

Οδηγίες χρήσης (Εγχειρίδιο) για το QIAamp[®] DSP Circulating NA Kit



50

Έκδοση 2



Για in vitro διαγνωστική χρήση



61504



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Γερμανία



1127632EL

Περιεχόμενα

Προβλεπόμενη χρήση	4
Προβλεπόμενος χρήστης	4
Περιγραφή και αρχή λειτουργίας.....	5
Όγκοι δειγμάτων.....	5
Λύση δειγμάτων	7
Προσρόφηση στη μεμβράνη της στήλης QIAamp Mini.....	7
Αφαίρεση υπολειμμάτων μολυσματικών ουσιών.....	7
Έκλυση καθαρών νουκλεϊκών οξέων	8
Απόδοση και μέγεθος των νουκλεϊκών οξέων	8
Περιγραφή των πρωτοκόλλων	9
Σύνοψη και επεξήγηση.....	9
Υλικά που παρέχονται	10
Περιεχόμενα του κιτ.....	10
Συστατικά του κιτ.....	11
Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται	12
Πρόσθετα αντιδραστήρια.....	12
Αναλώσιμα	12
Εξοπλισμός.....	13
Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις.....	14
Πληροφορίες ασφάλειας.....	14
Πληροφορίες σε περίπτωση έκτακτης ανάγκης.....	15
Προφυλάξεις.....	15

Απόρριψη.....	16
Αποθήκευση και χειρισμός αντιδραστηρίων	17
Σταθερότητα κατά τη χρήση.....	17
Φύλαξη και χειρισμός των δοκιμών	18
Διαδικασία	19
Παρασκευή των ρυθμιστικών διαλυμάτων και των αντιδραστηρίων	26
Πρωτόκολλο Breeze: Καθαρισμός κυκλοφορούντων νουκλεϊκών οξέων από 1–5 ml πλάσματος ανθρώπινου αίματος.....	29
Πρωτόκολλο Classic: Καθαρισμός των κυκλοφορούντων νουκλεϊκών οξέων από 1–5 ml πλάσματος ανθρώπινου αίματος.....	35
Έλεγχος ποιότητας.....	41
Περιορισμοί	41
Χαρακτηριστικά απόδοσης.....	42
Βιβλιογραφία	43
Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων.....	44
Σύμβολα	47
Παράρτημα Α: Σύσταση για διαχωρισμό και φύλαξη του πλάσματος αίματος.....	50
Παράρτημα Β: Γενικές υποδείξεις για τον χειρισμό του RNA.....	52
Πληροφορίες για τις παραγγελίες	53
Ιστορικό αναθεώρησης εγγράφου	54

Προβλεπόμενη χρήση

Το QIAamp DSP Circulating NA Kit είναι ένα σύστημα που χρησιμοποιεί τεχνολογία μεμβράνης πυριτίου (τεχνολογία QIAamp) για τη χειροκίνητη απομόνωση και τον καθαρισμό του ελεύθερου κυττάρων κυκλοφορούντος (ccf) DNA και RNA από δείγματα ανθρώπινου πλάσματος αίματος.

Το QIAamp DSP Circulating NA Kit προορίζεται για in vitro διαγνωστική χρήση.

Προβλεπόμενος χρήστης

Το προϊόν προορίζεται για χρήση από επαγγελματίες, όπως τεχνολόγους και ιατρούς, που έχουν εκπαιδευτεί σε τεχνικές μοριακής βιολογίας.

Περιγραφή και αρχή λειτουργίας

Η διαδικασία QIAamp DSP Circulating NA αποτελείται από 4 βήματα (λύση, δέσμευση, πλύση και έκλουση) και πραγματοποιείται με στήλες QIAamp Mini στο σύστημα QIAvac. Η αξιόπιστη διαδικασία βοηθά στην ελαχιστοποίηση της διασταυρούμενης επιμόλυνσης μεταξύ δειγμάτων και αυξάνει την ασφάλεια του χρήστη κατά το χειρισμό δυνητικά μολυσματικών δειγμάτων.

Η απλή διαδικασία είναι κατάλληλη για ταυτόχρονη επεξεργασία έως και 24 δειγμάτων σε λιγότερο από 2 ώρες.

Όγκοι δειγμάτων

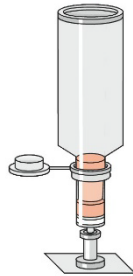
Οι στήλες QIAamp Mini δεσμεύουν θραύσματα νουκλεϊκών οξέων με μικρό μέγεθος έως 20 nt, ωστόσο η απόδοση εξαρτάται από τον όγκο του δείγματος και τη συγκέντρωση των κυκλοφορούντων νουκλεϊκών οξέων στο δείγμα (συνήθως 1–100 ng/ml στο πλάσμα). Η διαδικασία QIAamp DSP Circulating NA έχει βελτιστοποιηθεί για όγκους δειγμάτων έως και 5 ml.

**Διαδικασία QIAamp DSP
Circulating NA Kit**

Δείγμα

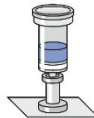


Λύση



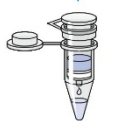
Δέσμευση

Κενό



Πλύση

Κενό



Έκλουση



Καθαρά νουκλεϊκά οξέα

Εικόνα 1. Επισκόπηση της διαδικασίας του QIAamp DSP Circulating NA Kit.

Λύση δειγμάτων

Τα ελεύθερα κυκλοφορούντα νουκλεϊκά οξέα των βιολογικών υγρών δεσμεύονται συνήθως σε πρωτεΐνες ή ενσωματώνονται σε κυστίδια, επομένως είναι αναγκαίο να εφαρμόζεται ένα αποτελεσματικό βήμα λύσης για την αποδέσμευση των νουκλεϊκών οξέων με σκοπό την επιλεκτική δέσμευση στη στήλη QIAamp Mini. Επομένως, τα δείγματα λύνονται υπό εξαιρετικά μετουσιωτικές συνθήκες σε υψηλές θερμοκρασίες παρουσία πρωτεΐνης K και ρυθμιστικού διαλύματος Buffer ACL, που διασφαλίζει την αδρανοποίηση των DNAσών και RNAσών και την αποδέσμευση των νουκλεϊκών οξέων από τις πρωτεΐνες, τα λιπίδια και τα κυστίδια στα οποία δεσμεύονται.

Προσρόφηση στη μεμβράνη της στήλης QIAamp Mini

Για να είναι δυνατή η βέλτιστη δέσμευση των κυκλοφορούντων νουκλεϊκών οξέων στη μεμβράνη, οι συνθήκες δέσμευσης προσαρμόζονται με την προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος Buffer ACB στο προϊόν της λύσης. Τα προϊόντα της λύσης μεταφέρονται κατόπιν σε μια στήλη QIAamp Mini και τα κυκλοφορούντα νουκλεϊκά οξέα προσροφώνται από έναν μεγάλο όγκο επάνω στη μεμβράνη πυριτίου καθώς το προϊόν λύσης αναρροφάται με πίεση κενού. Το άλας και οι συνθήκες pH διασφαλίζουν ότι η πλειοψηφία των πρωτεϊνών και των λοιπών μολυσματικών ουσιών, οι οποίες μπορούν να αναστείλουν την PCR και άλλες καθοδικές ενζυμικές αντιδράσεις, δεν κατακρατούνται στη μεμβράνη στήλης QIAamp Mini.

Με βάση το πρωτόκολλο απαιτείται μια πολλαπλή κενού (π.χ. το QIAvac 24 Plus με το σύστημα QIAvac Connecting System) και μια αντλία κενού που έχει δυνατότητα να παράγει κενό μεταξύ ~800–900 mbar (π.χ. QIAGEN® Vacuum Pump). Πρέπει να χρησιμοποιηθεί ένα ρυθμιστικό κενού Vacuum Regulator (μέρος του συστήματος QIAvac Connecting System) για την εύκολη παρατήρηση της πίεσης κενού και την πρακτική αποδέσμευση κενού.

Αφαίρεση υπολειμμάτων μολυσματικών ουσιών

Τα νουκλεϊκά οξέα παραμένουν δεσμευμένα στη μεμβράνη, ενώ οι μολυσματικές ουσίες εκπλένονται αποτελεσματικά σε 3 βήματα πλύσης.

Έκλυση καθαρών νουκλεϊκών οξέων

Η έκλυση πραγματοποιείται με το ρυθμιστικό διάλυμα Buffer AVE. Σε ένα μόνο βήμα, τα υψηλής καθαρότητας κυκλοφορούντα νουκλεϊκά οξέα εκλύονται σε ρυθμιστικό διάλυμα Buffer AVE, εφόσον έχουν περιέλθει σε θερμοκρασία δωματίου. Μπορεί να εφαρμοστεί προσαρμόσιμος όγκος έκλυσης 50–150 μl. Εάν απαιτούνται υψηλότερες συγκεντρώσεις νουκλεϊκών οξέων, ο όγκος έκλυσης μπορεί να μειωθεί έως και στα 20 μl. Όγκοι έκλυσης μικρότεροι από 50 μl έχουν ως αποτέλεσμα ιδιαίτερα συμπυκνωμένα εκλούσματα νουκλεϊκών οξέων, ωστόσο ενδέχεται να οδηγήσουν σε χαμηλότερη συνολική απόδοση.

Ο όγκος του ανακτηθέντος εκλούσματος μπορεί να υπολείπεται ακόμη και μέχρι 5 μl του όγκου του ρυθμιστικού διαλύματος έκλυσης που εφαρμόζεται στη στήλη.

Απόδοση και μέγεθος των νουκλεϊκών οξέων

Οι αποδόσεις των ελεύθερων κυκλοφορούντων νουκλεϊκών οξέων που απομονώνονται από βιολογικά δείγματα είναι συνήθως μικρότερες από 1 μg και επομένως είναι δύσκολο να προσδιοριστούν με το φασματοφωτόμετρο. Η απόλυτη απόδοση του κυκλοφορούντος DNA και RNA που έχει ληφθεί από ένα δείγμα με το QIAamp DSP Circulating NA Kit διαφέρει μεταξύ δειγμάτων που προέρχονται από διαφορετικά άτομα, ενώ εξαρτάται και από επιπλέον παράγοντες (π.χ. από το στάδιο ορισμένων παθήσεων). Επίσης, ο φορέας RNA που εμφανίζεται στα εκχυλισμένα νουκλεϊκά οξέα ενδέχεται να κυριαρχεί σε μετρήσεις απορροφησιμότητας UV (βλ. σελίδα 27). Για τον καθορισμό των αποδόσεων συνιστάται η χρήση μεθόδων ποσοτικής ενίσχυσης.

Η κατανομή μεγέθους των κυκλοφορούντων νουκλεϊκών οξέων που υποβάλλονται σε καθαρισμό με το QIAamp DSP circulating NA Kit μπορεί να ελεγχθεί με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης ή με υβριδισμό σε ανιχνευτή επισημασμένο ειδικά για κάθε στόχο (1) ή σε διάλυμα μικρορρευστονικής ηλεκτροφόρησης (π.χ. σε αναλυτή, Agilent® Bioanalyzer).

Περιγραφή των πρωτοκόλλων

Σε αυτό το εγχειρίδιο παρέχονται δύο διαφορετικά πρωτόκολλα.

- Το «Πρωτόκολλο Breeze: Καθαρισμός κυκλοφορούντων νουκλεϊκών οξέων από 1–5 ml πλάσματος ανθρώπινου αίματος» (σελίδα 29) προορίζεται για επεξεργασία πλάσματος έως και 5 ml σε βήματα του 1 ml και έχει βελτιστοποιηθεί για περιορισμένη παρέμβαση του χειριστή και σύντομο χρόνο λήψης αποτελεσμάτων.
- Το «Πρωτόκολλο Classic: Καθαρισμός των κυκλοφορούντων νουκλεϊκών οξέων από 1–5 ml πλάσματος ανθρώπινου αίματος» (σελίδα 35) προορίζεται για επεξεργασία πλάσματος έως και 5 ml σε βήματα του 1 ml και αποτελεί το αμετάβλητο πρωτόκολλο της έκδοσης 1, αναθεώρηση 3 (R3), του *Εγχειριδίου για το QIAamp DSP Circulating NA Kit*.

Σύνοψη και επεξήγηση

Τα ελεύθερα κυκλοφορούντα νουκλεϊκά οξέα εμφανίζονται στο ανθρώπινο πλάσμα ως μικρά θραύσματα, <1000 bp (DNA), <1000 nt (RNA) ή θραύσματα μεγέθους έως και 20 nt (miRNA). Η συγκέντρωση των ελεύθερων κυκλοφορούντων νουκλεϊκών οξέων στο πλάσμα του ανθρώπινου αίματος είναι συνήθως χαμηλή και ποικίλλει σημαντικά από άτομο σε άτομο σε ένα εύρος μεταξύ 1–100 ng/ml στα ανθρώπινα δείγματα (2–6).

Το QIAamp DSP Circulating NA Kit επιτρέπει τον αποτελεσματικό καθαρισμό των κυκλοφορούντων νουκλεϊκών οξέων από το ανθρώπινο πλάσμα. Τα δείγματα μπορούν να είναι φρέσκα ή κατεψυγμένα. Τα σωληνάρια επέκτασης και η επεξεργασία κενού στο QIAvac 24 Plus επιτρέπουν αρχικούς όγκους δείγματος έως και 5 ml ενώ οι προσαρμοσσιμοι όγκοι έκλουσης μεταξύ 20 και 150 μl επιτρέπουν τη συγκέντρωση ειδών νουκλεϊκών οξέων που εμφανίζονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις.

