

# QIAamp<sup>®</sup> DSP DNA Blood Mini Kit — Instrukcja obsługi



Wersja 2



**IVD** Do diagnostyki in vitro

**REF** 61104

**HB** 1071108PL



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden

Tel: +49-2103-29-0

R2 **MAT** 1071108PL



## **QIAGEN Sample and Assay Technologies**

Firma QIAGEN jest czołowym dostawcą innowacyjnych technologii postępowania z próbkami i wykonywania oznaczeń, które umożliwiają izolację i detekcję zawartości dowolnej próbki biologicznej. Nasze zaawansowane produkty i usługi o wysokiej jakości zapewniają sukces na każdym etapie — od pobrania próbki do otrzymania wyniku.

### **Firma QIAGEN wyznacza standardy w:**

- procedurach oczyszczania DNA, RNA i białek;
- oznaczeniach kwasów nukleinowych i białek;
- badaniach microRNA oraz RNAi;
- automatyzacji technologii postępowania z próbkami i wykonywania oznaczeń.

Naszą misją jest umożliwienie klientom osiągnięcia wybitnych sukcesów i przełomowych wyników badań. Więcej informacji można znaleźć na stronie [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Spis treści

<b>Przeznaczenie</b>	<b>4</b>
<b>Podsumowanie i objaśnienie</b>	<b>4</b>
<b>Liza komórek krwi</b>	<b>5</b>
<b>Wiązanie genomowego DNA do membrany kolumny wirówkowej QIAamp Mini</b>	<b>5</b>
<b>Zautomatyzowane oczyszczanie</b>	<b>6</b>
<b>Materiały dostarczone w zestawie</b>	<b>8</b>
<b>Zawartość zestawu</b>	<b>8</b>
<b>Materiały wymagane, ale niedostarczone</b>	<b>9</b>
<b>Informacje dotyczące bezpieczeństwa</b>	<b>10</b>
<b>Przechowywanie i sposób postępowania z odczynnikami</b>	<b>12</b>
<b>Sposób postępowania z próbkami i przechowywanie</b>	<b>12</b>
<b>Ważne informacje</b>	<b>14</b>
<b>Ważne informacje przed rozpoczęciem protokołu</b>	<b>14</b>
<b>Przygotowanie odczynników i buforów</b>	<b>14</b>
<b>Sposób postępowania z kolumnami wirówkowymi QIAamp Mini</b>	<b>16</b>
<b>Elucja genomowego DNA</b>	<b>16</b>
<b>Uzysk i jakość genomowego DNA</b>	<b>16</b>
<b>Ustawianie systemu QIAvac 24 Plus vacuum system</b>	<b>17</b>
<b>Protokół: Izolacja i oczyszczanie genomowego DNA z próbek krwi za pomocą systemu próżniowego</b>	<b>19</b>
<b>Protokół: Izolacja i oczyszczanie genomowego DNA z próbek krwi za pomocą mikrowirówki</b>	<b>23</b>
<b>Kontrola jakości</b>	<b>26</b>
<b>Parametry skuteczności</b>	<b>26</b>
<b>Skuteczność w dalszych oznaczeniach</b>	<b>27</b>
<b>Symbole</b>	<b>32</b>
<b>Literatura</b>	<b>33</b>
<b>Informacje kontaktowe</b>	<b>34</b>
<b>Informacje dotyczące zamawiania</b>	<b>35</b>

## Przeznaczenie

Zestaw QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit to system, który wykorzystuje technologię membrany krzemionkowej (technologia QIAamp) do izolacji i oczyszczania genomowego DNA z próbek biologicznych.

Produkt jest przeznaczony do stosowania przez profesjonalnych użytkowników, takich jak technicy i lekarze przeszkoleni w zakresie technik biologii molekularnej.

Zestaw QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit jest przeznaczony do diagnostyki *in vitro*.

## Podsumowanie i objaśnienie

Zestaw QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit wykorzystuje powszechnie znaną technologię, umożliwiając szybką i łatwą izolację i oczyszczanie genomowego DNA z próbek krwi pełnej o objętości 200  $\mu$ l.

Procedury QIAamp DSP DNA Blood Mini przeznaczone do jednoczesnego przetwarzania wielu próbek krwi umożliwiają otrzymanie oczyszczonego DNA gotowego do użycia. Procedury są odpowiednie do stosowania ze świeżymi lub zamrożonymi próbkami krwi pełnej oraz krwi poddanej działaniu cytrynianu lub EDTA.

Proste procedury wirówkowe i próżniowe QIAamp DSP są odpowiednie do przetwarzania wielu próbek jednocześnie. Niektóre z procedur wirówkowych QIAamp można wykonywać we w pełni zautomatyzowany sposób w analizatorze QIAcube<sup>®</sup> w celu zwiększenia normalizacji oraz łatwości obsługi (patrz strona 6).

Nie jest konieczne wcześniejsze oddzielenie leukocytów. Procedury nie wymagają wykonywania izolacji za pomocą mieszaniny fenol/chloroform ani precypitacji w alkoholu i wymagają minimalnego udziału użytkownika, umożliwiając bezpieczne postępowanie z potencjalnie zakaźnymi próbkami. Procedury są zaprojektowane w taki sposób, aby zminimalizować możliwość zanieczyszczenia krzyżowego między próbkami. Oczyszczone DNA jest gotowe do użycia w reakcjach PCR lub innych zastosowaniach. Można je również przechowywać w temperaturze od  $-25^{\circ}\text{C}$  do  $-15^{\circ}\text{C}$  do późniejszego użycia.

## Zasady procedury

Każda procedura QIAamp DSP DNA Blood Mini składa się z 4 etapów:

- liza komórek w próbce krwi;
- wiązanie genomowego DNA znajdującego się w lizacie komórkowym do membrany kolumny wirówkowej QIAamp Mini;
- płukanie membrany;
- elucja genomowego DNA z membrany.

Ta instrukcja obsługi zawiera protokoły dla 2 alternatywnych procedur QIAamp DSP DNA Blood Mini: procedury wirówkowej, do której wykonania wymagana jest wirówka, oraz procedury próżniowej, do której wykonania wymagana jest wirówka i system próżniowy (patrz schemat, strona 7).

### Liza komórek krwi

Próbki poddawane są lizie w warunkach denaturujących w podwyższonych temperaturach. Liza zachodzi w obecności proteazy QIAGEN Protease (QP) i buforu Lysis Buffer (AL).

### Wiązanie genomowego DNA do membrany kolumny wirówkowej QIAamp Mini

W celu optymalizacji wiązania genomowego DNA do membrany kolumny wirówkowej QIAamp Mini do lizatów dodaje się najpierw etanol. Każdy lizat nanosi się następnie na kolumnę wirówkową QIAamp Mini, a genomowe DNA ulegają adsorpcji na membranie krzemionkowej w miarę przesączania lizatu pod wpływem ciśnienia próżni lub siły wirowania.

## Zautomatyzowane oczyszczanie

Oczyszczanie DNA przy użyciu zestawu QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit można wykonywać w całkowicie zautomatyzowany sposób w analizatorze QIAcube. Innowacyjny analizator QIAcube wykorzystuje zaawansowaną technologię do przetwarzania kolumn wirówkowych QIAGEN, umożliwiając płynną integrację niskoprzepustowego, zautomatyzowanego przygotowywania próbek z pracą laboratoryjną. Przygotowanie próbek za pomocą analizatora QIAcube obejmuje te same etapy co procedura ręczna (tzn. lizę, wiązanie, płukanie i elucję), co umożliwi użytkownikowi otrzymanie DNA o wysokiej jakości w wyniku oczyszczania przy użyciu zestawu QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit.

