsstoffer i medfølgende reagenser**

Reagens		Aktivt indholdsstof	Koncentration
Symbol	Navn		
ACL	Lysis Buffer (Lysisbuffer)	Guanidin-thiocyanat	≥ 30 til <50 % w/w
ACB	Binding Buffer (Bindingsbuffer) (koncentrat)	Guanidin-thiocyanat	≥ 30 til <50 % w/w
ACW1	Wash Buffer 1 (vaskebuffer 1) (koncentrat)	Guanidinhydrochlorid	≥ 30 til <60 % w/w
ACW2	Wash Buffer 2 (vaskebuffer 1) (koncentrat)	Ingen	–
AVE	Elution Buffer (elutionsbuffer) (lilla hætter)	Ingen	–
PROTK	QIAGEN Proteinase K	Proteinase K	≥ 1 til <3 % w/w
Carrier	Carrier-RNA (røde hætter)	Ingen	–

## Kontroller og kalibratorer

For at minimere risikoen for en negativ indvirkning på diagnostiske resultater genereret efter nukleinsyreisolation skal der anvendes hensigtsmæssige kontroller for efterfølgende anvendelser.

# Nødvendige materialer, som ikke medfølger

## Yderligere reagenser

- Ethanol (96-100 %)\*
- Isopropanol (100 %)
- Knust is (kun for "Klassisk protokol: Oprensning af cirkulerende nukleinsyrer fra 1-5 ml humant blodplasma").
- Nogle prøver kan kræve fortynding med phosphat-bufferet saltvand (PBS)

## Forbrugsartikler

- Pipetter (justerbare)
- Sterile pipettespidser (pipettespidser med aerosolbarrierer anbefales for at forhindre krydskontaminering)
- 1,5 eller 2 ml nukleasefrie rør
- 50 ml centrifugerør

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

## Udstyr

- Vandbad eller varmeklok, som kan indeholde 50 ml centrifugeringsrør ved 56 °C eller 60 °C\*
- Varmeklok eller tilsvarende ved 56 °C, der passer til 2 ml vaskerør (kun til klassisk protokol)\*
- Vortexer
- Mikrocentrifuge (med rotor til 2 ml rør)\*
- QIAvac 24 Plus vacuum manifold (kat.-nr. 19413)
- QIAvac Connecting System (kat.-nr. 19419) eller tilsvarende
- Vacuum Pump (kat.-nr. 84010 [USA og Canada], 84000 [Japan] eller 84020 [resten af verden]) eller tilsvarende pumpe, der kan frembringe et vakuum på -800 til -900 mbar
- Ekstraudstyr: VacValves (kat.-nr. 19408)

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

# Advarsler og forholdsregler

Bemærk: Alvorlige hændelser med relation til brugen af udstyret skal muligvis rapporteres til producenten og den ansvarlige myndighed i det land, hvor brugeren og/eller patienten befinder sig.

Til in vitro-diagnostisk brug

## Sikkerhedsinformation

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

ADVARSEL Risiko for personskade



Tilsæt IKKE blegemiddel eller sure opløsninger direkte til væskeaffaldet fra klargøringen af prøven.

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

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

- Prøverne kan være smittefarlige. Prøve- og analyseaffald skal bortskaffes i henhold til lokale sikkerhedsprocedurer.

## Nødoplysninger

CHEMTREC

USA og Canada 1-800-424-9300

Uden for USA og Canada +1 703-527-3887

## Forholdsregler

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

### Buffer ACB



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

### Buffer ACL



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

### Buffer ACW1



Indeholder: guanidinhydrochlorid. Advarsel! Skadelig ved indtagelse eller ved indånding. Forårsager hudirritation. Forårsager alvorlig øjenirritation. Bær beskyttelseshandsker/beskyttelsestøj/øjenskyttelse/ansigtsbeskyttelse. Foruren et tøj tages af og vaskes, før det bruges igen. Bortskaf indholdet/beholderen på et godkendt genbrugssted.