Το εκλουσμένο ελεύθερο κυκλοφορούν γονιδιωματικό DNA ή RNA είναι έτοιμο προς χρήση σε καθοδικές εφαρμογές ή κατάλληλο για φύλαξη. Ο χρήστης πρέπει να βελτιστοποιεί τον όγκο εισαγωγής πλάσματος και τον όγκο έκλουσης του ειδικού στόχου τους, καθώς και τις καθοδικές (downstream) εφαρμογές στο εργαστήριό τους.

Υλικά που παρέχονται

Περιεχόμενα του kit

QIAamp DSP Circulating NA Kit	(50)
Αρ. καταλόγου	61504
Αριθμός παρασκευών	50

	Αναγνωριστικό	Σύμβολα	Ποσότητα
QIAamp Mini	QIAamp Mini columns with Wash Tubes (Στήλες QIAamp Mini με σωληνάρια πλύσης) (WT) (2 ml)	COL	50
EXT	Column Extenders (Επεκτάσεις στήλης) (20 ml)	COL EXT	2 x 25
WT	Wash Tubes (Σωληνάρια πλύσης) (2 ml)	WASH TUBE	50
ET	Elution Tubes (Σωληνάρια έκλουσης) (1,5 ml)	ELU TUBE	50
VC	VacConnectors (Σύνδεσμοι VacConnector)	VAC CON	50
ACL*	Lysis Buffer (Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης)*	LYS BUF	220 ml
ACB*	Binding Buffer (Ρυθμιστικό διάλυμα δέσμευσης)* (συμπυκνωμένο διάλυμα)	BIND BUF CONC	300 ml
ACW1*	Wash Buffer 1 (Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης 1)* (συμπυκνωμένο διάλυμα)	WASH BUF 1 CONC	19 ml
ACW2†	Wash Buffer 2 (Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης 2)† (συμπυκνωμένο διάλυμα)	WASH BUF 2 CONC	13 ml
AVE†	Elution Buffer (Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης)† (μοβ πώματα)	ELU BUF	5 x 2 ml
PROTK	QIAGEN Proteinase K (QIAGEN Πρωτεΐνωση K)	PROTK	4 x 7 ml
Carrier	Carrier RNA (Φορέας RNA) (κόκκινα πώματα)	CAR RNA	310 µg
QIAamp Mini	QIAamp Mini columns with Wash Tubes (Στήλες QIAamp Mini με σωληνάρια πλύσης) (WT) (2 ml)	COL	50
	Εγχειρίδιο	H B	1

* Περιέχει χροτοπικό άλας. Βλ. σελίδα 14 για Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις.

† Περιέχει αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό.

Συστατικά του ΚΙΤ

Τα κυριότερα συστατικά του ΚΙΤ περιγράφονται παρακάτω.

Πίνακας 1. Ενεργά συστατικά στα παρεχόμενα αντιδραστήρια

Αντιδραστήριο		Ενεργό συστατικό	Συγκέντρωση
Σύμβολο	Όνομα		
ACL	Lysis Buffer (Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης)	Θειοκυανική γουανιδίνη	≥30 έως <50% w/w
ACB	Binding Buffer (Ρυθμιστικό διάλυμα δέσμησης) (συμπυκνωμένο διάλυμα)	Θειοκυανική γουανιδίνη	≥30 έως <50% w/w
ACW1	Wash Buffer 1 (Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης 1) (συμπυκνωμένο διάλυμα)	Υδροχλωρική γουανιδίνη	≥30 έως <60% w/w
ACW2	Wash Buffer 2 (Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης 2) (συμπυκνωμένο διάλυμα)	Κανένα	–
AVE	Elution Buffer (Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης) (μοβ πώματα)	Κανένα	–
PROTK	QIAGEN Proteinase K (QIAGEN Πρωτεϊνάση Κ)	Πρωτεϊνάση Κ	≥1 έως <3% w/w
Carrier	Carrier RNA (Φορέας RNA) (κόκκινα πώματα)	Κανένα	–

Μάρτυρες και βαθμονομητές

Για την ελαχιστοποίηση του κινδύνου αρνητικής επίδρασης στα διαγνωστικά αποτελέσματα που παρέχονται μετά την απομόνωση νουκλεϊκών οξέων, πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλοι μάρτυρες για καθοδικές εφαρμογές.

Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

Πρόσθετα αντιδραστήρια

- Αιθανόλη (96–100%)*
- Ισοπροπανόλη (100%)
- Θρυμματισμένος πάγος (μόνο για το «Πρωτόκολλο Classic: Καθαρισμός των κυκλοφορούντων νουκλεϊκών οξέων από 1–5 ml πλάσματος ανθρώπινου αίματος»).
- Ορισμένα δείγματα ενδέχεται να χρειάζονται αραίωση με φυσιολογικό ορό στον οποίο έχει προστεθεί ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (phosphate-buffered saline, PBS)

Αναλώσιμα

- Πιπέτες (ρυθμιζόμενες)
- Αποστειρωμένα ρύγχη πιπετών (συνιστώνται ρύγχη πιπετών με φραγμό αερολύματος, τα οποία βοηθούν στην πρόληψη τυχόν διασταυρούμενης επιμόλυνσης)
- Μικροσωληνάρια 1,5 ή 2 ml ελεύθερα νουκλεασών
- Σωληνάρια φυγόκεντρου των 50 ml

* Μη χρησιμοποιείτε μετουσιωμένη αλκοόλη που περιέχει άλλες ουσίες, όπως μεθανόλη ή μεθυλαιθυλοκετόνη.

Εξοπλισμός

- Υδατόλουτρο ή θερμαντικό μπλοκ με δυνατότητα διατήρησης σωληναρίων φυγοκέντρησης των 50 ml σε θερμοκρασία 56°C ή 60°C.*
- Θερμαντικό μπλοκ ή παρόμοια συσκευή σε θερμοκρασία 56°C που έχει δυνατότητα συγκράτησης σωληναρίων πλύσης των 2 ml (μόνο για το πρωτόκολλο Classic)*
- Αναδευτήρας
- Μικροφυγόκεντρος (με στροφέα για σωληνάκια των 2 ml)*
- QIAvac 24 Plus vacuum manifold (αρ. κατ. 19413)
- QIAvac Connecting System (αρ. κατ. 19419) ή αντίστοιχο σύστημα
- Vacuum Pump [αρ. κατ. 84010 (Η.Π.Α. και Καναδάς), 84000 (Ιαπωνία) ή 84020 (υπόλοιπος κόσμος)] ή αντίστοιχη αντλία που έχει δυνατότητα παραγωγής κενού -800 έως -900 mbar
- Προαιρετικά: VacValves (αρ. κατ. 19408)

* Βεβαιωθείτε ότι τα όργανα έχουν ελεγχθεί και βαθμονομηθεί σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.

Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

Λάβετε υπόψη ότι ενδέχεται να χρειαστεί να ανατρέξετε στους τοπικούς κανονισμούς για την αναφορά σοβαρών συμβάντων που σχετίζονται με το προϊόν στον κατασκευαστή και στη ρυθμιστική αρχή στην οποία υπάγεται ο χρήστης ή/και ο ασθενής.

Για in vitro διαγνωστική χρήση

Πληροφορίες ασφάλειας

Κατά την εργασία με χημικές ουσίες, φοράτε πάντα κατάλληλη προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφάλειας (safety data sheets, SDS). Διατίθενται στο διαδίκτυο σε εύχρηστη και συμπιεσμένη μορφή PDF, στη διεύθυνση www.qiagen.com/safety, όπου μπορείτε να βρείτε, να προβάλετε και να εκτυπώσετε τα δελτία SDS για κάθε kit και συστατικό των kit της QIAGEN.

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ Κίνδυνος ατομικού τραυματισμού



ΜΗΝ προσθέτετε λευκαντικά ή όξινα διαλύματα απευθείας στα απόβλητα παρασκευής δειγμάτων.

Το ρυθμιστικά διαλύματα Buffer ACL, Buffer ACB και Buffer ACW1 περιέχουν άλατα γουανιδίνης, τα οποία μπορούν να σχηματίσουν ιδιαίτερα αντιδραστικές ενώσεις εάν συνδυαστούν με λευκαντικές ουσίες.

Εάν χυθεί υγρό που περιέχει αυτά τα ρυθμιστικά διαλύματα, καθαρίστε με κατάλληλο απορρυπαντικό εργαστηρίου και νερό. Εάν το υγρό που χύθηκε περιέχει δυνητικά μολυσματικούς παράγοντες, καθαρίστε αρχικά την περιοχή που λερώθηκε με απορρυπαντικό εργαστηρίου και νερό και κατόπιν με υποχλωριώδες νάτριο συγκέντρωσης 1% (v/v).

- Τα δοκίμια και τα δείγματα είναι δυνητικώς μολυσματικά. Τα απόβλητα των δειγμάτων και των προσδιορισμών πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τις τοπικές διαδικασίες ασφαλείας.

Πληροφορίες σε περίπτωση έκτακτης ανάγκης

CHEMTREC

ΗΠΑ και Καναδάς 1-800-424-9300

Εκτός ΗΠΑ και Καναδά +1 703-527-3887

Προφυλάξεις

Οι ακόλουθες δηλώσεις κινδύνου και προφύλαξης ισχύουν για τα συστατικά του QIAamp DSP Circulating NA Kit.

Buffer ACB



Περιέχει: θειοκυανική γουανιδίνη. Κίνδυνος! Επιβλαβές σε περίπτωση κατάποσης. Μπορεί να είναι επιβλαβές σε επαφή με το δέρμα ή σε περίπτωση εισπνοής. Προκαλεί σοβαρά δερματικά εγκαύματα και οφθαλμικές βλάβες. Επιβλαβές για τους υδρόβιους οργανισμούς, με μακροχρόνιες επιπτώσεις. Σε επαφή με οξέα ελευθερώνονται πολύ τοξικά αέρια. Φοράτε προστατευτικά γάντια/προστατευτικά ενδύματα/μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια /το πρόσωπο. ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΑ ΜΑΤΙΑ: Ξεπλύνετε προσεκτικά με νερό για αρκετά λεπτά. Εάν υπάρχουν φακοί επαφής, αφαιρέστε τους, εφόσον είναι εύκολο. Συνεχίστε να ξεπλένετε. Καλέστε αμέσως το ΚΕΝΤΡΟ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ ή έναν γιατρό.

Buffer ACL



Περιέχει: θειοκυανική γουανιδίνη. Κίνδυνος! Επιβλαβές σε περίπτωση κατάποσης. Μπορεί να είναι επιβλαβές σε επαφή με το δέρμα ή σε περίπτωση εισπνοής. Προκαλεί σοβαρά δερματικά εγκαύματα και οφθαλμικές βλάβες. Επιβλαβές για τους υδρόβιους οργανισμούς, με μακροχρόνιες επιπτώσεις. Σε επαφή με οξέα ελευθερώνονται πολύ τοξικά αέρια. Φοράτε προστατευτικά γάντια/προστατευτικά ενδύματα/μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια /το πρόσωπο. ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΑ ΜΑΤΙΑ: Ξεπλύνετε προσεκτικά με νερό για αρκετά λεπτά. Εάν υπάρχουν φακοί επαφής, αφαιρέστε τους, εφόσον είναι εύκολο. Συνεχίστε να ξεπλένετε. Καλέστε αμέσως το ΚΕΝΤΡΟ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ ή έναν γιατρό.

Buffer ACW1



Περιέχει: υδροχλωρική γουανιδίνη. Προειδοποίηση! Επιβλαβές σε περίπτωση κατάποσης ή εισπνοής. Προκαλεί ερεθισμό του δέρματος. Προκαλεί σοβαρό ερεθισμό των ματιών. Φοράτε προστατευτικά γάντια/προστατευτικά ενδύματα/μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια /το πρόσωπο. Βγάλτε τα μολυσμένα ρούχα και πλύντε τα πριν τα επαναχρησιμοποιήσετε. Απορρίψτε το περιεχόμενο/τον περιέκτη σε εγκεκριμένη μονάδα διάθεσης αποβλήτων.

Proteinase K



Περιέχει: Πρωτεϊνάση Κ. Κίνδυνος! Προκαλεί ήπιο ερεθισμό του δέρματος. Μπορεί να προκαλέσει αλλεργία ή συμπτώματα άσθματος ή δύσπνοια σε περίπτωση εισπνοής. Αποφεύγετε να αναπνέετε σκόνη/αναθυμιάσεις/αέρια/σταγονίδια/ατμούς/εκνεφώματα. Φοράτε προστατευτικά γάντια/προστατευτικά ενδύματα/μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια /το πρόσωπο. Να φοράτε μέσα ατομικής προστασίας της αναπνοής. Σε περίπτωση έκθεσης ή πιθανότητας έκθεσης: Καλέστε το ΚΕΝΤΡΟ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ ή έναν γιατρό. Απομακρύνετε το άτομο σε σημείο με καθαρό αέρα και τοποθετήστε το ώστε να διευκολύνεται η αναπνοή. Απορρίψτε το περιεχόμενο/τον περιέκτη σε εγκεκριμένη μονάδα διάθεσης αποβλήτων.

Απόρριψη

Τα απόβλητα περιλαμβάνουν δείγματα και αντιδραστήρια. Αυτά μπορεί να περιέχουν τοξικό ή μολυσματικό υλικό και πρέπει να απορρίπτονται σωστά. Ανατρέξτε στους τοπικούς σας κανονισμούς ασφάλειας για τις κατάλληλες διαδικασίες απόρριψης.

Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφάλειας (Safety Data Sheets, SDS). Αυτά τα δελτία είναι διαθέσιμα online σε μορφή PDF στη διεύθυνση www.qiagen.com/safety όπου μπορείτε να βρείτε να προβάλετε και να εκτυπώσετε τα δελτία SDS για κάθε kit και συστατικά των kit της QIAGEN.

Αποθήκευση και χειρισμός αντιδραστηρίων

Οι στήλες QIAamp Mini πρέπει να φυλάσσονται σε στεγνό χώρο σε θερμοκρασία 2–8°C. Όλα τα ρυθμιστικά διαλύματα πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C). Οι στήλες QIAamp Mini και τα ρυθμιστικά διαλύματα μπορούν να φυλάσσονται σε αυτές τις συνθήκες έως την ημερομηνία λήξης στο κουτί του kit χωρίς να δείχνουν κάποια υποβάθμιση της απόδοσης.

Ο λυοφιλοποιημένος φορέας RNA πρέπει να φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C) έως την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στο κουτί του kit. Ο φορέας RNA θα πρέπει να διαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα Buffer AVE. Ο διαλυμένος φορέας RNA θα πρέπει να προστίθεται αμέσως σε ρυθμιστικό διάλυμα Buffer ACL, όπως περιγράφεται στη σελίδα 30 για το πρωτόκολλο Breeze και στη σελίδα 36 για το πρωτόκολλο Classic. Αυτό το διάλυμα πρέπει να παρασκευάζεται φρέσκο. Οι μη χρησιμοποιημένες ποσότητες του φορέα RNA που έχει διαλυθεί σε ρυθμιστικό διάλυμα Buffer AVE θα πρέπει να καταψύχονται σε κλάσματα σε θερμοκρασία από –30°C έως –15°C.

Το QIAamp DSP Circulating NA Kit περιέχει ένα έτοιμο προς χρήση διάλυμα πρωτεΐνωσης K, το οποίο διαλύεται σε ένα ειδικά διαμορφωμένο ρυθμιστικό διάλυμα φύλαξης. Η πρωτεΐνωση K παραμένει σταθερή έως την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα του συστατικού όταν αυτό φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C).

Σταθερότητα κατά τη χρήση

Το kit μπορεί να χρησιμοποιηθεί για 12 μήνες μετά την πρώτη χρήση ή έως την ημερομηνία λήξης, όποιο συμβεί πρώτο.

Φύλαξη και χειρισμός των δοκιμίων

Φύλαξη και χειρισμός του αίματος

Για να αποτραπεί η υποβάθμιση των ελεύθερων κυττάρων νουκλεϊκών οξέων και η αποδέσμευση κυτταρικών νουκλεϊκών οξέων, συνιστάται φύλαξη του ολικού αίματος έως και για 6 ώρες το πολύ σε θερμοκρασία 2–8°C (π.χ. δείγματα EDTA). Εάν χρησιμοποιούνται σταθεροποιημένα σωληνάρια συλλογής αίματος, ελέγξτε τις συνθήκες φύλαξης που παρέχονται από τον κατασκευαστή. Συνιστάται η επαλήθευση αυτών των συνθηκών φύλαξης σε συνδυασμό με την ειδική καθοδική εφαρμογή και τον στόχο σας.

Φύλαξη και χειρισμός του πλάσματος

Συνιστάται να πραγματοποιείτε τον διαχωρισμό του πλάσματος και την απομόνωση των νουκλεϊκών οξέων αμέσως μετά τη δωρεά αίματος όταν χρησιμοποιείται EDTA ως αντιπηκτικό, ειδικά για το RNA. Όταν το πλάσμα φυλάσσεται για μικρότερο χρονικό διάστημα, μπορεί να αποθηκευτεί έως και για 24 ώρες σε θερμοκρασία 2–8°C.

Για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα φύλαξης, κλάσματα πλάσματος από σταθεροποιημένα και μη σταθεροποιημένα σωληνάρια συλλογής αίματος μπορούν να φυλαχθούν σε θερμοκρασία –20°C ή –80°C για έως 12 μήνες (μόνο για DNA ως στόχο) ή σε θερμοκρασία –80°C για 4 εβδομάδες (RNA ως στόχος).

Φύλαξη εκλουσμένων νουκλεϊκών οξέων

Τα εκλουσμένα νουκλεϊκά οξέα συλλέγονται σε σωληνάρια έκλουσης του 1,5 ml (παρέχονται). Τα κεκαθαρμένα κυκλοφορούντα νουκλεϊκά οξέα μπορούν να φυλάσσονται έως και για 24 ώρες σε θερμοκρασία 2–8°C. Για διαστήματα φύλαξης άνω των 24 ωρών, συνιστάται φύλαξη σε θερμοκρασία –30°C έως –15°C για το DNA και σε θερμοκρασία –90°C έως –60°C για καθοδικές εφαρμογές RNA.

Διαδικασία

Σημαντικές υποδείξεις πριν από την έναρξη

To QIAvac 24 Plus

Το QIAvac 24 Plus έχει σχεδιαστεί για γρήγορη και αποτελεσματική επεξεργασία κενού σε έως και 24 στήλες διαχωρισμού QIAGEN ταυτόχρονα. Τα δείγματα και τα διαλύματα πλύσης αναρροφώνται διαμέσου των μεμβρανών στήλης με πίεση κενού αντί για φυγοκέντρωση, παρέχοντας υψηλότερη ταχύτητα και περιορισμένη παρέμβαση από την πλευρά του χειριστή στις διαδικασίες καθαρισμού.

Σε συνδυασμό με το QIAvac Connecting System, το QIAvac 24 Plus μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως σύστημα συνεχούς ροής. Η συνεχής ροή του δείγματος συλλέγεται σε μια ξεχωριστή φιάλη αποβλήτων.

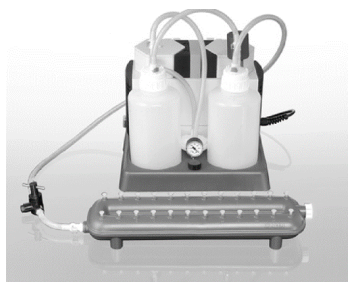
Για τη συντήρηση του QIAvac 24 Plus, ανατρέξτε στις οδηγίες χειρισμού στο *Εγχειρίδιο του QIAvac 24 Plus*.

Επεξεργασία των στηλών QIAamp Mini στο QIAvac 24 Plus

Οι στήλες QIAamp Mini υποβάλλονται σε επεξεργασία στο QIAvac 24 Plus με αναλώσιμα VacConnectors και επαναχρησιμοποιούμενα VacValves. Τα VacValves (προαιρετικά) εισάγονται απευθείας στις υποδοχές τύπου luer της πολλαπλής QIAvac 24 Plus και διασφαλίζουν έναν σταθερό ρυθμό ροής, διευκολύνοντας την ταυτόχρονη επεξεργασία δειγμάτων με διαφορετικούς όγκους. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται εάν οι ρυθμοί ροής των δειγμάτων διαφέρουν σημαντικά προκειμένου να διασφαλίζεται ένα σταθερό κενό. Τα VacConnectors είναι αναλώσιμοι σύνδεσμοι που εφαρμόζουν μεταξύ των στηλών QIAamp Mini και των VacValves ή μεταξύ των στηλών QIAamp Mini και των υποδοχών τύπου luer του QIAvac 24 Plus. Αποτρέπουν την άμεση επαφή μεταξύ της στήλης διαχωρισμού και του VacValve στη διάρκεια του καθαρισμού, αποφεύγοντας έτσι οποιαδήποτε διασταυρούμενη επιμόλυνση μεταξύ των δειγμάτων. Τα VacConnectors απορρίπτονται ύστερα από κάθε χρήση. Εξαιτίας των υψηλών όγκων διαλύματος που χρησιμοποιούνται, το QIAvac Connecting System (ή σύστημα παρόμοιας ρύθμισης με φιάλες αποβλήτων) είναι αναγκαίο (βλ. εικόνα 2).

Οδηγίες χειρισμού για το QIAvac 24 Plus

- Το QIAvac 24 Plus πρέπει να τοποθετείται πάντοτε σε επιφάνεια ενός ασφαλούς πάγκου ή ενός χώρου εργασίας. Εάν πέσει κάτω, η πολλαπλή QIAvac 24 Plus μπορεί να ραγίσει.
- Το QIAvac 24 Plus πρέπει να φυλάσσεται πάντοτε καθαρό και στεγνό. Για τις διαδικασίες καθαρισμού, ανατρέξτε στο *Εγχειρίδιο του QIAvac 24 Plus*.
- Τα εξαρτήματα του QIAvac 24 Plus δεν είναι ανθεκτικά σε ορισμένους διαλύτες (Πίνακας 2). Εάν αυτοί οι διαλύτες εκχυθούν πάνω στη μονάδα, καθαρίστε σχολαστικά με νερό.
- Για να διασφαλίσετε μια σταθερή απόδοση, μην τοποθετείτε γράσο σιλικόνης ή συσκευών κενού σε κανένα εξάρτημα της πολλαπλής QIAvac 24 Plus.
- Προσέχετε πάντοτε και φοράτε γυαλιά ασφαλείας όταν εργάζεστε κοντά σε πολλαπλές κενού υπό πίεση.
- Επικοινωνήστε με την Τεχνική Υπηρεσία της QIAGEN ή τον διανομέα της περιοχής σας για πληροφορίες σχετικά με τα ανταλλακτικά.
- Η πίεση κενού είναι η διαφορά πίεσης ανάμεσα στο εσωτερικό της πολλαπλής κενού και την ατμόσφαιρα (τυπική ατμοσφαιρική πίεση 1013 millibar ή 760 mm Hg) και μπορεί να μετρηθεί με το QIAvac Connecting System (βλ. Εικόνα 2). Σύμφωνα με τα πρωτόκολλα μια αντλία κενού πρέπει να μπορεί να παράγει κενό από -800 έως -900 mbar (π.χ. η αντλία QIAGEN Vacuum Pump). Οι υψηλότερες πιέσεις κενού πρέπει να αποφεύγονται. Η χρήση πιέσεων κενού κάτω από τις συνιστώμενες τιμές μπορεί να μειώσει την απόδοση και την καθαρότητα νουκλεϊκών οξέων και να αυξήσει τον κίνδυνο απόφραξης των μεμβρανών.



Εικόνα 2. QIAvac 24 Plus, QIAvac Connecting System και Vacuum Pump.

Πίνακας 2. Ιδιότητες χημικής αντοχής του QIAvac 24 Plus

Ανθεκτικό σε		Μη ανθεκτικό σε
Οξικό οξύ	Χαστροπικά άλατα	Βενζόλιο
Χρωμικό οξύ	Συμπυκνωμένες αλκοόλες	Φαινόλη
SDS	Χλωριούχο νάτριο	Χλωροφόρμιο
Tween™ 20	Ουρία	Τολουόλιο
Λευκαντικό χλώριο	Υδροχλωρικό οξύ	Αιθέρες
Υδροξείδιο του νατρίου		

Ρύθμιση του QIAvac 24 Plus vacuum manifold

1. Συνδέστε το QIAvac 24 Plus σε μια πηγή κενού. Εάν χρησιμοποιείτε το QIAvac Connecting System, συνδέστε το σύστημα στην πολλαπλή και στην πηγή κενού, όπως περιγράφεται στο Παράρτημα Α του *Εγχειριδίου QIAvac 24 Plus*.
2. Τοποθετήστε ένα VacValve (προαιρετικό) σε κάθε υποδοχή τύπου luer του QIAvac 24 Plus που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί (βλ. Εικόνα 3). Κλείστε τις υποδοχές τύπου luer που δεν χρησιμοποιείτε με βύσματα luer ή κλείστε το τοποθετημένο VacValve. Τα VacValves πρέπει να χρησιμοποιούνται, εάν οι ρυθμοί ροής των δειγμάτων διαφέρουν σημαντικά ώστε να διασφαλίζεται η σταθερότητα του κενού.
3. Τοποθετήστε ένα VacConnector σε κάθε VacValve (βλ. Εικόνα 3).
Πραγματοποιήστε αυτό το βήμα αμέσως πριν από την έναρξη του καθαρισμού για να αποφύγετε την έκθεση των VacConnectors σε πιθανές μολυσματικές ουσίες που περιέχονται στον αέρα.
4. Τοποθετήστε τις στήλες QIAamp Mini στα VacConnectors πάνω στην πολλαπλή (βλ. Εικόνα 3).
Σημείωση: Φυλάξτε το σωληνάριο πλύσης από τη συσκευασία blister για χρήση στο πρωτόκολλο καθαρισμού.
5. Τοποθετήστε μια επέκταση στήλης (20 ml) σε κάθε στήλη QIAamp Mini (βλ. Εικόνα 3).
Σημείωση: Βεβαιωθείτε ότι η επέκταση στήλης έχει εφαρμόσει καλά μέσα στη στήλη QIAamp Mini ώστε να αποφύγετε τη διαρροή του δείγματος.

6. Για τον καθαρισμό των νουκλεϊκών οξέων, ακολουθήστε τις οδηγίες των πρωτοκόλλων. Απορρίψτε τα VacConnectors κατάλληλα μετά τη χρήση.