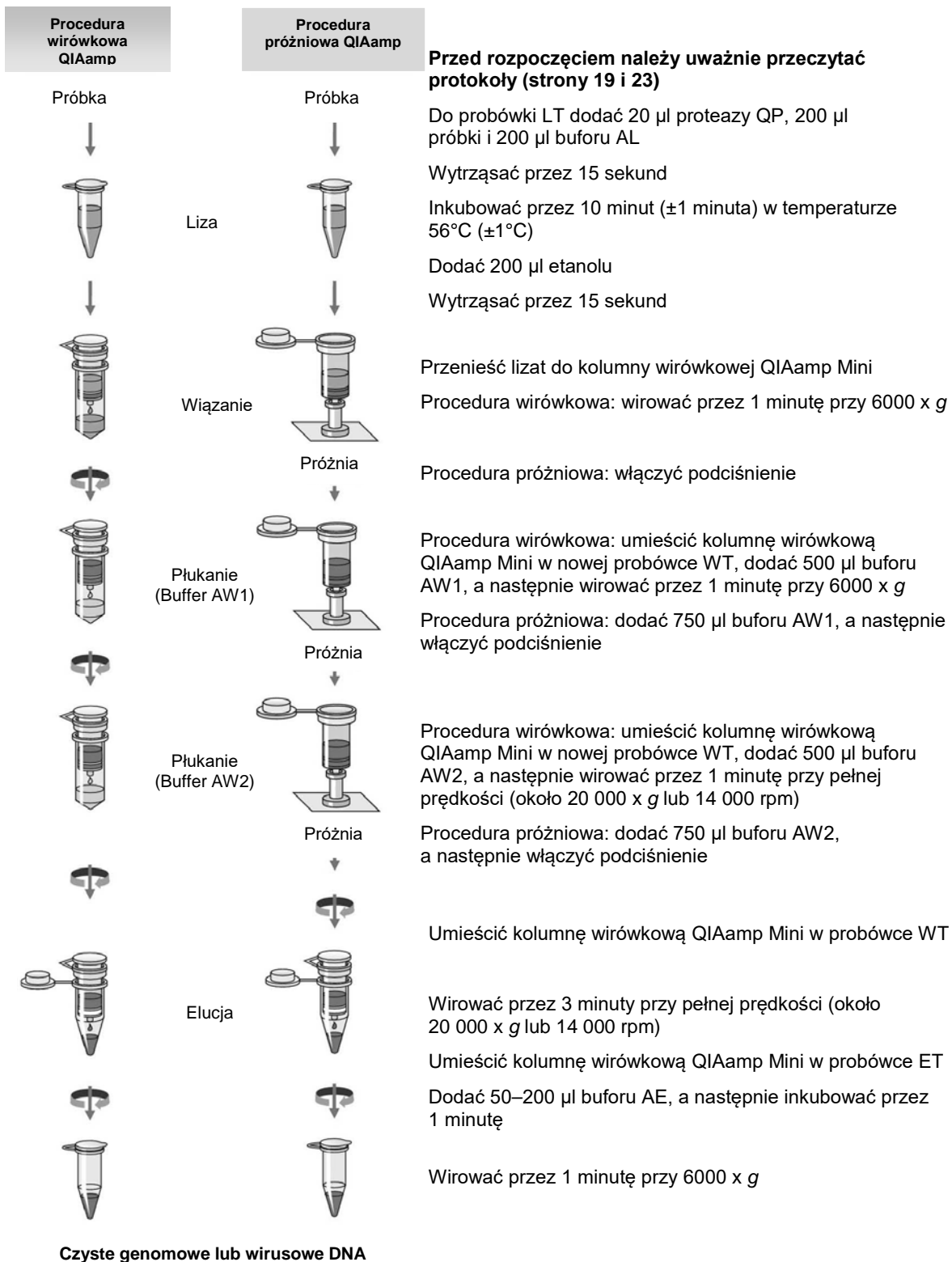
Więcej informacji na temat procedury zautomatyzowanej można znaleźć w odpowiedniej karcie protokołu dostępnej pod adresem [www.qiagen.com/MyQIAcube](http://www.qiagen.com/MyQIAcube). Najnowsze karty protokołów można pobrać bezpłatnie lub otrzymać, kontaktując się z działem serwisu technicznego firmy QIAGEN (patrz strona 34).

W przypadku stosowania zestawu QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit w sposób zautomatyzowany w aparacie QIAcube aparat może przetwarzać mniej niż 50 próbek z powodu objętości martwych, parowania i dodatkowego zużycia odczynników poprzez zautomatyzowane pipetowanie. Firma QIAGEN gwarantuje 50 przygotowań próbek tylko w przypadku ręcznego stosowania zestawu QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit.
















Ryc. 1. Analizator QIAcube.

## Procedura wirówkowa i próżniowa QIAamp DSP DNA Blood Mini



## Materiały dostarczone w zestawie

### Zawartość zestawu

QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit			
Nr katalogowy			<b>61104</b>
Liczba przygotowań			<b>50*</b>
QIAamp Mini Spin	QIAamp Mini Spin Columns z probówkami Wash Tube (WT) (2 ml)		50
ET	Elution Tubes (1,5 ml)		50
VC	VacConnectors		50
LT	Lysis Tubes (1,5 ml)		50
WT	Wash Tubes (2 ml)		3 x 50
AL	Lysis Buffer <sup>†</sup>		12 ml
AW1	Wash Buffer 1 <sup>†</sup> (koncentrat)		19 ml
AW2	Wash Buffer 2 <sup>†</sup> (koncentrat)		13 ml
AE	Elution Buffer <sup>†</sup>		25 ml
PS	Protease Solvent <sup>‡</sup>		2 ml
QP	QIAGEN Protease <sup>§</sup>		1 fiolka
	CD		1
	Instrukcja obsługi		1

\* W przypadku stosowania zestawu QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit w sposób zautomatyzowany w aparacie QIAcube aparat może przetwarzać mniej niż 50 próbek z powodu objętości martwych, parowania i dodatkowego zużycia odczynników poprzez zautomatyzowane pipetowanie. Firma QIAGEN gwarantuje 50 przygotowań próbek tylko w przypadku ręcznego stosowania zestawu QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit.

<sup>†</sup> Zawiera chlorowodorek guanidyny. Produkt nie jest zgodny ze środkami dezynfekującymi zawierającymi wybielacz. Więcej informacji można znaleźć na stronie 11.

<sup>‡</sup> Zawiera azcydek sodu jako środek konserwujący.

<sup>§</sup> Objętość do przygotowywania zawiesiny 1,2 ml. Patrz część „Przygotowywanie proteazy QIAGEN Protease” na stronie 14.



## **Materiały wymagane, ale niedostarczone**

Podczas pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze używać odpowiedniego fartucha laboratoryjnego, rękawiczek jednorazowych i okularów ochronnych. Więcej informacji można znaleźć w odpowiednich kartach charakterystyki substancji niebezpiecznych (material safety data sheet, MSDS), dostępnych u dostawcy produktu.

### **Dla procedury wirówkowej i próżniowej**

- Etanol (96–100%)
- Pipety\* i końcówki do pipet (aby nie dopuścić do zanieczyszczenia krzyżowego, usilnie zalecamy stosowanie końcówek do pipet z barierami aerozolowymi)
- Rękawiczki jednorazowe
- Blok grzewczy\* do lizy próbek w temperaturze 56°C (zalecamy produkt Eppendorf® Thermomixer comfort z termoblokiem na mikropróbki testowe o pojemności 1,5 ml<sup>†</sup>)
- Mikrowirówka\*
- Cylinder miarowy (50 ml)
- Wytrząsarka

### **Tylko dla procedury próżniowej**

- System QIAvac 24 Plus vacuum system (QIAvac 24 Plus, nr kat. 19413, system QIAvac Connecting System, nr kat. 19419 i pompa Vacuum Pump, nr kat. 84020) lub równoważny laboratoryjny system próżniowy

\* W celu zapewnienia właściwego przetwarzania próbek w procedurach QIAamp DSP DNA Blood Mini zdecydowanie zalecamy kalibrowanie sprzętu (np. pipet i bloków grzewczych) zgodnie z zaleceniami producenta.

<sup>†</sup> Nie jest to pełna lista dostawców i nie obejmuje wielu ważnych sprzedawców materiałów biologicznych.