## Proteinase K



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

## Bortskaffelse

Affaldet indeholder prøver og reagenser. Dette affald kan indeholde toksisk eller smittefarligt materiale og skal bortskaffes på korrekt vis. Der henvises til de lokale sikkerhedsbestemmelser for korrekte bortskaffelsesprocedurer.

Der henvises til de relevante sikkerhedsdatablade (Safety Data Sheets, SDS'er) for yderligere information. De findes online i PDF-format på [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), hvor sikkerhedsdatabladene for hvert QIAGEN-kit og hver kit-komponent kan læses og udskrives.



# Opbevaring og håndtering af reagenser

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

Frysetørret carrier-RNA skal opbevares ved stuetemperatur (15-25 °C) indtil den udløbsdato, der er angivet på komponentens etiket. Carrier-RNA skal opløses i Buffer AVE, og det opløste carrier-RNA skal umiddelbart herefter tilsættes i Buffer ACL som beskrevet på side 30 for Breeze-protokollen og på side 35 for den klassiske protokol. Denne opløsning skal klargøres frisk. Ubrugte portioner carrier-RNA opløst i Buffer AVE bør nedfryses i alikvoter ved -30 °C til -15 °C.

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

## Stabilitet under brug

Dette kit kan bruges i 12 måneder efter første brug eller indtil udløbsdatoen, alt efter hvad der kommer først.

# Prøveopbevaring og -håndtering

## Opbevaring og håndtering af blod

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

## Opbevaring og håndtering af plasma

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

Ved længere tids opbevaring kan alikvoter af plasma fra stabiliserede såvel som ikke-stabiliserede blodprøvetagningsrør opbevares ved -20 °C eller -80 °C i op til 12 måneder (kun for DNA som mål) eller -80 °C i 4 uger (RNA som mål).

## Opbevaring af eluerede nukleinsyrer

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

# Procedure

## Vigtige anvisninger før start

### QIAvac 24 Plus

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

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

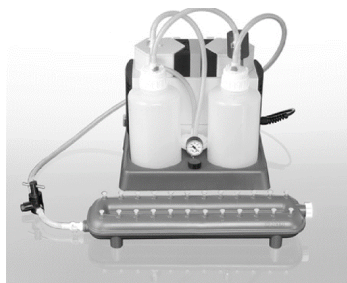
Du kan se oplysninger om vedligeholdelse af QIAvac 24 Plus under betjeningsvejledningen i *håndbogen til QIAvac 24 Plus*.

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

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

## Retningslinjer for håndtering af QIAvac 24 Plus

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



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

Tablet 2. Specifikationerne for kemisk resistens for QIAvac 24 Plus

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

## Opsætning af QIAvac 24 Plus vacuum manifold

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

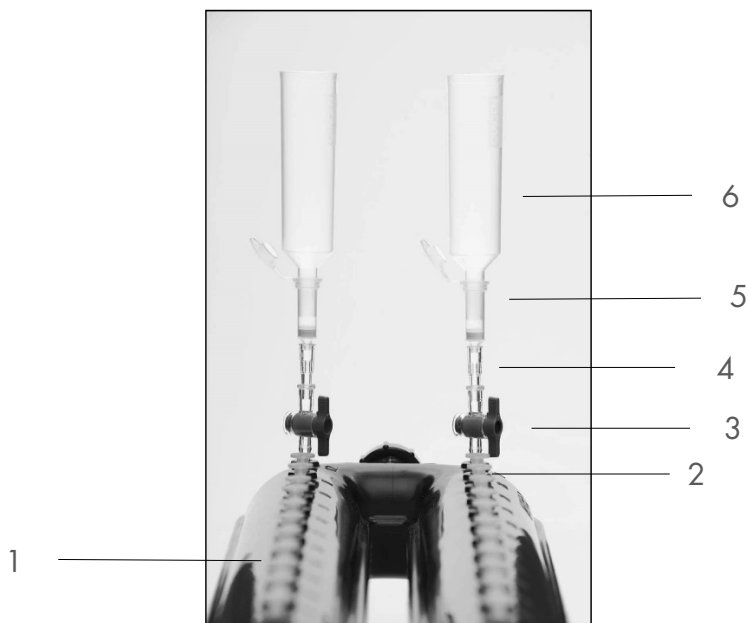
Lad låget på QIAamp Mini-kolonnen være åbent under påføring af vakuum.