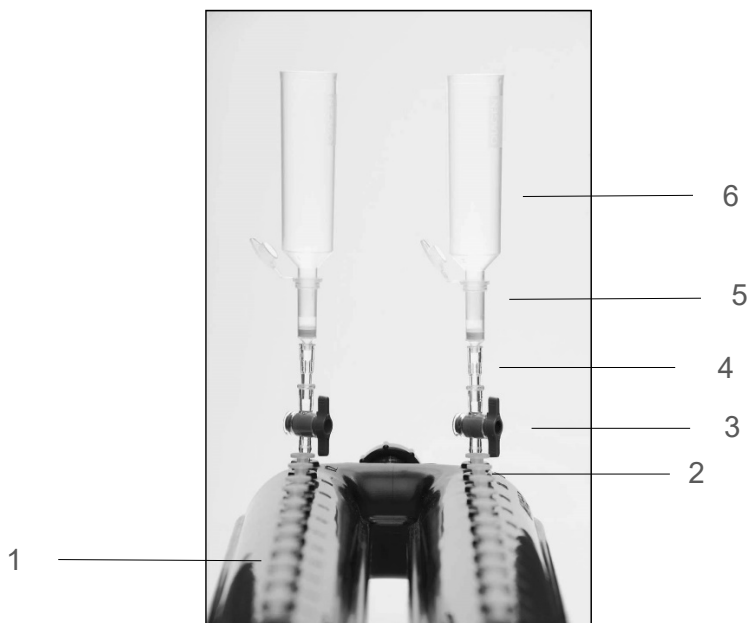
Αφήστε το καπάκι της στήλης QIAamp Mini ανοιχτό ενώ εφαρμόζετε το κενό.

Απενεργοποιήστε την παροχή κενού μεταξύ των βημάτων για να διασφαλίσετε ότι εφαρμόζεται σταθερό, ομοιόμορφο κενό στη διάρκεια της επεξεργασίας. Για ταχύτερη αποδέσμευση του κενού, πρέπει να χρησιμοποιείται ένα ρυθμιστικό κενού Vacuum Regulator (τμήμα του συστήματος QIAvac Connecting System).

Σημείωση: Κάθε VacValve μπορεί να κλείσει μεμονωμένα όταν το δείγμα έχει ληφθεί πλήρως διαμέσου της στήλης διαχωρισμού, επιτρέποντας την ταυτόχρονη επεξεργασία των δειγμάτων με διαφορετικό όγκο ή ιξώδες.

7. Μετά την επεξεργασία των δειγμάτων, καθαρίζετε το QIAvac 24 Plus (βλ. «Καθαρισμός και απολύμανση του QIAvac 24 Plus» στο *Εγχειρίδιο QIAvac 24 Plus*).

Σημείωση: Τα ρυθμιστικά διαλύματα ACL, ACB και ACW1 δεν είναι συμβατά με απολυμαντικούς παράγοντες που περιέχουν χλώριο. Βλ. σελίδα 14 για Προειδοποιήσεις και Προφυλάξεις.

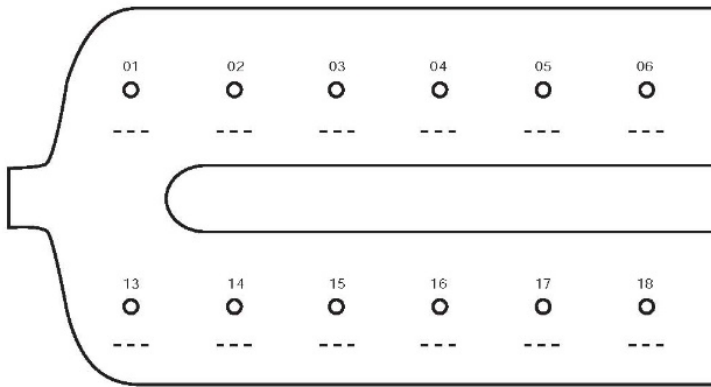


Εικόνα 3. Ρύθμιση του QIAvac 24 Plus με στήλες QIAamp Mini με χρήση VacValves, VacConnectors και επεκτάσεις στήλης.

- | | | | |
|---|---|---|-------------------|
| 1 | QIAvac 24 Plus vacuum manifold | 4 | VacConnector |
| 2 | Υποδοχή τύπου luer του QIAvac 24 Plus (κλειστή με βύσμα τύπου luer) | 5 | Στήλη QIAamp Mini |
| 3 | VacValve* | 6 | Επέκταση στήλης |

Συνιστάται η επισήμανση των σωληναρίων και των στηλών QIAamp Mini για χρήση στο σύστημα κενού QIAvac 24 Plus σύμφωνα με τη μέθοδο που παρουσιάζεται στην Εικόνα 4 για την αποφυγή της ανάμειξης των δειγμάτων. Μπορεί να βγάλετε αυτήν την εικόνα μια φωτοτυπία και να την επισημάνετε με τα ονόματα των δειγμάτων.

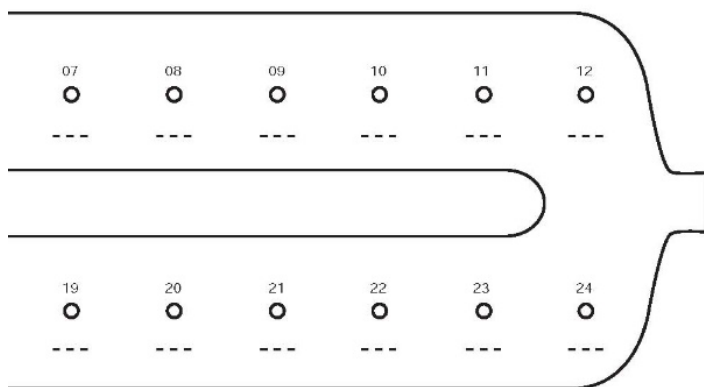
* Πρέπει να αγοράσετε τον εξοπλισμό ξεχωριστά.



Ημερομηνία: _____

Χειριστής: _____

Αναγνωριστικό εκτέλεσης: _____



Εικόνα 4. Μέθοδος επισήμανσης των σωληναρίων και των στηλών QIAamp Mini για χρήση στο σύστημα κενού QIAvac 24 Plus.

Παρασκευή των ρυθμιστικών διαλυμάτων και των αντιδραστηρίων

Ρυθμιστικό διάλυμα Buffer ACB

Πριν από τη χρήση, προσθέστε 200 ml ισοπροπανόλης (100%) σε 300 ml συμπυκνωμένου ρυθμιστικού διαλύματος Buffer ACB ώστε να ληφθούν 500 ml Buffer ACB. Αναμείξτε καλά αφού προσθέσετε ισοπροπανόλη.

Ρυθμιστικό διάλυμα Buffer ACW1*

Πριν από τη χρήση, προσθέστε 25 ml αιθανόλης (96–100%) σε 19 ml συμπυκνωμένου ρυθμιστικού διαλύματος Buffer ACW1 ώστε να ληφθούν 44 ml Buffer ACW1. Αναμείξτε καλά αφού προσθέσετε αιθανόλη.

Ρυθμιστικό διάλυμα Buffer ACW2†

Πριν από τη χρήση, προσθέστε 30 ml αιθανόλης (96–100%) σε 13 ml συμπυκνωμένου ρυθμιστικού διαλύματος Buffer ACW2 ώστε να ληφθούν 43 ml Buffer ACW2. Αναμείξτε καλά αφού προσθέσετε αιθανόλη.

Προσθήκη φορέα RNA σε ρυθμιστικό διάλυμα Buffer ACL*

Ο φορέας RNA εξυπηρετεί 2 σκοπούς: κατά πρώτον, ενισχύει τη δέσμευση νουκλεϊκών οξέων στη μεμβράνη QIAamp Mini, ιδιαίτερα στην περίπτωση που υπάρχει πολύ χαμηλός αριθμός μορίων-στόχων στο δείγμα. Κατά δεύτερον, η προσθήκη μεγάλων ποσοτήτων φορέα RNA μειώνει το ενδεχόμενο υποβάθμισης του RNA στη σπάνια περίπτωση που μόρια RNάσης διαφύγουν της μετουσίωσης από τα χαστροπικά άλατα και τα απορρυπαντικά που υπάρχουν στο ρυθμιστικό διάλυμα Buffer ACL.

* Περιέχει χαστροπικό άλας. Βλ. σελίδα 14 για Warnings and Precautions.

† Περιέχει αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό.

Η ποσότητα του παρεχόμενου λυοφιλοποιημένου φορέα RNA είναι αρκετή για τον όγκο του ρυθμιστικού διαλύματος Buffer ACL που παρέχεται στο kit. Η συνιστώμενη συγκέντρωση φορέα RNA έχει προσαρμοστεί έτσι ώστε το πρωτόκολλο QIAamp DSP Circulating NA να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως γενικό σύστημα καθαρισμού, συμβατό με πολλά διαφορετικά συστήματα ενίσχυσης και κατάλληλο για μια ευρεία γκάμα στόχων RNA και DNA.

Τα διάφορα συστήματα ενίσχυσης διαφέρουν ως προς την αποτελεσματικότητα ανάλογα με τη συνολική ποσότητα νουκλεϊκών οξέων που υπάρχουν στην αντίδραση. Τα εκλούσματα από αυτό το kit περιέχουν τόσο κυκλοφορούντα νουκλεϊκά οξέα όσο και φορέα RNA. Η ποσότητα του φορέα RNA θα είναι κατά πολύ υψηλότερη από εκείνη των κυκλοφορούντων νουκλεϊκών οξέων στις περισσότερες περιπτώσεις. Επομένως, η ποσοτικοποίηση των μεμονωμένων κυκλοφορούντων νουκλεϊκών οξέων με μέτρηση απορροφησιμότητας UV δεν θα είναι επαρκής, καθώς τα αποτελέσματα από αυτές τις μετρήσεις προσδιορίζονται από την παρουσία του φορέα RNA.

Για να επιτευχθεί το υψηλότερο επίπεδο ευαισθησίας σε αντιδράσεις ενίσχυσης, θα χρειαστεί ενδεχομένως να μειωθεί η ποσότητα του φορέα RNA που προστίθεται στο ρυθμιστικό διάλυμα Buffer ACL.

Για συστήματα ενίσχυσης που περιλαμβάνουν εκκινητές oligo dT, δεν πρέπει να προστίθεται φορέας RNA κατά την απομόνωση των ελεύθερων κυκλοφορούντων νουκλεϊκών οξέων.

Προσθέστε 1550 μl ρυθμιστικού διαλύματος Buffer AVE* στο σωληνάριο που περιέχει 310 μg λυοφιλοποιημένου φορέα RNA ώστε να δημιουργηθεί διάλυμα με συγκέντρωση 0,2 μg/μl. Διαλύστε σχολαστικά τον φορέα RNA, καταναίμετέ τον σε κλάσματα εύχρηστου μεγέθους και φυλάξτε τον σε θερμοκρασία από -30°C έως -15°C . Μην καταψύχετε-αποψύχετε επανειλημμένα τα κλάσματα του φορέα RNA.

*Περιέχει αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό.

Σημειώστε ότι ο φορέας RNA δεν διαλύεται στο ρυθμιστικό διάλυμα Buffer ACL. Πρέπει προηγουμένως να διαλυθεί σε ρυθμιστικό διάλυμα Buffer AVE και κατόπιν να προστεθεί στο ρυθμιστικό διάλυμα Buffer ACL.

Υπολογίστε τον όγκο του μείγματος ρυθμιστικού διαλύματος Buffer ACL–φορέα RNA που απαιτείται ανά παρτίδα δειγμάτων σύμφωνα με τους πίνακες των πρωτοκόλλων. Επιλέξτε τον αριθμό των δειγμάτων που θα υποβληθούν ταυτόχρονα σε επεξεργασία.

Αναμείξτε ήπια αναποδογυρίζοντας το σωληνάριο ή τη φιάλη 10 φορές. Για να αποφύγετε τον αφρισμό, μη στροβιλίζετε.

Σημείωση: Η διαδικασία παρασκευής των δειγμάτων έχει βελτιστοποιηθεί για μέγιστο όριο 1,0 μg φορέα RNA ανά δείγμα. Εάν έχει φανεί πως μικρότερη ποσότητα φορέα RNA είναι καλύτερη για το σύστημα ενίσχυσης του εργαστηρίου σας, μεταφέρετε μόνο την απαιτούμενη ποσότητα του διαλυμένου φορέα RNA στα σωληνάκια που περιέχουν ρυθμιστικό διάλυμα Buffer ACL. Για κάθε μικρογραμμάριο φορέα RNA που απαιτείται ανά παρασκευή, προσθέστε 5 μl διαλυμένου φορέα RNA στο ρυθμιστικό διάλυμα Buffer ACL. (Η χρήση ποσότητας φορέα RNA μικρότερης από 1,0 μg ανά δείγμα μπορεί να είναι ωφέλιμη και πρέπει να επικυρώνεται για κάθε ειδικό τύπο δείγματος και κάθε καθοδικό προσδιορισμό).

Πρωτόκολλο Breeze: Καθαρισμός κυκλοφορούντων νουκλεϊκών οξέων από 1–5 ml πλάσματος ανθρώπινου αίματος

Αυτό το πρωτόκολλο προορίζεται για τον καθαρισμό κυκλοφορούντος DNA και RNA από 1–5 ml πλάσματος του ανθρώπινου αίματος και έχει βελτιστοποιηθεί για περιορισμένη παρέμβαση του χειριστή και χαμηλό χρόνο λήψης αποτελεσμάτων. Για υπάρχουσες ροές εργασιών επικυρωμένες από το χρήστη με χρήση του QIAamp DSP Circulating NA Kit έκδοση 1/R3, ανατρέξτε στο «Πρωτόκολλο Classic: Καθαρισμός των κυκλοφορούντων νουκλεϊκών οξέων από 1–5 ml πλάσματος ανθρώπινου αίματος» (σελίδα 35).