## Informacje dotyczące bezpieczeństwa

Podczas pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze używać odpowiedniego fartucha laboratoryjnego, rękawiczek jednorazowych i okularów ochronnych. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z odpowiednimi kartami charakterystyki substancji niebezpiecznych (MSDS). Są one dostępne online w wygodnym i kompaktowym formacie PDF pod adresem [www.qiagen.com/Support/MSDS.aspx](http://www.qiagen.com/Support/MSDS.aspx). Na tej stronie można wyszukiwać, wyświetlać i drukować karty charakterystyki dla wszystkich zestawów i składników zestawów firmy QIAGEN.

**PRZESTROGA: NIE dolewać wybielacza lub roztworów kwasowych bezpośrednio do odpadów powstałych po przygotowaniu próbek.**

Bufor Lysis Buffer (AL) i bufor Wash Buffer 1 (AW1) zawierają chlorowodorek guanidyny, który może tworzyć wysoce reaktywne związki w połączeniu z wybielaczem. W przypadku rozlania płynu zawierającego te bufony należy wyczyścić go za pomocą odpowiedniego detergentu laboratoryjnego i wody. Jeśli rozlany płyn zawiera czynniki potencjalnie zakaźne, należy wyczyścić zalany obszar najpierw detergentem laboratoryjnym i wodą, a następnie 1-procentowym (stężenie objętościowe) podchlorynem sodu. Jeśli butelki zawierające bufor są uszkodzone lub nieszczelne, podczas ich wyrzucania należy nosić rękawiczki i okulary ochronne, aby uniknąć obrażeń ciała lub spowodowania obrażeń u innych osób.

Firma QIAGEN nie badała odpadów płynnych powstających w procedurach QIAamp DSP DNA Blood Mini pod kątem występowania pozostałości materiałów zakaźnych. Zanieczyszczenie odpadów płynnych pozostałościami materiałów zakaźnych jest mało prawdopodobne, ale nie można go całkowicie wykluczyć. Z tego powodu odpady płynne należy traktować jako zakaźne i należy postępować z nimi oraz usuwać je zgodnie z lokalnymi przepisami bezpieczeństwa.

Do składników zestawu QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit mają zastosowanie następujące zwroty informujące o zagrożeniach i bezpieczeństwie.

### **Bufor Lysis Buffer (AL) i bufor Wash Buffer 1 (AW1)**



Zawierają chlorowodorek guanidyny: produkty szkodliwe, drażniące. Zwroty informujące o zagrożeniach i bezpieczeństwie:\* R22-36/38, S13-26-36-46.

### **Proteaza QIAGEN Protease (QP)**



Zawiera subtylizynę: produkt uczulający, drażniący. Zwroty informujące o zagrożeniach i bezpieczeństwie:\* R37/38-41-42, S22-24-26-36/37/39-46.

### **Całodobowa informacja w nagłych przypadkach**

Informacje medyczne w nagłych przypadkach można uzyskać w języku angielskim, francuskim i niemieckim przez całą dobę w:

Centrum Informacji Toksykologicznej w Moguncji, Niemcy

Tel.: +49-6131-19240

\* R22: Działa szkodliwie po połknięciu; R36/38: Działa drażniąco na oczy i skórę; R37/38 Działa drażniąco na drogi oddechowe i skórę; R41: Ryzyko poważnego uszkodzenia oczu; R42: Może powodować uczulenie w następstwie narażenia drogą oddechową; S13: Nie przechowywać razem z żywnością, napojami i paszami dla zwierząt; S22: Nie wdychać pyłu; S24: Unikać kontaktu ze skórą; S26: W przypadku kontaktu z oczami niezwłocznie przemyć dużą ilością wody i zasięgnąć porady lekarza; S36: Nosić odpowiednią odzież ochronną; S36/37/39: Nosić odpowiednią odzież ochronną; S46: W przypadku połknięcia niezwłocznie zasięgnąć porady lekarza i pokazać to opakowanie lub etykietę.

## Przechowywanie i sposób postępowania z odczynnikami

Po otrzymaniu kolumn wirówkowych QIAamp Mini należy je przechowywać w temperaturze 2–8°C i zużyć do daty ważności podanej na opakowaniu zestawu.

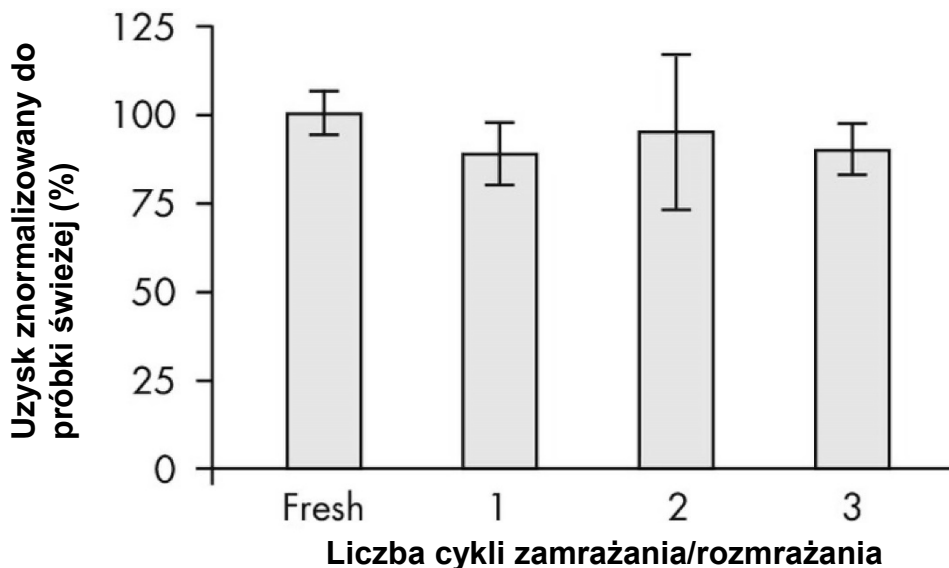
Wszystkie bufora można przechowywać w temperaturze pokojowej (15–25°C) do daty ważności podanej na opakowaniu zestawu.

Liofilizowaną proteazę QIAGEN Protease (QP) można przechowywać w temperaturze pokojowej (15–25°C) do daty ważności zestawu bez negatywnego wpływu na skuteczność. Zrekonstruowana proteaza QIAGEN Protease jest stabilna przez maks. 1 rok w przypadku przechowywania w temperaturze 2–8°C, ale tylko do daty ważności zestawu.

Zrekonstruowany bufor Wash Buffer 1 (AW1) i zrekonstruowany bufor Wash Buffer 2 (AW2) są stabilne przez maks. 1 rok w przypadku przechowywania w temperaturze pokojowej (15–25°C), ale tylko do daty ważności zestawu.

## Sposób postępowania z próbkami i przechowywanie

Krioprecypitaty powstałe podczas rozmrażania zamrożonych próbek zatkają membranę kolumny wirówkowej QIAamp Mini. Jeśli widoczne są krioprecypitaty, należy unikać aspirowania ich podczas aspiracji próbki. Oceniono wpływ zamrażania i rozmrażania próbek krwi na oczyszczanie DNA za pomocą zestawu QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (patrz Ryc. 2).



**Ryc. 2. Wpływ zamrażania i rozmrażania próbek.** Próbkę krwi poddanej działaniu EDTA zamrażano i rozmrażano do 3 razy, a następnie wykonywano oczyszczanie DNA za pomocą zestawu QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit. Obliczone uzyski DNA znormalizowano do uzysku ze świeżej próbki (100%). Każdy słupek na wykresie przedstawia wyniki z 32 powtórzeń (średnia ± odchylenie standardowe).

Ilość DNA oczyszczonego w procedurach QIAamp DSP DNA Blood Mini zależy od zawartości białych krwinek w każdej próbce krwi. Genomowe DNA jest oczyszczane z pobranych od zdrowych dawców próbek krwi o objętości 200 µl za pomocą procedury wirówkowej lub próżniowej. Do pobrania próbek krwi do procedur QIAamp DSP DNA Blood Mini można użyć wielu różnych probówek pierwotnych i antykoagulantów (Tabela 1).