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

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

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

**Bemærk:** Bufferne ACL, ACB og ACW1 er ikke kompatible med desinfektionsmidler, der indeholder blegemiddel. Se side 14 for Advarsler og forholdsregler.

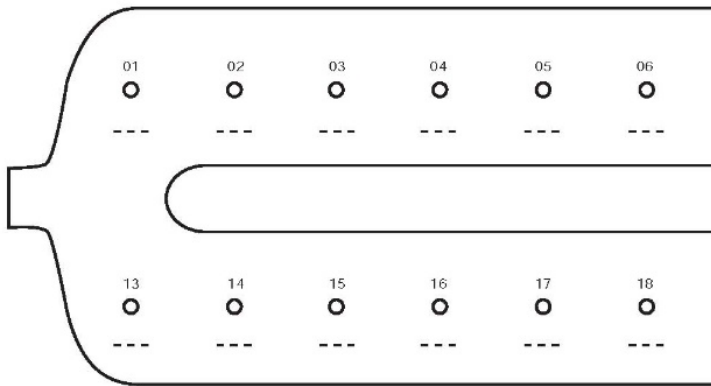


Figur 3. Opsætning af QIAvac 24 Plus med QIAamp Mini-kolonner ved brug af VacValves, VacConnectors og kolonneforlængere.

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

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

\* Skal købes separat.

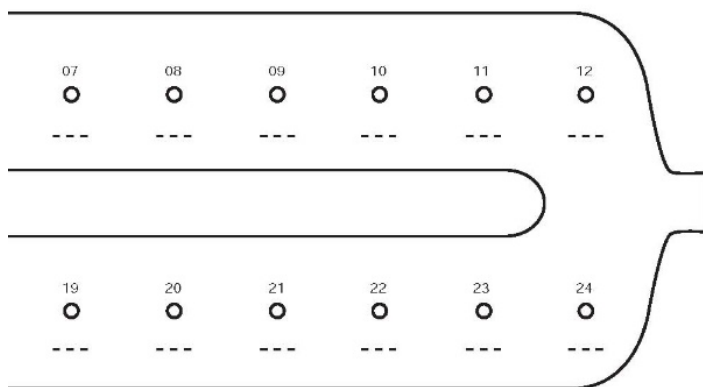


Dato: \_\_\_\_\_

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

Kørsels-ID: \_\_\_\_\_





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

# Klargøring af buffere og reagenser

## Buffer ACB

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

## Buffer ACW1 \*

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

## Buffer ACW2 †

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

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

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

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

\* Indeholder kaotropisk salt. Se side 14 for **Advarsler og forholdsregler**.

† Indeholder natriumazid som konserveringsmiddel.

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

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

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

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

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

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

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

\*Indeholder natriumazid som konserveringsmiddel.

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

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

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

Denne protokol er til oprensning af cirkulerende DNA og RNA fra 1-5 ml humant blodplasma og er optimeret til minimal brugerhåndtering og hurtig behandlingstid. Du kan se oplysninger om eksisterende brugervaliderede workflows ved brug af QIAamp DSP Circulating NA Kit version 1/R3 under "Klassisk protokol: Oprensning af cirkulerende nukleinsyrer fra 1-5 ml humant blodplasma" (side 34).