Σημαντικές υποδείξεις πριν από την έναρξη

- Όλα τα βήματα φυγοκέντρησης θα πρέπει να εκτελούνται σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C).
- Απενεργοποιήστε το κενό μεταξύ των βημάτων για να διασφαλίσετε ότι εφαρμόζεται σταθερό, ομοιόμορφο κενό στη διάρκεια των βημάτων του πρωτοκόλλου.
Σημείωση: Η πίεση της αντλίας κενού πρέπει να κυμαίνεται από –800 έως –900 mbar.
- Τα δείγματα πρέπει να περιέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου.
- Χρησιμοποιήστε το PBS για να φέρετε τον όγκο του δείγματος στον πλησιέστερο ακριβή όγκο (1 έως 5 ml).
- Ρυθμίστε το QIAvac 24 Plus όπως περιγράφεται στη σελίδα 21.
- Θερμάνετε ένα λουτρό ύδατος ή ένα θερμαντικό μπλοκ έως τους 56°C για να χρησιμοποιηθεί σε σωληνάρια φυγόκεντρου των 50 ml στο βήμα 3.
- Αφήστε τις στήλες διαχωρισμού QIAamp Mini για 1 ώρα τουλάχιστον έως ότου περιέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση.
- Βεβαιωθείτε πως το ρυθμιστικό διάλυμα Buffer ACB, το ρυθμιστικό διάλυμα Buffer ACW1 και το ρυθμιστικό διάλυμα Buffer ACW2 έχουν παρασκευαστεί (με προσθήκη ισοπροπανόλης ή αιθανόλης) σύμφωνα με τις οδηγίες στη σελίδα 26.
- Προσθέστε τον φορέα RNA που έχει ανασυσταθεί σε ρυθμιστικό διάλυμα Buffer AVE στο ρυθμιστικό διάλυμα Buffer ACL σύμφωνα με τις οδηγίες του Πίνακα 3.

Πίνακας 3. Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος Buffer ACL και φορέα RNA (διαλυμένου σε ρυθμιστικό διάλυμα Buffer AVE) που απαιτείται για την επεξεργασία δειγμάτων 1–5 ml πλάσματος ανθρώπινου αίματος

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

Διαδικασία: Πρωτόκολλο Breeze

1. Μεταφέρετε με πιπέτα QIAGEN Proteinase K, πλάσμα και ρυθμιστικό διάλυμα Buffer ACL **με αυτήν τη σειρά** σε σωληνάριο φυγόκεντρου των 50 ml (δεν παρέχεται).

Ρύθμιση	A	B	Γ	Δ	E
ProtK (μl)	100	200	300	400	500
Πλάσμα (ml)	1	2	3	4	5
ACL (ml)	0,8	1,6	2,4	3,2	4

2. Κλείστε το πώμα και αναμείξτε με παλμική ανάδευση σε αναδευτήρα vortex για 5 x 2 δευτ.

Βεβαιωθείτε ότι σχηματίζεται εμφανής στρόβιλος μέσα στο σωληνάριο. Ουσιώδους σημασίας για τη διασφάλιση αποτελεσματικής λύσης είναι η σχολαστική ανάμιξη του δείγματος και του ρυθμιστικού διαλύματος Buffer ACL, ώστε να δημιουργηθεί ομοιογενές διάλυμα.

Σημείωση: Μη διακόψετε τη διαδικασία σε αυτό το σημείο. Προχωρήστε αμέσως στο βήμα 3 για να ξεκινήσετε την επώαση λύσης.

3. Επωάστε σε θερμοκρασία 56°C (±1°C) για 15 (±1) λεπτά.
4. Επιστρέψτε το σωληνάριο στον πάγκο του εργαστηρίου και ξεβιδώστε το πώμα.
5. Προσθέστε ρυθμιστικό διάλυμα Buffer ACB στο προϊόν λύσης μέσα στο σωληνάριο. Επιλέξτε τον όγκο σύμφωνα με τη ρύθμιση από το βήμα 1.

Ρύθμιση	A	B	Γ	Δ	E
ACB (ml)	1,8	3,6	5,4	7,2	9

6. Κλείστε το πώμα και αναμείξτε σχολαστικά με παλμική ανάδευση σε αναδευτήρα vortex για 5 x 2 δευτ.

Βεβαιωθείτε ότι σχηματίζεται εμφανής στρόβιλος μέσα στο σωληνάριο. Ουσιώδους σημασίας για τη διασφάλιση αποτελεσματικής λύσης είναι η σχολαστική ανάμιξη του προϊόντος λύσης και του ρυθμιστικού διαλύματος Buffer ACB, ώστε να δημιουργηθεί ομοιογενές διάλυμα.

7. Επωάστε το μείγμα του προϊόντος λύσης με το ρυθμιστικό διάλυμα Buffer ACB στο σωληνάριο για 5 (\pm 1) λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Εισαγάγετε τη στήλη QIAamp Mini μέσα στον σύνδεσμο VacConnector στο QIAvac 24 Plus (βλ. «Ρύθμιση του QIAvac 24 Plus vacuum manifold», σελίδα 21). Εισαγάγετε μια επέκταση στήλης 20 ml μέσα στην ανοιχτή στήλη QIAamp Mini.

Βεβαιωθείτε ότι η επέκταση στήλης έχει εφαρμόσει σταθερά μέσα στη στήλη QIAamp Mini ώστε να αποφευχθεί η διαρροή του δείγματος.

Σημείωση: Φυλάξτε το σωληνάριο πλύσης για την ξηρή φυγοκέντριση στο βήμα 13.

9. Εφαρμόστε προσεκτικά το προϊόν λύσης από το βήμα 7 μέσα στην επέκταση στήλης της στήλης QIAamp Mini. Ενεργοποιήστε την αντλία κενού. Όταν όλα τα προϊόντα λύσης έχουν ληφθεί πλήρως διαμέσου των στηλών, απενεργοποιήστε την αντλία κενού και εκτονώστε την πίεση μέχρι να φτάσει τα 0 mbar. Αφαιρέστε προσεκτικά και απορρίψτε την επέκταση στήλης.

Πρέπει να σημειωθεί ότι όταν οι όγκοι των προϊόντων λύσης των δειγμάτων είναι μεγάλοι (περίπου 18 ml όταν ξεκινάτε από δείγμα των 5 ml), μπορεί να χρειαστούν έως και 20 λεπτά για να διέλθουν τη μεμβράνη QIAamp Mini με την επίδραση του κενού.

Για γρήγορη και σταθερή εκτόνωση της πίεσης κενού, πρέπει να χρησιμοποιείται το Vacuum Regulator (τμήμα του συστήματος QIAvac Connecting System).

Σημείωση: Για να αποφύγετε τυχόν διασταυρούμενη επιμόλυνση, προσέχετε να μην βρίσκονται πολύ κοντά οι στήλες QIAamp Mini όταν αφαιρούνται οι επεκτάσεις στήλης.

10. Τοποθετήστε 600 ml ρυθμιστικού διαλύματος Buffer ACW1 στη στήλη QIAamp Mini. Αφήστε το καπάκι της στήλης ανοιχτό και ενεργοποιήστε την αντλία κενού. Αφού ληφθεί όλο το ρυθμιστικό διάλυμα Buffer ACW1 διαμέσου της στήλης QIAamp Mini, απενεργοποιήστε την αντλία κενού και εκτονώστε την πίεση μέχρι να φτάσει τα 0 mbar.
11. Τοποθετήστε 750 ml ρυθμιστικού διαλύματος Buffer ACW2 στη στήλη QIAamp Mini. Αφήστε το καπάκι της στήλης ανοιχτό και ενεργοποιήστε την αντλία κενού. Αφού ληφθεί όλο το ρυθμιστικό διάλυμα Buffer ACW2 διαμέσου της στήλης QIAamp Mini, απενεργοποιήστε την αντλία κενού και εκτονώστε την πίεση μέχρι να φτάσει τα 0 mbar.

12. Τοποθετήστε 750 μl αιθανόλης (96–100%) στη στήλη QIAamp Mini. Αφήστε το καπάκι της στήλης ανοιχτό και ενεργοποιήστε την αντλία κενού. Αφού ληφθεί όλη η αιθανόλη διαμέσου της στήλης διαχωρισμού, απενεργοποιήστε την αντλία κενού και εκτονώστε την πίεση μέχρι να φτάσει τα 0 mbar.
13. Κλείστε το καπάκι της στήλης QIAamp Mini. Αφαιρέστε το VacConnector από την πολλαπλή κενού και απορρίψτε το. Τοποθετήστε τη στήλη QIAamp Mini σε ένα καθαρό σωληνάριο πλύσης των 2 ml (από το βήμα 8) και φυγοκεντρίστε σε πλήρη ταχύτητα (20.000 x g, 14.000 rpm) για 3 (±0,5) λεπτά.
14. Τοποθετήστε τη στήλη QIAamp Mini σε ένα νέο σωληνάριο πλύσης των 2 ml. Ανοίξτε το καπάκι και επώαστε τη διάταξη σε θερμοκρασία δωματίου για 3 λεπτά για να στεγνώσει εντελώς η μεμβράνη.
15. Τοποθετήστε τη στήλη QIAamp Mini σε ένα καθαρό σωληνάριο έκλουσης 1,5 ml (παρέχεται) και απορρίψτε το σωληνάριο πλύσης των 2 ml από το βήμα 14. Εφαρμόστε προσεκτικά 20–150 μl ρυθμιστικού διαλύματος Buffer AVE στο κέντρο της μεμβράνης της στήλης QIAamp Mini. Κλείστε το καπάκι και επώαστε σε θερμοκρασία δωματίου για 3 (±0,5) λεπτά.

Σημαντικό: Βεβαιωθείτε πως το ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης Buffer AVE έχει περιέλθει σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C). Εάν η έκλουση γίνεται σε μικρούς όγκους (<50 μl), το ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης πρέπει να διανεμηθεί στο κέντρο της μεμβράνης για πλήρη έκλουση των δεσμευμένων νουκλεϊκών οξέων.

Ο όγκος έκλουσης είναι προσαρμόσιμος και μπορεί να ρυθμιστεί ανάλογα με τις απαιτήσεις των καθοδικών εφαρμογών.

Η έκλουση με μικρότερους όγκους ρυθμιστικού διαλύματος Buffer AVE οδηγεί σε υψηλότερες συγκεντρώσεις νουκλεϊκών οξέων, ωστόσο μπορεί να οδηγήσει σε χαμηλότερη συνολική απόδοση.

Ο ανακτηθείς όγκος εκλούσματος μπορεί να είναι έως 5 μl μικρότερος από τον όγκο έκλουσης που έχει εφαρμοστεί στη μεμβράνη της στήλης QIAamp Mini.

Σημείωση: Για αναμενόμενες χαμηλές αποδόσεις νουκλεϊκών οξέων, συνιστάται η χρήση ενός σωληναρίου χαμηλής δέσμευσης για την έκλουση (δεν παρέχεται).

16. Φυγοκεντρίστε σε μικροφυγόκεντρο σε πλήρη ταχύτητα (20.000 x g, 14.0000 rpm) για 1 λεπτό για να εκλούσετε τα νουκλεϊκά οξέα.

Σημείωση: Στρέψτε τα καπάκια των σωληνάρων έκλουσης προς κατεύθυνση αντίθετη από την κατεύθυνση περιστροφής του ρότορα (π.χ. εάν ο ρότορας περιστρέφεται προς τα δεξιά, στρέψτε τα καπάκια προς τα αριστερά).

Πρωτόκολλο Classic: Καθαρισμός των κυκλοφορούντων νουκλεϊκών οξέων από 1–5 ml πλάσματος ανθρώπινου αίματος

Αυτό το πρωτόκολλο αποτελεί το αμετάβλητο πρωτόκολλο της Αναθεώρησης 3 (R3) του *Εγχειριδίου του QIAamp DSP Circulating NA Kit* για χρήση, για παράδειγμα, με τις υπάρχουσες εγκεκριμένες από τον χρήστη ροές εργασιών για 1–5 ml ανθρώπινου πλάσματος.

Σημαντικές υποδείξεις πριν από την έναρξη

- Όλα τα βήματα φυγοκέντρησης θα πρέπει να εκτελούνται σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C).
- Απενεργοποιήστε το κενό μεταξύ των βημάτων για να διασφαλίσετε ότι εφαρμόζεται σταθερό, ομοιόμορφο κενό στη διάρκεια των βημάτων του πρωτοκόλλου.
Σημείωση: Η πίεση της αντλίας κενού πρέπει να κυμαίνεται από –800 έως –900 mbar.
- Τα δείγματα πρέπει να περιέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου.
- Χρησιμοποιήστε το PBS για να φέρετε τον όγκο του δείγματος στον πλησιέστερο ακριβή όγκο (1 έως 5 ml).
- Ρυθμίστε το QIAvac 24 Plus όπως περιγράφεται στη σελίδα 21.
- Θερμάνετε ένα λουτρό ύδατος ή ένα θερμομαντικό μπλοκ έως τους 60°C για να χρησιμοποιηθεί σε σωληνάρια φυγόκεντρου των 50 ml στο βήμα 3.
- Θερμάνετε ένα θερμομαντικό μπλοκ έως τους 56°C για να το χρησιμοποιήσετε με σωληνάρια πλύσης των 2 ml στο βήμα 14.
- Αφήστε τις στήλες διαχωρισμού QIAamp Mini να περιέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 1 ώρα πριν από τη χρήση.
- Βεβαιωθείτε πως το ρυθμιστικό διάλυμα Buffer ACB, το ρυθμιστικό διάλυμα Buffer ACW1 και το ρυθμιστικό διάλυμα Buffer ACW2 έχουν παρασκευαστεί (με προσθήκη ισοπροπανόλης ή αιθανόλης) σύμφωνα με τις οδηγίες στη σελίδα 26.
- Προσθέστε τον φορέα RNA που έχει ανασυσταθεί σε ρυθμιστικό διάλυμα Buffer AVE στο ρυθμιστικό διάλυμα Buffer ACL σύμφωνα με τις οδηγίες του Πίνακα 4.