**Tabela 1. Średnie względne uzyski DNA z próbek krwi pobranych przy zastosowaniu różnych probówek pierwotnych i antykoagulantów**

Probówka pierwotna	Producent	Nr kat.	Objętość nominalna	Średni uzysk*
BD™ Vacutainer® 9NC	BD	366007	9 ml	6,4 µg
BD Vacutainer K3E	BD	36847	10 ml	6,6 µg
BD Vacutainer K2E	BD	367864	6 ml	6,4 µg
S-Monovette® EDTA	Sarstedt®	02.1066.001	9 ml	6,5 µg
S-Monovette CPDA1	Sarstedt	01.1610.001	8,5 ml	6,3 µg
Vacurette® K3E	Greiner Bio-One®	455036	9 ml	6,5 µg
Vacurette 9NC	Greiner Bio-One	454382	2 ml	6,3 µg

Genomowe DNA oczyszczano z pobranych od zdrowych dawców próbek krwi o objętości 200 µl (od  $4,0 \times 10^6$  komórek na ml do  $9,0 \times 10^6$  komórek na ml).

\* Średni uzysk dla każdej probówki pierwotnej określono na podstawie 11 próbek przebadanych w trzech powtórzeniach.

### Usuwanie pozostałości substancji zanieczyszczających

Podczas gdy genomowe DNA pozostaje związane z membraną kolumny wirówkowej QIAamp Mini, zanieczyszczenia są skutecznie wypłukiwane najpierw za pomocą buforu Wash Buffer 1 (AW1), a następnie buforu Wash Buffer 2 (AW2).

### Elucja czystego genomowego DNA

Genomowe DNA jest eluowane z membrany kolumny wirówkowej QIAamp Mini za pomocą 50–200 µl buforu Elution Buffer (AE). Eluowane DNA jest gotowe do użytku w dalszych różnych oznaczeniach, w tym różnorodnych dalszych oznaczeniach diagnostycznych in vitro.

## Ważne informacje

### Ważne informacje przed rozpoczęciem protokołu

- Po otrzymaniu zestawu należy sprawdzić składniki zestawu pod kątem uszkodzeń. Jeśli uszkodzone są opakowania blistrowe lub butelki z buforami, należy skontaktować się z działem pomocy technicznej firmy QIAGEN lub lokalnym dystrybutorem. W przypadku rozlania płynów należy zapoznać się z częścią „Informacje dotyczące bezpieczeństwa” (strona 10). Nie używać uszkodzonych składników zestawu, ponieważ ich użycie może prowadzić do obniżenia skuteczności zestawu.
- Należy zawsze zmieniać końcówki pipet pomiędzy przenoszeniami płynów. W celu zminimalizowania prawdopodobieństwa zanieczyszczenia krzyżowego zalecamy stosowanie końcówek do pipet z barierą aerozolową.
- Wszystkie etapy odwirowywania należy przeprowadzać w temperaturze pokojowej (15–25°C).
- Należy zawsze używać rękawiczek jednorazowych i regularnie sprawdzać, czy nie są zanieczyszczone materiałem próbki. W przypadku zanieczyszczenia zutylizować rękawiczki.
- W celu zminimalizowania prawdopodobieństwa zanieczyszczenia krzyżowego należy otwierać tylko jedną probówkę naraz.
- Nie używać składników innych zestawów z aktualnie używanym zestawem, chyba że numery serii są identyczne.
- Należy unikać skażenia mikrobiologicznego składników zestawu.
- W celu zminimalizowania ryzyka zakażenia w wyniku kontaktu z materiałem potencjalnie zakaźnym zalecamy pracę w warunkach laminarnego przepływu powietrza do czasu lizy próbek.
- Zestaw powinien być stosowany wyłącznie przez personel przeszkolony w zakresie laboratoryjnych procedur diagnostyki in vitro.

### Przygotowanie odczynników i buforów


#### ■ Przygotowanie proteazy QIAGEN Protease

Dodać 1,2 ml rozpuszczalnika Protease Solvent (PS) do fiolki z liofilizowaną proteazą QIAGEN Protease (QP) i ostrożnie wymieszać. Aby uniknąć spieniania, wymieszać zawartość fiolki, odwracając ją kilka razy. Upewnić się, że proteaza QIAGEN Protease (QP) jest całkowicie rozpuszczona.

 Nie dodawać proteazy QIAGEN Protease (QP) bezpośrednio do buforu Lysis Buffer (AL).


#### ■ **Przygotowanie buforu Wash Buffer 1**

Za pomocą cylindra miarowego należy dodać 25 ml etanolu (96–100%) do butelki zawierającej 19 ml koncentratu buforu Wash Buffer 1 (AW1). Zrekonstruowany bufor Wash Buffer 1 (AW1) należy przechowywać w temperaturze pokojowej (15–25°C).

 Przed rozpoczęciem procedury należy zawsze wymieszać zrekonstruowany bufor Wash Buffer 1 (AW1), odwracając butelkę kilka razy.


#### ■ **Przygotowanie buforu Wash Buffer 2**

Za pomocą cylindra miarowego należy dodać 30 ml etanolu (96–100%) do butelki zawierającej 13 ml koncentratu buforu Wash Buffer 2 (AW2). Zrekonstruowany bufor Wash Buffer 2 (AW2) należy przechowywać w temperaturze pokojowej (15–25°C).

 Przed rozpoczęciem procedury należy zawsze wymieszać zrekonstruowany bufor Wash Buffer 2 (AW2), odwracając butelkę kilka razy.

#### ■ **Przygotowanie buforu Elution Buffer**

W zestawie dostarczono jedną butelkę buforu Elution Buffer (AE). Aby uniknąć zanieczyszczenia buforu Elution Buffer (AE), zdecydowanie zalecamy używanie końcówek do pipet z barierami aerozolowymi podczas pipetowania buforu Elution Buffer (AE) z butelki oraz zamykanie butelki zatyczką niezwłocznie po zakończeniu pipetowania.

 Bufor Elution Buffer (AE) zawiera azydek sodu, który wykazuje absorbancję przy 260 nm, jako środek konserwujący. Z tego względu podczas oznaczania ilościowego DNA w eluacie za pomocą pomiaru absorbancji przy 260 nm, podczas określania czystości DNA w eluacie za pomocą pomiaru absorbancji przy 260 nm i 280 nm oraz podczas skanowania widma w zakresie od 220 nm do 350 nm, należy upewnić się, że stężenie azydku sodu w próbce ślepej jest takie samo jak w eluacie. Na przykład, jeśli eluat przygotowany do pomiarów absorbancji jest rozcieńczany w proporcji 50 µl eluatu na 100 µl wody, należy przygotować próbę ślepa, rozcieńczając 50 µl buforu Elution Buffer (AE), używając 100 µl wody. Do rozcieńczeń należy używać świeżej wody destylowanej.

## Sposób postępowania z kolumnami wirówkowymi QIAamp Mini

Z powodu czułości technologii amplifikacji kwasu nukleinowego podczas postępowania z kolumnami wirówkowymi QIAamp Mini konieczne jest podjęcie następujących środków ostrożności w celu uniknięcia zanieczyszczenia krzyżowego między przygotowaniem próbek:

- Ostrożnie nanosić próbkę lub roztwór na kolumnę wirówkową QIAamp Mini. Próbkę nanieść pipetą do kolumny wirówkowej QIAamp Mini bez zamaczania brzegu kolumny.
- Należy zawsze zmieniać końcówki pipet pomiędzy przenoszeniami płynów. Zalecamy stosowanie końcówek do pipet z barierą aerozolową.
- Unikać dotykania membrany kolumny wirówkowej QIAamp Mini końcówką pipety.
- Po wszystkich etapach wytrząsania pulsacyjnego krótko odwirować próbki do mikrowirówki, aby usunąć krople z wnętrza wieczek.
- Otwierać jednorazowo tylko jedną kolumnę wirówkową QIAamp Mini i zachować ostrożność, aby unikać wytwarzania aerozoli.
- Przez cały czas przeprowadzania procedury nosić rękawiczki. W przypadku styczności rękawiczek z próbką natychmiast zmienić rękawiczki.