## Vigtige anvisninger før start

- Alle centrifugeringstrin udføres ved stuetemperatur (15-25 °C).
- Sluk for vakuumpumpen mellem de enkelte trin for at sikre, at der anvendes et ensartet, jævnt vakuum under protokoltrinnene.  
**Bemærk:** Trykket i Vacuum Pump skal være mellem -800 og -900 mbar.
- Lad prøverne få stuetemperatur.
- Brug PBS til at bringe mængden af prøven til det nærmeste nøjagtige volumen (1 til 5 ml).
- Opsæt QIAvac 24 Plus som beskrevet på side 21.
- Opvarm et vandbad eller en varmekub til 56 °C til anvendelse med 50 ml centrifugeringsrør i trin 3.
- Lad QIAamp Mini spin-kolonnerne stå i mindst 1 time ved stuetemperatur før brug.
- Sørg for, at Buffer ACB, Buffer ACW1 og Buffer ACW2 er klargjort (tilsætning af isopropanol eller ethanol) i henhold til vejledningen på side 26.
- Tilsæt carrier-RNA rekonstitueret i Buffer AVE til Buffer ACL i henhold til vejledningen i Tabel 3.

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

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

## Procedure: Breeze-protokol

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

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

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

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

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

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

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

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

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

7. Inkuber blandingen af lysat og Buffer ACB i røret i 5 (±1) minutter ved stuetemperatur.
8. Isæt QIAamp Mini-kolonnen i VacConnector på QIAvac 24 Plus (se "Opsætning af QIAvac 24 Plus vacuum manifold", side 21). Sæt en 20 ml kolonneforlænger i den åbne QIAamp Mini-kolonne.

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

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

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

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

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

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

10. Tilsæt 600 µl Buffer ACW1 i QIAamp Mini-kolonnen. Lad låget på kolonnen være åbent, og tænd vakuumpumpen. Når al Buffer ACW1 er trukket gennem QIAamp Mini-kolonnen, skal du slukke vakuumpumpen og frigive trykket til 0 mbar.
11. Tilsæt 750 µl Buffer ACW2 i QIAamp Mini-kolonnen. Lad låget på kolonnen være åbent, og tænd vakuumpumpen. Når al Buffer ACW2 er trukket gennem QIAamp Mini-kolonnen, skal du slukke vakuumpumpen og frigive trykket til 0 mbar.
12. Tilsæt 750 µl ethanol (96-100 %) i QIAamp Mini-kolonnen. Lad låget på kolonnen være åbent, og tænd vakuumpumpen. Når al ethanolen er trukket gennem spin-kolonnen, skal du slukke vakuumpumpen og frigive trykket til 0 mbar.
13. Luk låget på QIAamp Mini-kolonnen. Tag den ud af vakuummanifolden, og kassér VacConnector. Læg QIAamp Mini-kolonnen i et rent 2 ml vaskerør (fra trin 8), og centrifuger ved fuld hastighed (20.000 x g; 14.000 omdr./min.) i 3 (±0,5) minutter.
14. Anbring QIAamp Mini-kolonnen i et nyt 2 ml vaskerør. Åbn låget, og inkuber røret med kolonnen ved stuetemperatur i 3 minutter for at tørre membranen helt.



15. Anbring QIAamp Mini-kolonnen i et rent 1,5 ml elutionsrør, det 2 ml vaskerør fra trin 14. Tilsæt forsigtigt 20-150 µl Buffer AVE på midten af QIAamp Mini-kolonmembranen. Luk låget, og inkuber ved stuetemperatur i 3 ( $\pm 0,5$ ) minutter

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

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

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

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

**Bemærk:** Ved forventede lave nukleinsyreudbytter anbefales det at bruge et LoBind-rør til elution (medfølger ikke).

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

**Bemærk:** Vend lågene på elueringsrørene, så de peger i modsat retning af rotorens rotation (hvis rotoren f.eks. drejer med uret, vendes lågene mod uret).