Πίνακας 4. Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος Buffer ACL και φορέα RNA (διαλυμένου σε ρυθμιστικό διάλυμα Buffer AVE) που απαιτείται για την επεξεργασία δειγμάτων 1–5 ml πλάσματος ανθρώπινου αίματος

Ρύθμιση για ml πλάσματος	A	B	Γ	Δ	E	
	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	
Αριθμός δειγμάτων	Buffer ACL (ml)					Φορέας RNA σε ρυθμιστικό διάλυμα 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

Διαδικασία: Πρωτόκολλο Classic

1. Μεταφέρετε με πιπέτα QIAGEN Proteinase K, πλάσμα και ρυθμιστικό διάλυμα Buffer ACL, με αυτήν τη σειρά, σε σωληνάριο φυγόκεντρου των 50 ml (δεν παρέχεται).

Ρύθμιση	A	B	Γ	Δ	E
ProtK (μl)	100	200	300	400	500
Πλάσμα (ml)	1	2	3	4	5
ACL (ml)	0,8	1,6	2,4	3,2	4

2. Κλείστε το πώμα και αναμίξτε με παλμική ανάδευση σε αναδευτήρα vortex για 30 δευτ.

Βεβαιωθείτε ότι σχηματίζεται εμφανής στρόβιλος μέσα στο σωληνάριο. Ουσιώδους σημασίας για τη διασφάλιση αποτελεσματικής λύσης είναι η σχολαστική ανάμιξη του δείγματος και του ρυθμιστικού διαλύματος Buffer ACL, ώστε να δημιουργηθεί ομοιογενές διάλυμα.

Σημείωση: Μη διακόψετε τη διαδικασία σε αυτό το σημείο. Προχωρήστε αμέσως στο βήμα 3 για να ξεκινήσετε την επώαση λύσης.

3. Επωάστε σε θερμοκρασία 60°C (±1°C) για 30 (±2) λεπτά.
4. Επιστρέψτε το σωληνάριο στον πάγκο του εργαστηρίου και ξεβιδώστε το πώμα.
5. Προσθέστε ρυθμιστικό διάλυμα Buffer ACB στο προϊόν λύσης μέσα στο σωληνάριο. Επιλέξτε τον όγκο σύμφωνα με τη ρύθμιση από το βήμα 1.

Ρύθμιση	A	B	Γ	Δ	E
ACB (ml)	1,8	3,6	5,4	7,2	9

6. Κλείστε το πώμα και αναμείξτε σχολαστικά με παλμική ανάδευση σε αναδευτήρα vortex για 30 δευτ.

Βεβαιωθείτε ότι σχηματίζεται εμφανής στρόβιλος μέσα στο σωληνάριο. Ουσιώδους σημασίας για τη διασφάλιση αποτελεσματικής λύσης είναι η σχολαστική ανάμιξη του προϊόντος λύσης και του ρυθμιστικού διαλύματος Buffer ACB, ώστε να δημιουργηθεί ομοιογενές διάλυμα.

7. Επωάστε το μείγμα προϊόντος λύσης και ρυθμιστικού διαλύματος Buffer ACB στο σωληνάριο για 5 (\pm 1) λεπτά σε πάγο.

8. Εισαγάγετε τη στήλη QIAamp Mini μέσα στον σύνδεσμο VacConnector στο QIAvac 24 Plus (βλ. «Ρύθμιση του QIAvac 24 Plus vacuum manifold», σελίδα 21). Εισαγάγετε μια επέκταση στήλης 20 ml μέσα στην ανοιχτή στήλη QIAamp Mini.

Βεβαιωθείτε ότι η επέκταση στήλης έχει εφαρμόσει σταθερά μέσα στη στήλη QIAamp Mini ώστε να αποφευχθεί η διαρροή του δείγματος.

Σημείωση: Φυλάξτε το σωληνάριο πλύσης για την ξηρή φυγοκέντριση στο βήμα 13.

9. Εφαρμόστε προσεκτικά το προϊόν λύσης από το βήμα 7 μέσα στην επέκταση στήλης της στήλης QIAamp Mini. Ενεργοποιήστε την αντλία κενού ασκώντας πίεση από -800 έως -900 mbar. Όταν όλα τα προϊόντα λύσης έχουν ληφθεί πλήρως διαμέσου των στηλών, απενεργοποιήστε την αντλία κενού και εκτονώστε την πίεση μέχρι να φτάσει τα 0 mbar. Αφαιρέστε προσεκτικά και απορρίψτε την επέκταση στήλης.

Πρέπει να σημειωθεί ότι όταν οι όγκοι των προϊόντων λύσης των δειγμάτων είναι μεγάλοι (περίπου 18 ml όταν ξεκινάτε από δείγμα των 5 ml), μπορεί να χρειαστούν έως και 20 λεπτά για να διέλθουν τη μεμβράνη QIAamp Mini με την επίδραση του κενού.

Για γρήγορη και σταθερή εκτόνωση της πίεσης κενού, πρέπει να χρησιμοποιείται το Vacuum Regulator (τμήμα του συστήματος QIAvac Connecting System).

Σημείωση: Για να αποφύγετε τυχόν διασταυρούμενη επιμόλυνση, προσέχετε να μην βρίσκονται πολύ κοντά οι στήλες QIAamp Mini όταν αφαιρούνται οι επεκτάσεις στήλης.

10. Τοποθετήστε 600 ml ρυθμιστικού διαλύματος Buffer ACW1 στη στήλη QIAamp Mini. Αφήστε το καπάκι της στήλης ανοιχτό και ενεργοποιήστε την αντλία κενού. Αφού ληφθεί όλο το ρυθμιστικό διάλυμα Buffer ACW1 διαμέσου της στήλης QIAamp Mini, απενεργοποιήστε την αντλία κενού και εκτονώστε την πίεση μέχρι να φτάσει τα 0 mbar.

11. Τοποθετήστε 750 ml ρυθμιστικού διαλύματος Buffer ACW2 στη στήλη QIAamp Mini. Αφήστε το καπάκι της στήλης ανοιχτό και ενεργοποιήστε την αντλία κενού. Αφού ληφθεί όλο το ρυθμιστικό διάλυμα Buffer ACW2 διαμέσου της στήλης QIAamp Mini, απενεργοποιήστε την αντλία κενού και εκτονώστε την πίεση μέχρι να φτάσει τα 0 mbar.

12. Τοποθετήστε 750 μl αιθανόλης (96–100%) στη στήλη QIAamp Mini. Αφήστε το καπάκι της στήλης ανοιχτό και ενεργοποιήστε την αντλία κενού. Αφού ληφθεί όλη η αιθανόλη διαμέσου της στήλης διαχωρισμού, απενεργοποιήστε την αντλία κενού και εκτονώστε την πίεση μέχρι να φτάσει τα 0 mbar.
13. Κλείστε το καπάκι της στήλης QIAamp Mini. Αφαιρέστε το VacConnector από την πολλαπλή κενού και απορρίψτε το. Τοποθετήστε τη στήλη QIAamp Mini σε ένα καθαρό σωληνάριο πλύσης των 2 ml (από το βήμα 8) και φυγοκεντρίστε σε πλήρη ταχύτητα (20.000 x g, 14.000 rpm) για 3 (±0,5) λεπτά.
14. Τοποθετήστε τη στήλη QIAamp Mini σε ένα νέο σωληνάριο πλύσης των 2 ml. Ανοίξτε το καπάκι και επώαστε τη διάταξη σε θερμοκρασία 56°C (±1°C) για 10 (±1) λεπτά ώστε η μεμβράνη να στεγνώσει εντελώς.
15. Τοποθετήστε τη στήλη QIAamp Mini σε ένα καθαρό σωληνάριο έκλουσης 1,5 ml (παρέχεται) και απορρίψτε το σωληνάριο πλύσης των 2 ml από το βήμα 13. Εφαρμόστε προσεκτικά 20–150 μl ρυθμιστικού διαλύματος Buffer AVE στο κέντρο της μεμβράνης της στήλης QIAamp Mini. Κλείστε το καπάκι και επώαστε σε θερμοκρασία δωματίου για 3 (±0,5) λεπτά.

Σημαντικό: Βεβαιωθείτε πως το ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης Buffer AVE έχει περιέλθει σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C). Εάν η έκλουση γίνεται σε μικρούς όγκους (<50 μl), το ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης πρέπει να διανεμηθεί στο κέντρο της μεμβράνης για πλήρη έκλουση των δεσμευμένων νουκλεϊκών οξέων.

Ο όγκος έκλουσης είναι προσαρμόσιμος και μπορεί να ρυθμιστεί ανάλογα με τις απαιτήσεις των καθοδικών εφαρμογών.

Η έκλουση με μικρότερους όγκους ρυθμιστικού διαλύματος Buffer AVE οδηγεί σε υψηλότερες συγκεντρώσεις νουκλεϊκών οξέων, ωστόσο μπορεί να οδηγήσει σε χαμηλότερη συνολική απόδοση.

Ο ανακτηθείς όγκος εκλούσματος μπορεί να είναι έως 5 μl μικρότερος από τον όγκο έκλουσης που εφαρμόζεται στη στήλη QIAamp Mini.

Σημείωση: Για αναμενόμενες χαμηλές αποδόσεις νουκλεϊκών οξέων, συνιστάται η χρήση ενός σωληναρίου χαμηλής δέσμευσης για την έκλουση (δεν παρέχεται).

16. Φυγοκεντρίστε σε μικροφυγόκεντρο σε πλήρη ταχύτητα (20.000 x g, 14.0000 rpm) για 1 λεπτό για να εκλούσετε τα νουκλεϊκά οξέα.

Σημείωση: Στρέψτε τα καπάκια των σωληνάρων έκλουσης προς κατεύθυνση αντίθετη από την κατεύθυνση περιστροφής του ρότορα (π.χ. εάν ο ρότορας περιστρέφεται προς τα δεξιά, στρέψτε τα καπάκια προς τα αριστερά).

Έλεγχος ποιότητας

Σύμφωνα με το πιστοποιημένο κατά ISO σύστημα διαχείρισης ποιότητας της QIAGEN, κάθε παρτίδα QIAamp DSP Circulating NA Kit ελέγχεται έναντι προκαθορισμένων προδιαγραφών, ώστε να διασφαλίζεται η σταθερή ποιότητα του προϊόντος.

Περιορισμοί

Η απόδοση του συστήματος για την απομόνωση των κυκλοφορούντων, ελεύθερων κυττάρων νουκλεϊκών οξέων έχει καθοριστεί με χρήση δειγμάτων ανθρώπινου πλάσματος που έχουν παραχθεί από τα ακόλουθα σωληνάρια συλλογής αίματος:

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

Αποτελεί ευθύνη του χρήστη να επικυρώνει την απόδοση του συστήματος για οποιοσδήποτε διαδικασίες χρησιμοποιούνται στο εργαστήριό του, οι οποίες δεν καλύπτονται από τις μελέτες απόδοσης της QIAGEN.

Για την ελαχιστοποίηση του κινδύνου αρνητικής επίπτωσης στα διαγνωστικά αποτελέσματα, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλοι μάρτυρες για καθοδικές εφαρμογές. Για περαιτέρω επικύρωση, συνιστώνται οι κατευθυντήριες γραμμές της Διεθνούς Διάσκεψης για την Εναρμόνιση Τεχνικών Απαιτήσεων (ICH) σε ICH Q2 (R1) - Επικύρωση Αναλυτικών Διαδικασιών: Έλεγχος και Μεθοδολογία.

Οποιαδήποτε διαγνωστικά αποτελέσματα προκύπτουν πρέπει να ερμηνεύονται σε συνδυασμό με άλλα κλινικά ή εργαστηριακά ευρήματα.

Χαρακτηριστικά απόδοσης

Τα ισχύοντα χαρακτηριστικά απόδοσης διατίθενται ηλεκτρονικά στην καρτέλα πόρων της σελίδας προϊόντος στη διεύθυνση www.qiagen.com.

Βιβλιογραφία

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.

Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων

Αυτός ο οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων μπορεί να σας βοηθήσει στην επίλυση ενδεχόμενων προβλημάτων. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε και στη σελίδα Frequently Asked Questions (Συχνές ερωτήσεις) του Κέντρου Τεχνικής Υποστήριξης της εταιρείας μας: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Οι επιστήμονες των τμημάτων Τεχνικής Υποστήριξης της QIAGEN είναι πάντοτε πρόθυμοι να απαντήσουν σε τυχόν ερωτήσεις σχετικά με τις πληροφορίες ή/και τα πρωτόκολλα που περιέχονται στο παρόν εγχειρίδιο ή τις τεχνολογίες προετοιμασίας δειγμάτων και προσδιορισμού (για πληροφορίες επικοινωνίας επισκεφθείτε τον ιστότοπο www.qiagen.com).