## Elucja genomowego DNA

Objętość DNA eluowanego z kolumny wirówkowej QIAamp Mini może być do 20 µl mniejsza niż objętość buforu Elution Buffer (AE) naniesionego na kolumnę. Objętość odzyskanego eluatu jest zależna od właściwości próbki. Bufor Elution Buffer (AE) należy doprowadzić do temperatury pokojowej (15–25°C) przed naniesieniem go na kolumnę. Eluowane DNA jest zbierane do próbek do elucji (elution tube, ET). W przypadku przechowywania DNA do 4 tygodni zalecamy przechowywanie w temperaturze 2–8°C. W przypadku przechowywania długoterminowego zalecamy przechowywanie w temperaturze –20°C.

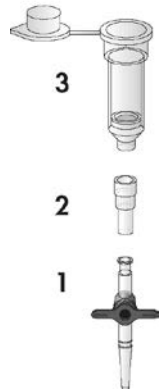
## Uzysk i jakość genomowego DNA

Uzysk i jakość wyizolowanego genomowego DNA są odpowiednie dla wszystkich rodzajów dalszych procedur wykrywania w diagnostyce molekularnej. Oznaczenia diagnostyczne należy wykonywać zgodnie z instrukcjami producenta.



## Ustawianie systemu QIAvac 24 Plus vacuum system

Należy upewnić się, że prawidłowo ustawiono kolumnę wirówkową QIAamp Mini, złącze VacConnector (VC) oraz zawór VacValve (patrz Ryc. 3).



**Ryc. 3. Montaż elementów zestawu QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit do próżniowego przetwarzania próbek:**

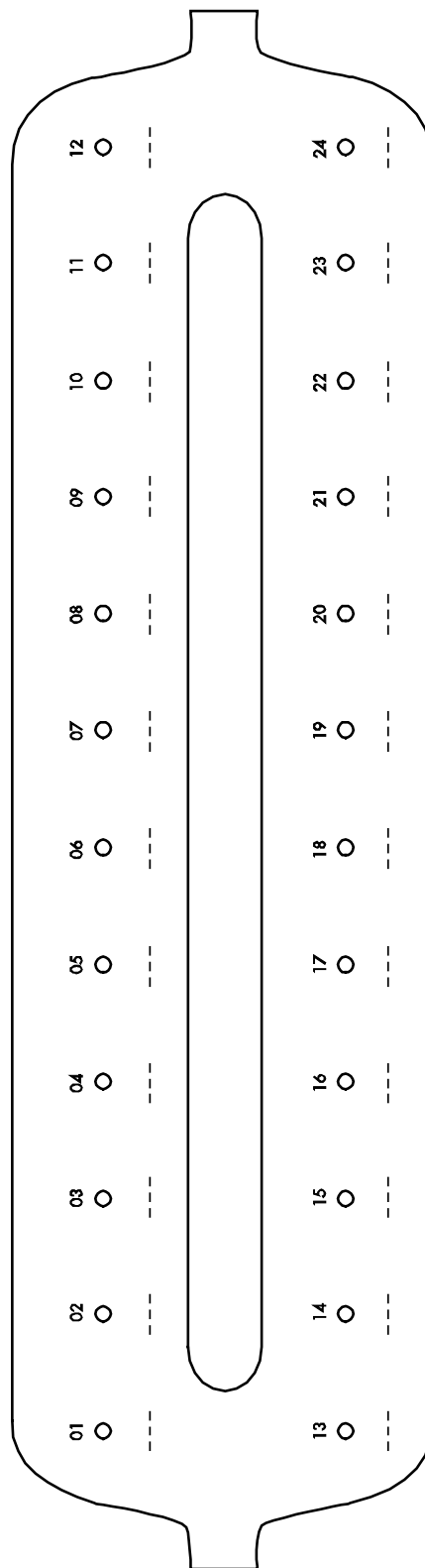
1. Zawór VacValve (dostarczany z systemem próżniowym)
2. Złącze VacConnector (VC)
3. Kolumna wirówkowa QIAamp Mini

W przypadku stosowania procedury próżniowej z systemem QIAvac 24 Plus vacuum system zalecamy oznaczenie probówek do lizy (lysis tube, LT), probówek do elucji (ET) oraz kolumn wirówkowych QIAamp Mini zgodnie ze schematem na Ryc. 4 (patrz kolejna strona) w celu uniknięcia pomylenia próbek. Można skopiować tę rycinę i oznakować nazwami próbek. Zalecamy używanie podobnego schematu w przypadku stosowania innych systemów próżniowych lub procedury wirówkowej.

Data: \_\_\_\_\_

Operator: \_\_\_\_\_

Id. cyklu: \_\_\_\_\_



Ryc. 4. Schemat oznakowania probówek do lizy (LT), probówek do elucji (ET) i kolumn wirówkowych QIAamp Mini do stosowania w systemie QIAvac 24 Plus vacuum system.

## **Protokół: Izolacja i oczyszczanie genomowego DNA z próbek krwi za pomocą systemu próżniowego**

Do izolacji i oczyszczania genomowego DNA z próbek krwi pełnej o objętości 200 µl traktowanych EDTA lub cytrynianem za pomocą systemu próżniowego, takiego jak system QIAvac 24 Plus vacuum system.

### **Ważne informacje przed rozpoczęciem**

- Poniższa procedura zawiera instrukcje dotyczące przetwarzania pojedynczej próbki krwi. W systemie QIAvac 24 Plus vacuum system można jednak przetwarzać do 24 próbek jednocześnie.

### **Czynności do wykonania przed rozpoczęciem**

- Doprowadzić próbki krwi do temperatury pokojowej (15–25°C) i upewnić się, że są dobrze wymieszane.
- Jeśli w buforze Lysis Buffer (AL) wytrącił się osad, rozpuścić go, inkubując bufor w temperaturze 56°C.
- Upewnić się, że bufony Wash Buffer 1 (AW1) i Wash Buffer 2 (AW2) oraz proteaza QIAGEN Protease (QP) zostały przygotowane zgodnie z instrukcjami w części „Przygotowywanie odczynników i buforów” na stronach 14 i 15.
- Doprowadzić bufor Elution Buffer (AE) do temperatury pokojowej (15–25°C) do użycia w etapie 14.
- Ustawić blok grzewczy na temperaturę 56°C do użycia w etapie 4.
- Aby zminimalizować ryzyko zanieczyszczenia krzyżowego włożyć złącze VacConnector (VC) do każdego adaptera typu luer systemu próżniowego.
- Procedury kontroli jakości firmy QIAGEN wykorzystują funkcjonalne testy dopuszczania zestawów dla każdej serii zestawów. Z tego względu nie należy mieszać odczynników z różnych serii zestawów i nie łączyć poszczególnych odczynników z różnych serii odczynników.
- Upewnić się, że butelka na odpady systemu próżniowego jest pusta i że wszystkie złącza są prawidłowo podłączone.
- Szczegółowe informacje dotyczące obsługi systemu próżniowego, zwłaszcza jego konserwacji, zawiera dostarczona razem z nim instrukcja obsługi.


## Procedura

1. **Za pomocą pipety przenieść 20 µl proteazy QIAGEN Protease (QP) do probówki do lizy (LT).**

 Przed użyciem należy sprawdzić datę ważności zrekonstruowanej proteazy.

2. **Dodać 200 µl próbki krwi do probówki do lizy (LT).**
3. **Dodać 200 µl buforu Lysis Buffer (AL) do probówki do lizy (LT), zamknąć wieczko i wymieszać, wytrząsając pulsacyjnie przez 15 sekund.**

Aby zapewnić skuteczną lizę, kluczowe jest, aby próbka i bufor Lysis Buffer (AL) były dobrze wymieszane i tworzyły roztwór jednorodny.

 Ze względu na to, że bufor Lysis Buffer (AL) ma dużą lepkość, należy upewnić się, że dodano odpowiednią objętość buforu Lysis Buffer (AL), przenosząc go ostrożnie pipetą lub stosując odpowiednią pipetę.


 Nie dodawać proteazy QIAGEN Protease (QP) bezpośrednio do buforu Lysis Buffer (AL).