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

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

## Vigtige anvisninger før start

- Alle centrifugeringstrin udføres ved stuetemperatur (15-25 °C).
- Sluk for vakuumpet mellem de enkelte trin for at sikre, at der anvendes et ensartet, jævnt vakuum under protokoltrinnene.  
**Bemærk:** Trykket i Vacuum Pump skal være mellem -800 og -900 mbar.
- Lad prøverne få stuetemperatur.
- Brug PBS til at bringe mængden af prøven til det nærmeste nøjagtige volumen (1 til 5 ml).
- Opsæt QIAvac 24 Plus som beskrevet på side 21.
- Opvarm et vandbad eller en varmeklok til 60 °C til anvendelse med 50 ml centrifugeringsrør i trin 3.
- Opvarm en varmeklok til 56 °C til anvendelse med 2 ml vaskerør i trin 14.
- Lad QIAamp Mini spin-kolonnerne stå i mindst 1 time ved stuetemperatur før brug.
- Sørg for, at Buffer ACB, Buffer ACW1 og Buffer ACW2 er klargjort (tilsætning af isopropanol eller ethanol) i henhold til vejledningen på side 26.
- Tilsæt carrier-RNA rekonstitueret i Buffer AVE til Buffer ACL i henhold til vejledningen i Tabel 4.

Tabel 4. Mængden af Buffer ACL og carrier-RNA (opløst i Buffer AVE), der kræves til behandling af prøver med 1-5 ml human blodplasma

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

## Procedure: Klassisk protokol

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

8. Isæt QIAamp Mini-kolonnen i VacConnector på QIAvac 24 Plus (se "Opsætning af QIAvac 24 Plus vacuum manifold", side 21). Sæt en 20 ml kolonneforlænger i den åbne QIAamp Mini-kolonne.

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

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

9. Tilsæt omhyggeligt lysatet fra trin 7 i den anvendte kolonneforlænger på QIAamp Mini-kolonnen. Tænd for vakuumpumpen, så der påføres et tryk på -800 til -900 mbar. Når alle lysater er trukket helt gennem kolonnerne, skal du slukke vakuumpumpen og frigive trykket til 0 mbar. Fjern og bortskaf omhyggeligt den brugte kolonneforlænger. Vær opmærksom på, at store prøvelysatmængder (ca. 18 ml, når man starter med en 5 ml prøve) kan kræve op til 20 minutter for at passere gennem QIAamp Mini-membranen ved vakuumkraft.

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

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

10. Tilsæt 600 µl Buffer ACW1 i QIAamp Mini-kolonnen. Lad låget på kolonnen være åbent, og tænd vakuumpumpen. Når al Buffer ACW1 er trukket gennem QIAamp Mini-kolonnen, skal du slukke vakuumpumpen og frigive trykket til 0 mbar.
11. Tilsæt 750 µl Buffer ACW2 i QIAamp Mini-kolonnen. Lad låget på kolonnen være åbent, og tænd vakuumpumpen. Når al Buffer ACW2 er trukket gennem QIAamp Mini-kolonnen, skal du slukke vakuumpumpen og frigive trykket til 0 mbar.
12. Tilsæt 750 µl ethanol (96-100 %) i QIAamp Mini-kolonnen. Lad låget på kolonnen være åbent, og tænd vakuumpumpen. Når al ethanolen er trukket gennem spin-kolonnen, skal du slukke vakuumpumpen og frigive trykket til 0 mbar.
13. Luk låget på QIAamp Mini-kolonnen. Tag den ud af vakuummanifolden og kassér VacConnector. Læg QIAamp Mini-kolonnen i et rent 2 ml vaskerør (fra trin 8), og centrifuger ved fuld hastighed (20.000 x g; 14.000 omdr./min.) i 3 (±0,5) minutter.