Παρατηρήσεις και προτάσεις

Λίγο ή καθόλου νουκλεϊκό οξύ μέσα στο έκλουσμα

- | | | |
|----|--|--|
| a) | Χρήση μη σταθεροποιημένου πλάσματος | Τα δείγματα μη σταθεροποιημένου πλάσματος ενδέχεται να οδηγήσουν σε επιταχυνόμενη υποβάθμιση του DNA. Συνιστάται η τήρηση του CEN/TS 16835-3:2015. Επαναλάβετε τη διαδικασία καθαρισμού με νέα δείγματα. |
| b) | Έχει μεσολαβήσει μεγάλο χρονικό διάστημα μεταξύ της λήψης του δείγματος και της παρασκευής του πλάσματος | Οι ερυθροβλάστες ενδέχεται να διασπαστούν και να απελευθερώσουν γονιδιωματικό DNA μέσα στο πλάσμα, αραιώνοντας έτσι το στοχευόμενο νουκλεϊκό οξύ. |
| c) | Τα δείγματα έχουν καταψυχθεί και αποψυχθεί περισσότερες από μία φορές. | Η επαναλαμβανόμενη ψύξη και απόψυξη πρέπει να αποφεύγεται καθώς μπορεί να οδηγήσει σε υποβάθμιση του DNA. Χρησιμοποιείτε πάντοτε φρέσκα δείγματα ή δείγματα που έχουν αποψυχθεί μόνο μία φορά. |
| d) | Χαμηλή συγκέντρωση του στοχευόμενου DNA στα δείγματα. | Τα δείγματα πλάσματος έχουν αφεθεί σε θερμοκρασία δωματίου για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα. Επαναλάβετε τη διαδικασία καθαρισμού με νέα δείγματα
Σημείωση: Ορισμένα άτομα ενδέχεται να έχουν χαμηλή συγκέντρωση ελεύθερων κυττάρων νουκλεϊκών οξέων στο πλάσμα. Στην περίπτωση αυτή, θα πρέπει να επιλέγεται αυξημένος όγκος δείγματος και χαμηλός όγκος εκλούσματος. |
| e) | Αναποτελεσματική λύση δείγματος σε ρυθμιστικό διάλυμα Buffer ACL | Εάν το QIAGEN Proteinase K εκτέθηκε σε αυξημένη θερμοκρασία για παρατεταμένο χρονικό διάστημα, η δραστηριότητά του μπορεί να έχει μειωθεί. Επαναλάβετε τη διαδικασία με νέα δείγματα και φρέσκο QIAGEN Proteinase K. |
| f) | Το μείγμα ρυθμιστικού δείγματος Buffer ACL–φορέα RNA δεν έχει αναμιχθεί επαρκώς | Αναμείξτε το ρυθμιστικό διάλυμα Buffer ACL με τον φορέα RNA αναστρέφοντας ήπια το σωληνάριο που περιέχει το μείγμα ρυθμιστικού διαλύματος Buffer ACL–φορέα RNA τουλάχιστον 10 φορές. |
| g) | Χρησιμοποιήθηκε χαμηλό ποσοστό αιθανόλης αντί για 96–100% | Επαναλάβετε τη διαδικασία καθαρισμού με νέα δείγματα και ποσοστό αιθανόλης 96–100%. Μην χρησιμοποιείτε μετουσιωμένη αλκοόλη που περιέχει άλλες ουσίες, όπως μεθανόλη ή μεθυλαιθυλοκετόνη. |

Παρατηρήσεις και προτάσεις

- | | | |
|----|---|--|
| h) | Το ρυθμιστικό διάλυμα Buffer ACB δεν έχει παρασκευαστεί σωστά | Ελέγξτε αν το συμπυκνωμένο ρυθμιστικό διάλυμα Buffer ACB έχει ανασυσταθεί με τον σωστό όγκο ισοπροπανόλης (όχι αιθανόλης, βλ. σελίδα 26). |
| i) | Εσφαλμένη παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος Buffer ACW1 ή του ρυθμιστικού διαλύματος Buffer ACW2 | Ελέγξτε εάν τα συμπυκνωμένα ρυθμιστικά διαλύματα Buffer ACW1 και Buffer ACW2 αραιώθηκαν με τον σωστό όγκο αιθανόλης (βλ. Σελίδα 26). Επαναλάβετε τη διαδικασία καθαρισμού με νέα δείγματα. |
| j) | Το ρυθμιστικό διάλυμα Buffer ACW1 ή Buffer ACW2 παρασκευάστηκε με 70% αιθανόλη | Ελέγξτε αν τα συμπυκνωμένα ρυθμιστικά διαλύματα Buffer ACW1 και Buffer ACW2 αραιώθηκαν με 96–100% αιθανόλη (βλ. σελίδα 26). Επαναλάβετε τη διαδικασία καθαρισμού με νέα δείγματα. |

Η απόδοση του DNA ή του RNA δεν είναι καλή σε καθοδικές ενζυμικές αντιδράσεις

- | | | |
|----|---|---|
| a) | Λίγο ή καθόλου DNA μέσα στο έκλουσμα | Βλ. παραπάνω την ενότητα «Λίγο ή καθόλου νουκλεϊκό οξύ μέσα στο έκλουσμα» για τις πιθανές αιτίες. Αυξήστε την ποσότητα του εκλούσματος που προστίθεται στην αντίδραση εάν είναι δυνατό. |
| b) | Χρησιμοποιήθηκε ακατάλληλος όγκος έκλουσης | Προσδιορίστε τον μέγιστο όγκο του εκλούσματος που είναι κατάλληλος για την καθοδική εφαρμογή σας. Μειώστε ή αυξήστε τον όγκο του εκλούσματος που προστίθεται στην καθοδική εφαρμογή. Ο όγκος έκλουσης μπορεί να προσαρμοστεί αναλογικά.

Σημείωση: Η έκλουση με μικρότερους όγκους ρυθμιστικού διαλύματος Buffer AVE οδηγεί σε υψηλότερες συγκεντρώσεις νουκλεϊκών οξέων, ωστόσο μπορεί να οδηγήσει σε χαμηλότερη συνολική απόδοση. |
| c) | Τα ρυθμιστικά διαλύματα δεν έχουν αναμειχθεί σχολαστικά | Τα συστατικά άλατος και αιθανόλης του ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης Buffer ACW2 μπορεί να έχουν διαχωριστεί αφού αφήθηκαν για αρκετή ώρα μεταξύ των εκτελέσεων ανάλυσης. Αναμειγνύετε πάντοτε σχολαστικά τα ρυθμιστικά διαλύματα πριν από κάθε εκτέλεση ανάλυσης. |
| d) | Παρέμβαση εξαιτίας του φορέα RNA | Εάν η παρουσία του φορέα RNA στο έκλουσμα παρεμβαίνει στην καθοδική ενζυμική αντίδραση, μπορεί να χρειαστεί να μειώσετε την ποσότητα του φορέα RNA ή να τον παραλείψετε εντελώς. |

Γενικές οδηγίες κατά τον χειρισμό

- | | | |
|----|----------------------------|---|
| a) | Φραγμένη στήλη QIAamp Mini | Εάν ο ρυθμός ροής είναι μειωμένος, ο χρόνος κενού μπορεί να παραταθεί. Εναλλακτικά, κλείστε το VacValve, εάν χρησιμοποιείτε, και αφαιρέστε προσεκτικά τη διάταξη επέκτασης στήλης–VacConnector–VacValve από τη στήλη QIAamp Mini χωρίς να χάσετε οποιαδήποτε ποσότητα από το προϊόν λύσης στην επέκταση στήλης.

Αφαιρέστε τη στήλη QIAamp Mini από την πολλαπλή κενού, τοποθετήστε την σε ένα σωληνάριο πλύσης 2 ml και στροβιλίστε το σε πλήρη ταχύτητα έως ότου το δείγμα διέλθει εντελώς διαμέσου της μεμβράνης. Αντικαταστήστε τη διάταξη επέκτασης στήλης–VacConnector–VacValve που περιέχει το υπόλοιπο προϊόν λύσης. Ενεργοποιήστε την αντλία κενού, ανοίξτε το VacValve και συνεχίστε να φορτώνετε το υπόλοιπο προϊόν λύσης.


Επαναλάβετε την παραπάνω διαδικασία εάν η στήλη QIAamp Mini εξακολουθεί να είναι φραγμένη. |
|----|----------------------------|---|

Παρατηρήσεις και προτάσεις

- Ενδέχεται να έχουν σχηματιστεί κρυσθιζήματα στο πλάσμα εξαιτίας της επαναλαμβανόμενης ψύξης και απόψυξης. Αυτά είναι δυνατό να φράξουν τη στήλη QIAamp Mini. Μη χρησιμοποιείτε πλάσμα που έχει ψυχθεί και αποψυχθεί περισσότερες από μία φορές.
- Σε περίπτωση που εμφανίζονται κρυσθιζήματα, καθαρίστε το δείγμα με φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στα 16.000 x g.
- b) Μεταβλητοί όγκοι έκλουσης Διαφορετικά δείγματα μπορεί να επηρεάσουν τον όγκο του τελικού εκλούσματος. Ο ανακτηθείς όγκος εκλούσματος μπορεί να είναι έως 5 μl μικρότερος από τον όγκο έκλουσης που εφαρμόζεται στη στήλη QIAamp Mini.
- c) Δεν έχει επιτευχθεί πίεση κενού από -800 έως -900 mbar Η πολλαπλή κενού δεν είναι σφικτά κλεισμένη. Πίεστε προς τα κάτω το καπάκι της πολλαπλής κενού μετά την ενεργοποίηση του κενού. Ελέγξτε εάν έχει επιτευχθεί η πίεση κενού.
- Η φλάντζα στο καπάκι του QIAvac έχει φθαρεί. Ελέγξτε οπτικά το σφράγισμα της πολλαπλής και αντικαταστήστε το αν χρειάζεται.
- Τα VacValve έχουν φθαρεί. Αφαιρέστε όλα τα VacValve και τοποθετήστε τα VacConnector απευθείας στις επεκτάσεις τύπου luer. Εισαγάγετε τις στήλες QIAamp Mini μέσα στα VacConnector, κλείστε το καπάκι των στηλών και ενεργοποιήστε το κενό. Ελέγξτε εάν έχει επιτευχθεί η πίεση κενού. Αντικαταστήστε τα VacValve, αν απαιτείται.
- Υπάρχει διαρροή στη σύνδεση με την αντλία κενού. Κλείστε όλες τις επεκτάσεις τύπου luer με καπάκια luer και ενεργοποιήστε την αντλία κενού. Ελέγξτε εάν η πίεση κενού είναι σταθερή μετά την ενεργοποίηση της αντλίας (και εάν η βαλβίδα Vacuum Regulator είναι κλειστή). Αλλάξτε τις συνδέσεις μεταξύ αντλίας και πολλαπλής κενού, αν χρειαστεί.
- Εάν η πίεση κενού δεν έχει ακόμη επιτευχθεί, αντικαταστήστε την αντλία κενού με μια πιο δυνατή.

Σύμβολα

Τα παρακάτω σύμβολα εμφανίζονται στις οδηγίες χρήσης ή στη συσκευασία και την επισήμανση:

Σύμβολο	Ορισμός συμβόλου
 <N>	Περιέχει αντιδραστήρια που επαρκούν για <N> αντιδράσεις
	Ημερομηνία λήξης
	Το προϊόν πληροί τις απαιτήσεις του Ευρωπαϊκού Κανονισμού 2017/746 για τα in vitro διαγνωστικά ιατροτεχνολογικά προϊόντα.
	In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν
	Αριθμός καταλόγου
	Αριθμός παρτίδας
	Αριθμός υλικού (δηλ. επισήμανση στοιχείου)
	Συστατικά
	Περιέχει
	Αριθμός

Σύμβολο

Ορισμός συμβόλου

	Διεθνής Κωδικός Μονάδων Εμπορίας
Rn	Η ένδειξη R αφορά την αναθεώρηση των οδηγιών χρήσης και η είναι ο αριθμός αναθεώρησης
	Περιορισμός θερμοκρασίας
	Κατασκευαστής
	Συμβουλευθείτε τις οδηγίες χρήσης
	Διατηρήστε το προϊόν μακριά από την ηλιακή ακτινοβολία
	Προειδοποίηση/προσοχή
	Κατά την παραλαβή
	Ανοίξτε αμέσως μετά την παραλαβή, φυλάξτε τις στήλες QIAamp Mini Spin σε θερμοκρασία 2–8°C
	Όγκος
	Προσθήκη

Σύμβολο

Ορισμός συμβόλου



Μετά την προσθήκη αιθανόλης στη φιάλη, σημειώστε την τρέχουσα ημερομηνία

EtOH

Αιθανόλη



Μετά την προσθήκη ισοπροπανόλης στη φιάλη, σημειώστε την τρέχουσα ημερομηνία

IPA

Ισοπροπανόλη

→

Οδηγεί σε

GITC

Θειοκυανική γουανιδίνη

G_uHCl

Υδροχλωρική γουανιδίνη

BRIJ 58

BRIJ 58

PROTK

Πρωτεΐνωση Κ

UDI

Αποκλειστική ταυτοποίηση ιατροτεχνολογικού προϊόντος

Παράρτημα Α: Σύσταση για διαχωρισμό και φύλαξη του πλάσματος αίματος

Για σταθεροποιημένα σωληνάρια συλλογής αίματος (π.χ. σωληνάριο PAXgene ccfDNA ή σωληνάριο Streck ελεύθερου κυττάρων DNA), τηρήστε τις οδηγίες του κατασκευαστή για το διαχωρισμό και τη φύλαξη του πλάσματος. Συνιστάται η επαλήθευση αυτών των συνθηκών φύλαξης σε συνδυασμό με την ειδική καθοδική εφαρμογή και τον στόχο σας.