4. **Inkubować w temperaturze 56°C (±1°C) przez 10 minut (±1 minuta).**
5. **Wirować probówkę do lizy (LT) przez ≥5 sekund przy pełnej prędkości, aby usunąć krople z wnętrza wieczka.**
6. **Dodać 200 µl etanolu (96–100%) do probówki do lizy (LT), zamknąć wieczko i dokładnie wymieszać, wytrząsając pulsacyjnie przez ≥15 sekund.**
7. **Wirować probówkę do lizy (LT) przez ≥5 sekund przy pełnej prędkości, aby usunąć krople z wnętrza wieczka.**
8. **Włożyć kolumnę wirówkową QIAamp Mini do złącza VacConnector (VC) w systemie próżniowym. Upewnić się, że główny zawór próżniowy (między systemem próżniowym a kolektorem próżniowym) i zawór nakrętki (na kolektorze próżniowym) jest zamknięty. Włączyć pompę Vacuum Pump.**

Wyrzucić probówkę do płukania (wash tube, WT) (2 ml), w której znajduje się kolumna wirówkowa QIAamp Mini w blisterze.





Próżnia jest stosowana wyłącznie do systemu łączącego (jeśli jest używany), a nie do kolektora próżniowego.

9. **Ostrożnie nanieść cały lizat z etapu 7. na kolumnę wirówkową QIAamp Mini bez zamaczania brzegu. Unikać dotykania membrany kolumny wirówkowej QIAamp Mini końcówką pipety.**

 W przypadku przetwarzania kilku próbek należy otwierać tylko jedną probówkę do lizy (LT) naraz.

- 10. Otworzyć główny zawór próżniowy. Po przejściu lizatu przez kolumnę wirówkową QIAamp Mini należy zamknąć główny zawór próżniowy i otworzyć zawór nakrętki na kolektorze próżniowym, aby odpowietrzyć kolektor. Zamknąć zawór nakrętki na kolektorze próżniowym po przywróceniu normalnego ciśnienia w kolektorze.**


Po zamknięciu głównego zaworu próżniowego, próżnia jest stosowana wyłącznie do systemu łączącego (jeśli jest używany), a nie do kolektora próżniowego.

-  Użyć zaworu nakrętki na kolektorze próżniowym, aby szybko przywrócić normalne ciśnienie.
-  Jeśli jednocześnie przetwarzanych jest kilka kolumn wirówkowych QIAamp Mini, zalecamy zamknięcie zaworu VacValve każdej kolumny po przejściu lizatu, aby skrócić czas trwania tego etapu próżniowego.
-  Jeśli lizat nie przeszedł w całości przez membranę po upływie 10 minut, należy umieścić kolumnę wirówkową QIAamp Mini w czystej probówce do płukania (WT), zamknąć wieczko, a następnie wirować przy 6000 x g (8000 rpm) przez 3 minuty lub do całkowitego przejścia lizatu przez membranę. Umieścić kolumnę wirówkową QIAamp Mini w kolejnej czystej probówce do płukania (WT) i przejść do 10. etapu protokołu na stronie 24.
-  Jeśli lizat nie przeszedł w całości przez membranę po odwirowaniu, wyrzucić próbkę i powtórzyć izolację i oczyszczanie, używając nowego materiału próbki, rozpoczynając od 1. etapu na stronie 20.


- 11. Nanieść 750 µl buforu Wash Buffer 1 (AW1) na kolumnę wirówkową QIAamp Mini bez zamaczania brzegu. Unikać dotykania membrany kolumny wirówkowej QIAamp Mini końcówką pipety. Pozostawić otwarte wieczko kolumny i otworzyć główny zawór próżniowy. Po przejściu buforu Wash Buffer 1 (AW1) przez kolumnę wirówkową QIAamp Mini należy zamknąć główny zawór próżniowy i otworzyć zawór nakrętki, aby odpowietrzyć kolektor. Zamknąć zawór nakrętki na kolektorze próżniowym po przywróceniu normalnego ciśnienia w kolektorze.**

- 12. Nanieść 750 µl buforu Wash Buffer 2 (AW2) na kolumnę wirówkową QIAamp Mini bez zamaczania brzegu. Unikać dotykania membrany kolumny wirówkowej QIAamp Mini końcówką pipety. Pozostawić otwarte wieczko kolumny i otworzyć główny zawór próżniowy. Po przejściu buforu Wash Buffer 2 (AW2) przez kolumnę wirówkową QIAamp Mini należy zamknąć główny zawór próżniowy i otworzyć zawór nakrętki, aby odpowietrzyć kolektor. Zamknąć zawór nakrętki na kolektorze próżniowym po przywróceniu normalnego ciśnienia w kolektorze.**

**13. Zamknąć wieczko kolumny wirówkowej QIAamp Mini, wyjąć ją z systemu próżniowego i wyrzucić złącze VacConnector (VC). Umieścić kolumnę wirówkową QIAamp Mini w czystej probówce do płukania (WT) i wirować przy pełnej prędkości (około 20 000 x g lub 14 000 rpm) przez 3 minuty, aby całkowicie osuszyć membranę.**

 Pominięcie odwirowania do sucha może spowodować inhibicję dalszego oznaczenia.

**14. Umieścić kolumnę wirówkową QIAamp Mini w czystej probówce do elucji (ET) i wyrzucić probówkę do płukania (WT) zawierającą przesącz. Ostrożnie otworzyć wieczko kolumny wirówkowej QIAamp Mini i nanieść od 50 do 200 µl buforu Elution Buffer (AE) na środek membrany. Zamknąć wieczko i inkubować w temperaturze pokojowej (15–25°C) przez 1 minutę. Wirować przy 6000 x g (8000 rpm) przez 1 minutę w celu elucji DNA.**

 Po zakończeniu tego protokołu należy postępować według procedury konserwacji dla systemu próżniowego (więcej informacji zawiera instrukcja obsługi dostarczona razem z systemem próżniowym).

## Protokół: Izolacja i oczyszczanie genomowego DNA z próbek krwi za pomocą mikrowirówki

Do izolacji i oczyszczania genomowego DNA z próbek krwi pełnej o objętości 200 µl traktowanych EDTA lub cytrynianem za pomocą mikrowirówki

### Ważne informacje przed rozpoczęciem

- Poniższa procedura zawiera instrukcje dotyczące przetwarzania pojedynczej próbki krwi. Możliwe jest jednak przetwarzanie wielu próbek jednocześnie; liczba ta zależy od pojemności używanej mikrowirówki.

### Czynności do wykonania przed rozpoczęciem

- Doprowadzić próbki krwi do temperatury pokojowej (15–25°C) i upewnić się, że są dobrze wymieszane.
- Jeśli w buforze Lysis Buffer (AL) wytrącił się osad, rozpuścić go, inkubując bufor w temperaturze 56°C.
- Upewnić się, że bufony Wash Buffer 1 (AW1) i Wash Buffer 2 (AW2) oraz proteaza QIAGEN Protease (QP) zostały przygotowane zgodnie z instrukcjami w części „Przygotowywanie odczynników i buforów” na stronach 14 i 15.
- Doprowadzić bufor Elution Buffer (AE) do temperatury pokojowej (15–25°C) do użycia w etapie 15.
- Ustawić blok grzewczy na temperaturę 56°C do użycia w etapie 4.
- Procedury kontroli jakości firmy QIAGEN wykorzystują funkcjonalne testy dopuszczania zestawów dla każdej serii zestawów. Z tego względu nie należy mieszać odczynników z różnych serii zestawów i nie łączyć poszczególnych odczynników z różnych serii odczynników.

### Procedura

- 1. Za pomocą pipety przenieść 20 µl proteazy QIAGEN Protease (QP) do próbki do lizy (LT).**



Przed użyciem należy sprawdzić datę ważności zrekonstruowanej proteazy.

- 2. Dodać 200 µl próbki krwi do próbki do lizy (LT).**
- 3. Dodać 200 µl buforu Lysis Buffer (AL) do próbki do lizy (LT), zamknąć wieczko i wymieszać, wytrząsając pulsacyjnie przez 15 sekund.**

Aby zapewnić skuteczną lizę, istotne jest, aby próbka i bufor Lysis Buffer (AL) były dobrze wymieszane i tworzyły homogenny roztwór.