14. Anbring QIAamp Mini-kolonnen i et nyt 2 ml vaskerør. Åbn låget, og inkuber røret med kolonnen ved 56 °C ( $\pm 1$  °C) i 10 ( $\pm 1$ ) minutter for at tørre membranen helt.
15. Anbring QIAamp Mini-kolonnen i et rent 1,5 ml elutionsrør, det 2 ml vaskerør fra trin 13. Tilsæt forsigtigt 20-150  $\mu$ l Buffer AVE på midten af QIAamp Mini-kolonmembranen. Luk låget, og inkuber ved stuetemperatur i 3 ( $\pm 0,5$ ) minutter.

**Vigtigt:** Sørg for, at elutions-Buffer AVE bringes til stuetemperatur (15-25 °C). Hvis elution foretages i små mængder (<50  $\mu$ l), skal elueringsbufferen påføres på midten af membranen for at færdiggøre elution af bundne nukleinsyrer.

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

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

Det genvundne eluatvolumen kan være op til 5  $\mu$ l mindre end det elutionsvolumen, der blev tilsat på QIAamp Mini-kolonnen.

**Bemærk:** Ved forventede lave nukleinsyreudbytter anbefales det at bruge et LoBind-rør til elution (medfølger ikke).

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

Bemærk: Vend lågene på elueringsrørene, så de peger i modsat retning af rotorens rotation (hvis rotoren f.eks. drejer med uret, vendes lågene mod uret).

# Kvalitetskontrol

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

## Begrænsninger

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

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

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

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

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

# Ydelseskarakteristika

Du finder de relevante ydelseskarakteristika på fanen Resource(Ressourcer) på produktsiden på [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).



# Litteraturhenvisninger

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.

# Fejlfindingsvejledning

Denne fejlfindingsvejledning kan være nyttig til at afhjælpe eventuelle problemer. For yderligere information henvises også til siden med hyppigt stillede spørgsmål (Frequently Asked Questions, FAQ) hos vores tekniske supportcenter: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Derudover svarer personalet fra QIAGEN Teknisk Service gerne på spørgsmål vedrørende enten informationen og/eller protokollerne i denne håndbog eller prøve- og analyseteknologier (kontaktinformation: Besøg [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Kommentarer og forslag

### Lidt eller ingen nukleinsyre i eluatet

- |   |   |
|---|---|
| a) Brug af ikke-stabiliseret plasma                                       | Ikke-stabiliserede plasmaprøver kan føre til hurtigere DNA-nedbrydning. Vi anbefaler at følge CEN/TS 16835-3:2015. Gentag oprensningsproceduren med nye prøver.   |
| b) Længere tid mellem blodtapning og klargøring af plasma                 | Kerneholdige blodlegemer kan gå i opløsning og frigive genomisk DNA i plasmaet og derved fortynde målnukleinsyren.  |
| c) Prøver, der har været frosset og optøet mere end én gang               | Undgå gentagen optøning og nedfrysning, da dette kan resultere i forringelse af DNA. Brug altid friske prøver eller prøver, der kun har været optøet én gang.   |
| d) Lav koncentration af mål-DNA i prøverne                                | Plasmaprøverne har stået for længe ved stuetemperatur. Gentag oprensningsproceduren med nye prøver<br><b>Bemærk:</b> Nogle personer kan have en lav cellefri NA-koncentration i plasma, og her bør der vælges et større prøvevolumen og et lavt eluatvolumen. |
| e) Utilstrækkelig prøvelysis i Buffer ACL                                 | Hvis QIAGEN Proteinase K har været udsat for forhøjet temperatur i længere tid, kan det miste aktivitet. Gentag proceduren med nye prøver og frisk QIAGEN Proteinase K.   |
| f) Blandingen af Buffer ACL og carrier-RNA er ikke blandet tilstrækkeligt | Bland Buffer ACL med carrier-RNA ved at vende røret med Buffer ACL og carrier-RNA forsigtigt op og ned mindst 10 gange.   |
| g) Der er anvendt ethanol med procent frem for 96-100 %                   | Gentag oprensningsproceduren med nye prøver og 96-100 % ethanol. Der må ikke bruges denatureret alkohol, som indeholder andre stoffer, såsom metanol eller methylethylketon.  |
| h) Buffer ACB er klargjort forkert  | Kontrollér, at Buffer ACB-koncentratet blev rekonstitueret med den korrekte mængde isopropanol (ikke ethanol, se side 26).  |
| i) Buffer ACW1 eller Buffer ACW2 er klargjort forkert                     | Kontrollér, at Buffer ACW1- og Buffer ACW2-koncentraterne blev fortyndet med den rette mængde ethanol (se side 26). Gentag oprensningsproceduren med nye prøver.  |