Για μη σταθεροποιημένα σωληνάρια συλλογής αίματος, συνιστάται να ακολουθείτε το πρότυπο 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 (Μοριακές in vitro διαγνωστικές εξετάσεις — Προδιαγραφές για διαδικασίες προ της εξέτασης για φλεβικό ολικό αίμα — Μέρος 3: Απομονωμένο, κυκλοφορούν, ελεύθερο κυττάρων DNA από πλάσμα) ή CEN/TS 17742 Molecular in vitro diagnostic examinations — Specifications for pre-examination processes for venous whole blood — Isolated circulating cell free RNA from plasma (Μοριακές in vitro διαγνωστικές εξετάσεις — Προδιαγραφές για διαδικασίες προ της εξέτασης για φλεβικό ολικό αίμα — Απομονωμένο, κυκλοφορούν, ελεύθερο κυττάρων RNA από πλάσμα).

Για να απομονώσετε τα κυκλοφορούντα ελεύθερα κυττάρων νουκλεϊκά οξέα από δείγματα αίματος, συνιστάται να ακολουθήσετε αυτό το πρωτόκολλο, το οποίο περιλαμβάνει ένα βήμα υψηλής φυγοκέντρησης ισχύος g για να αφαιρέσετε τις κυτταρικές ακαθαρσίες, μειώνοντας έτσι την ποσότητα κυτταρικού ή γονιδιωματικού DNA και RNA στο δείγμα.

1. Τοποθετήστε ολόκληρο το αίμα με EDTA σε σωληνάρια BD Vacutainer® (ή άλλα κύρια σωληνάρια αίματος που περιέχουν EDTA ως αντιπηκτικό) σε μια φυγόκεντρο που έχει ψυχθεί σε θερμοκρασία 4°C με στροφέα ταλάντευσης και κατάλληλους κάδους.
2. Φυγοκεντρίστε τα δείγματα αίματος για 10 λεπτά στα 1.900 x g (3.000 rpm) σε θερμοκρασία 4°C.

3. Αναρροφήστε προσεκτικά το υπερκείμενο υγρό του πλάσματος χωρίς να διαταράξετε τη στιβάδα πλάσματος-κυτταρικής διασύνδεσης. Είναι δυνατό να ληφθούν περίπου 4–5 ml πλάσματος από ένα κύριο σωληνάριο αίματος των 10 ml.

Σημείωση: Το πλάσμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση κυκλοφορούντων νουκλεϊκών οξέων σε αυτό το στάδιο. Ωστόσο, η επακόλουθη φυγοκέντριση υψηλής ταχύτητας θα αφαιρέσει πρόσθετους κυτταρικούς ρύπους και επιμόλυνση των κυκλοφορούντων νουκλεϊκών οξέων από το γονιδιωματικό DNA και RNA που προέρχεται από κατεστραμμένες ερυθροβλάστες.

4. Το αναρροφημένο πλάσμα μεταφέρεται σε φρέσκο σωληνάριο φυγοκέντρισης.
5. Φυγοκεντρίστε τα δείγματα πλάσματος για 10 λεπτά στα 16.000 x g (σε στροφέα σταθερής γωνίας) σε θερμοκρασία 4°C.
Έτσι θα αφαιρεθούν τα πρόσθετα κυτταρικά νουκλεϊκά οξέα που έχουν προσκολληθεί στους κυτταρικούς ρύπους.
6. Αφαιρέστε προσεκτικά το υπερκείμενο υγρό και μεταφέρετέ το σε νέο σωληνάριο χωρίς να διαταράξετε το ίζημα.
7. Εάν το πλάσμα χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση των νουκλεϊκών οξέων την ίδια ημέρα, αποθηκεύστε σε θερμοκρασία 2–8°C μέχρι να το επεξεργαστείτε περαιτέρω. Για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα φύλαξης, κλάσματα πλάσματος από σταθεροποιημένα και μη σταθεροποιημένα σωληνάρια συλλογής αίματος μπορούν να φυλαχθούν σε θερμοκρασία –20°C (DNA ως στόχος) ή –80°C (RNA ως στόχος) για 4 εβδομάδες τουλάχιστον. Πριν χρησιμοποιήσετε το πλάσμα για την εκχύλιση κυκλοφορούντων νουκλεϊκών οξέων, αποψύξτε τα σωληνάρια πλάσματος σε θερμοκρασία δωματίου.
8. **Προαιρετικά:** Για να αφαιρέσετε τα κρουϊζήματα, φυγοκεντρίστε τα δείγματα πλάσματος για 5 λεπτά στα 16.000 x g (σε στροφέα σταθερής γωνίας).

Προαιρετικά: Μεταφέρετε το υπερκείμενο υγρό σε ένα νέο σωληνάριο και κατόπιν ξεκινήστε με το πρωτόκολλο εκχύλισης των κυκλοφορούντων νουκλεϊκών οξέων.

Παράρτημα Β: Γενικές υποδείξεις για τον χειρισμό του RNA

Χειρισμός RNA

Οι ριβονουκλεάσες (RNάσες) είναι ιδιαίτερα σταθερά και ενεργά ένζυμα τα οποία γενικά δεν χρειάζονται συμπαράγοντες για να λειτουργήσουν. Επειδή οι RNάσες αδρανοποιούνται δύσκολα και ακόμα και μικρές ποσότητες επαρκούν για την καταστροφή του RNA, δεν πρέπει να χρησιμοποιείτε γυάλινα ή πλαστικά υλικά εργαστηρίου τα οποία δεν είναι απαλλαγμένα από κάθε πρόσμιξη με RNάση. Θα πρέπει να είστε ιδιαίτεροι προσεκτικοί και να αποφεύγετε την ακούσια προσθήκη RNάσων στο δείγμα RNA κατά τη διάρκεια ή μετά τη διαδικασία καθαρισμού. Για τη δημιουργία και τη διατήρηση ενός περιβάλλοντος χωρίς RNάσες, θα πρέπει να λάβετε τα ακόλουθα μέτρα προφύλαξης κατά την προκαταρκτική επεξεργασία και να χρησιμοποιείτε αναλώσιμα και μη αναλώσιμα δοχεία και διαλύματα κατά την εργασία με RNA.

Γενικές οδηγίες κατά τον χειρισμό

Κατά την εργασία με RNA πρέπει πάντοτε να εφαρμόζονται οι κατάλληλες μικροβιολογικές τεχνικές ασηψίας. Στα χέρια και στα σωματίδια σκόνης μπορούν να υπάρχουν βακτήρια και μύκητες. Αποτελούν δε τις συχνότερες πηγές επιμόλυνσης με RNάσες. Για το λόγο αυτό, φοράτε πάντοτε γάντια από λατέξ ή βινύλιο όταν εργάζεστε με αντιδραστήρια και δείγματα RNA, για να αποφύγετε την επιμόλυνση με RNάση από την επιφάνεια του δέρματος ή από σκονισμένα όργανα του εργαστηρίου. Αλλάζετε γάντια συχνά και διατηρείτε τα σωληνάρια κλειστά όποτε είναι δυνατόν. Διατηρείτε το καθαρό RNA σε πάγο όταν υποπολλαπλάσια μεταφέρονται με πιπέτα για τις καθοδικές εφαρμογές.

Αναλώσιμα πλαστικά υλικά

Στη διάρκεια της διαδικασίας συνιστάται η χρήση αποστειρωμένων, ελεύθερων RNάσης, αναλώσιμων σωληναρίων πολυπροπυλενίου.

Πληροφορίες για τις παραγγελίες

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. κατ.
QIAamp DSP Circulating NA Kit (50)	Για 50 παρασκευές: Στήλες QIAamp Mini, επεκτάσεις στηλών, VacConnectors, QIAGEN Proteinase K, αντιδραστήρια, ρυθμιστικά διαλύματα και σωληνάρια συλλογής	61504
Βοηθητικός εξοπλισμός		
QIAvac 24 Plus vacuum manifold*	Πολλαπλή κενού για την επεξεργασία 1–24 στηλών διαχωρισμού: QIAvac 24 Plus Vacuum manifold, βύσματα τύπου luer και εξαρτήματα γρήγορης σύζευξης	19413
Vacuum Pump*	Αντλία κενού γενικής χρήσης	84010 [ΗΠΑ και Καναδάς] 84000 [Ιαπωνία] 84020 [υπόλοιπος κόσμος]
QIAvac Connecting System*	Σύστημα για σύνδεση της πολλαπλής κενού με την αντλία κενού: περιλαμβάνει δίσκο, φιάλες αποβλήτων, σωλήνωση, συζεύξεις, βαλβίδα, μετρητή και 24 VacValves	19419

* Για χρήση με πρωτόκολλα κενού.

Για ενημερωμένες πληροφορίες σχετικά με τις άδειες χρήσης και για δηλώσεις αποποίησης ευθύνης σχετικά με συγκεκριμένα προϊόντα, ανατρέξτε στο αντίστοιχο εγχειρίδιο kit QIAGEN ή εγχειρίδιο χρήστη. Τα εγχειρίδια των kit QIAGEN και τα εγχειρίδια χρήστη είναι διαθέσιμα στη διεύθυνση www.qiagen.com ή μπορείτε να τα ζητήσετε από το τμήμα Τεχνικών Υπηρεσιών της QIAGEN ή τον διανομέα της περιοχής σας.

Ιστορικό αναθεώρησης εγγράφου

Αναθεώρηση	Περιγραφή
R1, Ιούνιος 2022	Κυκλοφορία έκδοσης 2 κιτ IVDR, καμία μεταβολή στα πρωτόκολλα ή στα δεδομένα απόδοσης σε σύγκριση με την έκδοση 1 του κιτ, προσθήκη του όρου «χειροκίνητη» απομόνωση στην προοριζόμενη χρήση, μικρές ενημερώσεις και διορθώσεις

Η σελίδα αυτή είναι σκόπιμα κενή

Η σελίδα αυτή είναι σκόπιμα κενή

Άδεια περιορισμένης χρήσης για το kit QIAamp DSP Circulating NA Kit

Η χρήση του προϊόντος αυτού συνεπάγεται την αποδοχή εκ μέρους του αγοραστή ή του χρήστη του προϊόντος των παρακάτω όρων:

1. Το προϊόν μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποκλειστικά και μόνο όπως ορίζεται στα πρωτόκολλα που παρέχονται μαζί με το προϊόν και όπως ορίζεται στο εγχειρίδιο αυτό και μόνο με τα συστατικά στοιχεία που περιλαμβάνονται στο σετ. Η QIAGEN δεν παρέχει άδεια χρήσης υπό οποιαδήποτε πνευματική ιδιοκτησία της για τη χρήση ή ενσωμάτωση των παρεχόμενων συστατικών αυτού του σετ σε οποιαδήποτε στοιχεία που δεν περιλαμβάνονται σε αυτό το σετ, παρά μόνον όπως περιγράφεται στα πρωτόκολλα που παρέχονται μαζί με το προϊόν, στο παρόν εγχειρίδιο και στα συμπληρωματικά πρωτόκολλα που διατίθενται στον ιστότοπο www.qiagen.com. Ορισμένα από αυτά τα πρωτόκολλα έχουν παρασχεθεί από χρήστες της QIAGEN για χρήστες της QIAGEN. Αυτά τα πρωτόκολλα δεν έχουν ελεγχθεί διεξοδικά ή βελτιστοποιηθεί από την QIAGEN. Η QIAGEN δεν εγγυάται για αυτά και δεν παρέχει καμία εγγύηση ότι δεν παραβιάζουν τα δικαιώματα τρίτων.
2. Εκτός από τις άδειες που αναφέρονται ρητά, η QIAGEN δεν εγγυάται ότι αυτό το σετ ή/και η χρήση(εις) του δεν παραβιάζουν δικαιώματα τρίτων.
3. Αυτό το σετ και τα συστατικά του παραχωρούνται με άδεια για μία μόνο χρήση και δεν επιτρέπεται η επαναχρησιμοποίηση, η επαντεξεργασία, η ανακατασκευή ή η μεταπώλησή τους.
4. Η QIAGEN αποποιείται ειδικά κάθε άλλης άδειας χρήσης, ρητής ή σιωπηρής, εκτός από εκείνες που αναφέρονται ρητά.
5. Ο αγοραστής και ο χρήστης του σετ συμφωνούν να μην προβούν και να μην επιτρέψουν σε άλλο πρόσωπο να προβεί σε ενέργειες οι οποίες θα μπορούσαν να προκαλέσουν ή να διευκολύνουν τυχόν ενέργειες που απαγορεύονται σύμφωνα με τα προαναφερθέντα. Η QIAGEN διατηρεί το δικαίωμα να επιβάλει τις απαγορεύσεις της παρούσας Συμφωνίας άδειας περιορισμένης χρήσης σε οποιοδήποτε δικαστήριο και πρέπει να αποζημιώνεται για όλες τις ερευνητικές και δικαστικές δαπάνες της, συμπεριλαμβανομένων των δικηγορικών αμοιβών, στο πλαίσιο οποιασδήποτε ενέργειας για την επιβολή της παρούσας Συμφωνίας άδειας περιορισμένης χρήσης ή οποιοσδήποτε εκ των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας σχετικά με το σετ ή/και τα συστατικά του.

Για τους ενημερωμένους όρους της άδειας χρήσης, δείτε τη διεύθυνση www.qiagen.com.

Εμπορικά σήματα: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, (QIAGEN Group), Agilent® (Agilent Technologies, Inc.), BD™, Vacutainer® (Becton Dickinson and Company), PAXgene® (PreAnalytix GmbH), Tween™ (ICI Americas Inc.). Οι κατατεθείσες ονομασίες, τα εμπορικά σήματα κ.λπ. που χρησιμοποιούνται σε αυτό το έγγραφο δεν θα πρέπει να θεωρούνται μη προστατευόμενα από τον νόμο, ακόμα κι αν αυτό δεν υποδεικνύεται ρητώς.

Ιουν-2022 HB-3049-001 1127632 © 2022 QIAGEN. Με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος.