**i** Ze względu na to, że bufor Lysis Buffer (AL) ma dużą lepkość, należy upewnić się, że dodano odpowiednią objętość buforu Lysis Buffer (AL), przenosząc go ostrożnie pipetą lub stosując odpowiednią pipetę.

**i** Nie dodawać proteazy QIAGEN Protease (QP) bezpośrednio do buforu Lysis Buffer (AL).

- 4. Inkubować w temperaturze 56°C (±1°C) przez 10 minut (±1 minuta).**
- 5. Wirować próbkę do lizy (LT) przez ≥5 sekund przy pełnej prędkości, aby usunąć krople z wnętrza wieczka.**
- 6. Dodać 200 µl etanolu (96–100%) do próbki do lizy (LT), zamknąć wieczko i dokładnie wymieszać, wytrząsając pulsacyjnie przez ≥15 sekund.**
- 7. Wirować próbkę do lizy (LT) przez ≥5 sekund przy pełnej prędkości, aby usunąć krople z wnętrza wieczka.**
- 8. Ostrożnie nanieść cały lizat z etapu 7. na kolumnę wirówkową QIAamp Mini bez zamaczania brzegu. Unikać dotykania membrany kolumny wirówkowej QIAamp Mini końcówką pipety.**

**i** W przypadku przetwarzania kilku próbek należy otwierać tylko jedną próbkę do lizy (LT) naraz.

- 9. Zamknąć wieczko kolumny wirówkowej QIAamp Mini i wirować przy około 6000 x g przez 1 minutę. Umieścić kolumnę wirówkową QIAamp Mini w czystej próbce do płukania (WT) i wyrzucić próbkę zawierającą przesącz.**

**i** Jeśli lizat nie przeszedł całkowicie przez kolumnę po odwirowaniu przy 6000 x g (8000 rpm), należy ponownie wirować kolumnę przy maksymalnej prędkości (do 20 800 x g) przez 1 minutę.

**i** Jeśli lizat nie przeszedł w całości przez membranę po odwirowaniu, wyrzucić próbkę i powtórzyć izolację i oczyszczanie, używając nowego materiału próbki, rozpoczynając od 1. etapu na stronie 23.

- 10. Ostrożnie otworzyć kolumnę wirówkową QIAamp Mini i dodać 500 µl buforu Wash Buffer 1 (AW1) bez zamaczania brzegu. Unikać dotykania membrany kolumny wirówkowej QIAamp Mini końcówką pipety.**
- 11. Zamknąć wieczko kolumny wirówkowej QIAamp Mini i wirować przy około 6000 x g przez 1 minutę. Umieścić kolumnę wirówkową QIAamp Mini w czystej próbce do płukania (WT) i wyrzucić próbkę zawierającą przesącz.**



12. Ostrożnie otworzyć kolumnę wirówkową QIAamp Mini i dodać 500 µl buforu Wash Buffer 2 (AW2) bez zamaczania brzegu. Unikać dotykania membrany kolumny wirówkowej QIAamp Mini końcówką pipety.
13. Zamknąć wieczko kolumny wirówkowej QIAamp Mini i wirować przy pełnej prędkości (około 20 000 x g lub 14 000 rpm) przez 1 minutę. Umieścić kolumnę wirówkową QIAamp Mini w czystej probówce do płukania (WT) i wyrzucić probówkę zawierającą przesącz.
14. Wirować przy pełnej prędkości (około 20 000 x g lub 14 000 rpm) przez 3 minuty w celu całkowitego osuszenia membrany.



Pominięcie odwirowania do sucha może spowodować inhibicję dalszego oznaczenia.

15. Umieścić kolumnę wirówkową QIAamp Mini w czystej probówce do elucji (ET) i wyrzucić probówkę do płukania (WT) zawierającą przesącz. Ostrożnie otworzyć wieczko kolumny wirówkowej QIAamp Mini i nanieść od 50 do 200 µl buforu Elution Buffer (AE) na środek membrany. Zamknąć wieczko i inkubować w temperaturze pokojowej (15–25°C) przez 1 minutę. Wirować przy około 6000 x g (8000 rpm) przez 1 minutę w celu elucji DNA.

## Kontrola jakości

Zgodnie z poświadczonym certyfikatem ISO systemem zarządzania jakością firmy QIAGEN każda seria zestawu QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit jest testowana pod kątem wstępnie ustalonych specyfikacji w celu zapewnienia spójnej jakości produktu.

## Ograniczenia

Skuteczność systemu ustalono przy użyciu próbek krwi pełnej do izolacji genomowego DNA.

Użytkownik jest odpowiedzialny za walidację skuteczności systemu pod kątem wszelkich procedur stosowanych w danym laboratorium, które nie są objęte badaniami wydajności wykonanymi przez firmę QIAGEN.

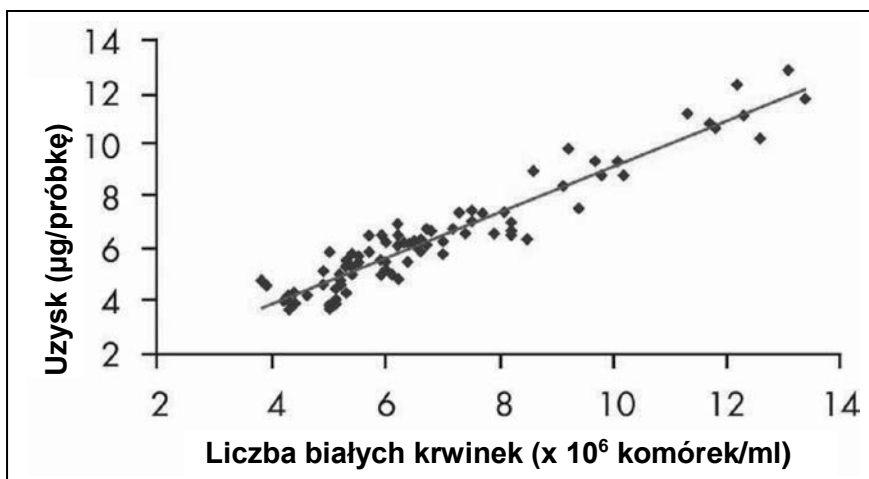
W celu zminimalizowania ryzyka negatywnego wpływu na wyniki diagnostyczne należy stosować odpowiednie kontrole do dalszych zastosowań. W celu dalszej walidacji zalecane jest przestrzeganie wytycznych Międzynarodowej Konferencji ds. Harmonizacji Wymagań Technicznych (ICH) dostępnych w przewodniku *ICH Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text And Methodology*.

Wszelkie uzyskane wyniki diagnostyczne należy interpretować w połączeniu z innymi wynikami badań klinicznych i laboratoryjnych.

## Parametry skuteczności

### Uzysk oczyszczonego DNA

Zakres liniowy uzysku DNA za pomocą procedury próżniowej QIAamp DSP DNA Blood Mini określono na podstawie próbek krwi pobranych od zdrowych dawców, w których liczba białych krwinek wynosiła  $3,8 \times 10^6$ – $1,34 \times 10^7$  komórek/ml (Ryc. 5, strona 27).



**Ryc. 5. Zakres liniowy uzysku DNA za pomocą procedury próżniowej QIAamp DSP DNA Blood Mini przy objętości elucji równej 200 µl.** Określono liczbę białych krwinek w krwi zdrowych dawców i mieściła się ona w zakresie od  $3,8 \times 10^6$ – $1,34 \times 10^7$  komórek/ml. DNA oczyszczono z próbek krwi za pomocą procedury próżniowej QIAamp DSP DNA Blood Mini przy objętości elucji równej 200 µl. Przetworzono osiemdziesiąt siedem próbek w trzech powtórzeniach.

## Skuteczność w dalszych oznaczeniach

Eluowane genomowe DNA jest gotowe do użytku w dalszych różnych oznaczeniach, w tym różnorodnych dalszych oznaczeniach diagnostycznych *in vitro* (Tabele 2–6). Określono wpływ objętości elucji oraz objętości eluatu używanego do reakcji PCR na skuteczność reakcji PCR (patrz Tabela 7).