## Kommentarer og forslag

- |    |   |   |
|----|---|---|
| j) | Buffer ACW1 eller Buffer ACW2 er klargjort med 70 % ethanol | Kontrollér, at Buffer ACW1- og Buffer ACW2-koncentraterne blev fortyndet med 96-100 % ethanol (se side 26). Gentag oprensingsproceduren med nye prøver. |
|----|---|---|

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

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

## Generel håndtering

- |    |                                    |   |
|----|------------------------------------|---|
| a) | QIAamp Mini-kolonnen er tilstoppet | Hvis flowhastigheden reduceres, kan det forlænge vakuumtiden. Alternativt skal du lukke VacValve, hvis den anvendes, og forsigtigt fjerne samlingen med kolonneforlænger, VacConnector og VacValve fra QIAamp Mini-kolonnen uden at miste noget af lysatet i kolonneforlængeren.<br><br>Tag QIAamp Mini-kolonnen ud fra vakuumanifolden, anbring den i et 2 ml vaskerør ,og centrifuger den på fuld hastighed, indtil prøven er passeret fuldstændigt gennem membranen. Udskift hele den kolonneforlænger–VacConnector–VacValve-enhed, der indeholder det resterende lysat. Tænd vakuumpumpen, åbn VacValve, og fortsæt isætning af det resterende lysat.<br><br>Gentag ovenstående procedure, hvis QIAamp Mini-kolonnen begynder at tilstoppe.<br><br>Der kan være dannet kryopræcipitater i plasmaet grundet gentagen nedfrysning og optøning. Disse kan blokere QIAamp Mini-kolonnen. Der må ikke anvendes plasma, som har været frosset og optøet mere end én gang.<br><br>Hvis der er synlige kryopræcipitater, skal prøven klares ved centrifugering i 5 minutter ved 16.000 x g. |
|----|------------------------------------|---|












## Kommentarer og forslag

---

- b) Variable elueringsmængder  
Forskellige prøver kan påvirke mængden af endeligt eluat. Det genvundne eluatvolumen kan være op til 5 µl mindre end dem elueringsmængde, der blev tilsat på QIAamp Mini-kolonnen.
- c) Vakuumtrykket på -800 til -900 mbar er ikke opnået  
Vakuumanifolden er ikke lukket stramt nok. Tryk ned på vakuumanifoldens låg, efter at vakuumet er slået til. Kontrollér, om vakuumtrykket er opnået.  
Pakning på QIAvac-låg er slidt op. Kontrollér pakningen på manifolden visuelt, og udskift den eventuelt.  
VacValves er slidt op. Fjern alle VacValves, og isæt VacConnectors direkte i luer-forlængerne. Sæt QIAamp Mini-kolonner i VacConnectors, luk låget på kolonnerne, og tilslut vakuum. Kontrollér, om vakuumtrykket er opnået. Udskift om nødvendigt VacValves.  
Forbindelsen til vakuumpumpen er utæt. Luk alle luer-forlængere med luer-hætter, og tænd vakuumpumpen. Kontrollér, om vakuumtrykket er stabilt, når pumpen er tændt (og ventilen på Vacuum Regulator er lukket). Udskift om nødvendigt forbindelserne mellem pumpe og vakuumanifold.  
Hvis vakuumtrykket stadig ikke er opnået, skal vakuumpumpen udskiftes med en kraftigere type.

# Symboler

Følgende symboler findes i brugsanvisningen på emballagen og etiketten:

Symbol	Symboldefinition
 $\Sigma$ <N>	Indeholder tilstrækkeligt med reagenser til <N>-reaktioner
	Holdbarhedsdato
	Dette produkt opfylder kravene i EU-direktivet 2017/746 for medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik.
	Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik
	Katalognummer
	Lotnummer
	Materialenummer (dvs. etiketten på komponenten)
	Komponenter
	Indeholder
	Antal
	Globalt handelsvarenummer

## Symbol

## Symboldefinition

Rn	R står for revision af brugsanvisningen, og n står for revisionsnummeret
	Temperaturbegrænsning
	Producent
	Læs brugsanvisningen
	Opbevares uden for sollys
	Advarsel/forsigtig
	Ved levering
	Åbnes ved levering; opbevar QIAamp Mini Spin-kolonner ved 2-8 °C
	Volumen
	Tilsætter

## Symbol

## Symboldefinition



Skriv dags dato ned efter tilsætning af ethanol i flasken

**EtOH**

Ethanol



Skriv dags dato ned efter tilsætning af isopropanol i flasken

**IPA**

Isopropanol

→

Fører til

**GITC**

Guanidin-thiocyanat

**GuHCl**

Guanidinhydrochlorid

**BRIJ 58**

BRIJ 58

**PROTK**

Proteinase K

**UDI**

Unikt enheds-id

# Bilag A: Anbefalinger for separation og opbevaring af blodplasma

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

For ikke-stabiliseret BCT anbefaler vi at følge ISO 20186-3:2019 Molecular in vitro diagnostic examinations — Specifications for pre-examination processes for venous whole blood — Part 3: Isolated circulating cell free DNA from plasma eller CEN/TS 17742 Molecular in vitro diagnostic examinations — Specifications for pre-examination processes for venous whole blood — Isolated circulating cell free RNA from plasma.

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

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

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



4. Aspireret plasma overføres til et rent centrifugeringsrør.
5. Centrifuger plasmaprøverne i 10 minutter ved 16.000 x g (i en rotor med fast vinkel) ved 4 °C.

Dette vil fjerne yderligere cellulære nukleinsyrer, der er bundet til cellerester.

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

**Valgfrit:** Overfør supernatanten til et nyt rør, og start derefter protokollen til ekstraktion af cirkulerende nukleinsyre.

# Bilag B: Generelle bemærkninger om håndtering af RNA

## Håndtering af RNA

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

## Generel håndtering

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

## Plastartikler engangsbrug

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

# Bestillingsinformation

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

\* Anvendes med vakuumprotokoller.

For opdateret licensinformation og produktspecifikke ansvarsfraskrivelser henvises til den aktuelle QIAGEN kit-håndbog eller -brugervejledning. Håndbøger og brugsvejledninger til QIAGEN-kits kan fås via [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) eller rekvireres hos QIAGEN Teknisk Service eller den lokale forhandler.

# Revisionshistorik for dokumentet

Revision	Beskrivelse
R1, juni 2022	Udgivelse af IVDR Kit, version 2, ingen ændringer af protokoller eller ydeevnedata i forhold til Kit-version 1; tilføjelse af "manuel" isolation under Tilsigtet brug; mindre opdateringer og rettelser

Denne side skal være tom

Denne side skal være tom

#### Aftale om begrænset licens til QIAamp DSP Circulating NA Kit

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

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

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

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

Jun-2022 HB-3049-001 | 1127632 © 2022 QIAGEN, alle rettigheder forbeholdes.