**Tabela 2. Typowanie HLA za pomocą oznaczeń Dynal® AllSet™ wykonywanych metodą SSP (metoda swoistych starterów — sequence specific primers) o „małym stopniu rozdzielczości” dla HLA-A, „małym stopniu rozdzielczości” dla HLA-B, „małym stopniu rozdzielczości” dla DR i „małym stopniu rozdzielczości” dla DQ**

Locus HLA A		Locus HLA B		Locus HLA DR		Locus HLA DQ	
Genotyp	L.	Genotyp	L.	Genotyp	L.	Genotyp	L.
A2/A3	2	B51, B51/ B13 lub B51/B27	1	DR1/DR3	1	DQ2	1
A3/A1	1	B13/B35	1	DR3 lub DR3/DR13	1	DQ2/DQ3	2
A3/A25	1	B8/B27	1	DR3/DR7	1	DQ6	1
A2/A24	2	B7/B13 lub B7/B15	1	DR7/DR15	2	DQ2/DQ5	1
A1/A2	2	B7/B18	1	DR4/DR15	1	DQ2/DQ5	2
A30/A68	1	B7/B44	1	DR4/DR7	1	DQ3	1
A2/A32	1	Inny	0	DR4	1	DQ3/DQ6	2
Inny	0			DR15	1	Inny	0
				DR1/DR7	1		
				Inny	0		

Próbki krwi pełnej pobrano od odrębnych dawców i oczyszczono genomowe DNA z próbek krwi pełnej o objętości 200 µl za pomocą zestawu QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit. Allele zidentyfikowano jako wskazane loci u podanej liczby pacjentów za pomocą oznaczeń Dynal AllSet<sup>+</sup> wykonywanych metodą SSP (Dynal Biotech). L.: liczba pacjentów.

**Tabela 3. Genotypowanie czynnika V Leiden (factor V, FV) za pomocą zestawu LightCycler® Factor V Leiden Mutation Detection Kit**

<b>Genotyp</b>	<b>Liczba</b>
Typ dziki	17
FV G1691 A — mutacja heterozygotyczna	13
FV G1691 A — mutacja homozygotyczna	0

Próbki krwi pełnej pobrano od 30 odrębnych dawców i oczyszczono genomowe DNA z próbek krwi pełnej o objętości 200 µl za pomocą zestawu QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit. Status alleliczny w obrębie locus FV G1691 A określono za pomocą zestawu LightCycler Factor V Leiden Mutation Detection Kit (Roche Group).

**Tabela 4. Genotypowanie czynnika V Leiden (FV) za pomocą reakcji PCR z pomiarem fluorescencji w punkcie końcowym (tzw. endpoint PCR) oraz analizy Pyrosequencing® wykonywanej za pomocą zestawu PSQ-96 SNP-Reagent Kit w systemie Pyrosequencing PSQ 96MA**

<b>Genotyp</b>	<b>Liczba</b>
Typ dziki	17
FV G1691 A — mutacja heterozygotyczna	13
FV G1691 A — mutacja homozygotyczna	0

Próbki krwi pełnej pobrano od 30 odrębnych dawców i oczyszczono genomowe DNA z próbek krwi pełnej o objętości 200 µl za pomocą zestawu QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit. Status alleliczny w obrębie locus FV G1691 A określono za pomocą reakcji PCR z pomiarem fluorescencji w punkcie końcowym oraz analizy Pyrosequencing wykonywanej za pomocą zestawu PSQ-96 SNP-Reagent Kit w systemie Pyrosequencing PSQ 96MA (Biotage).

**Tabela 5. Genotypowanie protrombiny (prothrombin, PT) przy użyciu reakcji PCR z pomiarem fluorescencji w punkcie końcowym oraz analizy Pyrosequencing wykonywanej za pomocą zestawu PSQ-96 SNP Reagent Kit w systemie Pyrosequencing PSQ 96MA**

<b>Genotyp</b>	<b>Liczba</b>
Typ dziki	30
PT G20210A — mutacja heterozygotyczna	0
PT G20210A — mutacja homozygotyczna	0

Próbki krwi pełnej pobrano od 30 odrębnych dawców i oczyszczono genomowe DNA z próbek krwi pełnej o objętości 200 µl za pomocą zestawu QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit. Status alleliczny w obrębie locus PT G20210A określono przy użyciu reakcji PCR z pomiarem fluorescencji w punkcie końcowym oraz analizy Pyrosequencing wykonywanej za pomocą zestawu PSQ-96 SNP Reagent Kit w systemie Pyrosequencing PSQ 96MA (Biotage).

**Tabela 6. Analiza wariantów polimorficznych genu ApoE, T112C i C158T, przy użyciu reakcji PCR z pomiarem fluorescencji w punkcie końcowym, sekwencjonowania ampliconu za pomocą zestawu BigDye™ v1.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit oraz rozdziału w analizatorze ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer**

<b>Genotyp</b>	<b>Liczba</b>
ApoE*3/*3	5
ApoE*3/*4	5
Inny	0

Próbki krwi pełnej pobrano od 10 odrębnych dawców i oczyszczono genomowe DNA z próbek krwi pełnej o objętości 200 µl za pomocą zestawu QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit. Analiza wariantów polimorficznych genu ApoE, T112C i C158T, wykonana została przy użyciu reakcji PCR z pomiarem fluorescencji w punkcie końcowym, sekwencjonowania ampliconu za pomocą zestawu BigDye v1.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit oraz rozdziału w analizatorze ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Life Technologies Corporation).

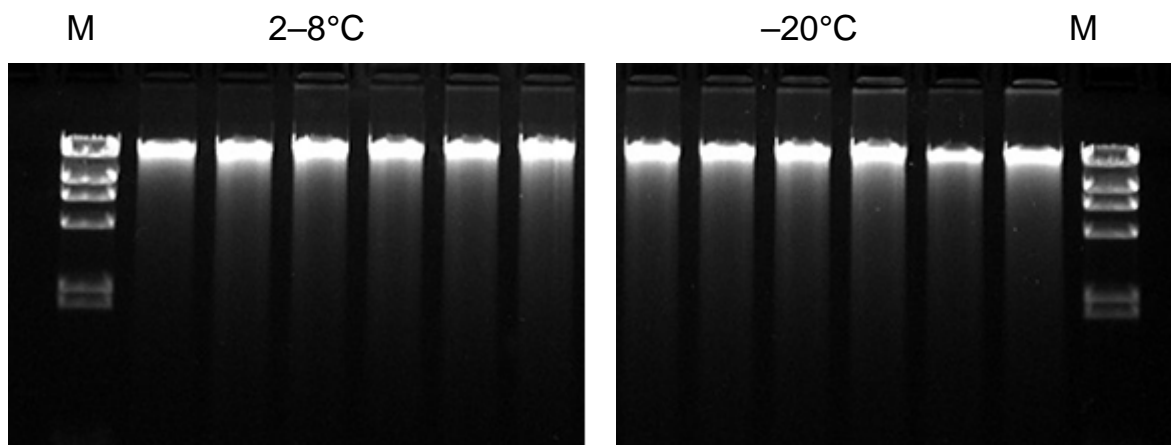
**Tabela 7. Wpływ objętości elucji oraz objętości eluatu używanego w reakcji PCR na skuteczność reakcji PCR**

Objętość elucji	Objętość eluatu na 50 µl próbki poddawanej reakcji PCR*		
	2 µl	5 µl	10 µl
50 µl	100%	100%	100%
100 µl	100%	100%	97%
200 µl	100%	100%	100%

\* Wartości przedstawiają wskaźnik udanych odczytów reakcji PCR i reprezentują średnią z 48 próbek.

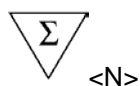
### Stabilność eluatu

W badaniach przechowywania wykonywanych z eluatami uzyskanymi za pomocą zestawu QIAamp DNA Blood Mini Kit, zestawu do ogólnego zastosowania laboratoryjnego, w którym wykorzystywana jest identyczna technologia, wykazano, że DNA eluowane z kolumn wirówkowych QIAamp Mini w buforze AE zachowało stabilność przez 8 lat w przypadku przechowywania w temperaturze 5°C lub -20°C (Ryc. 6). Jednakże długoterminowe badania stabilności eluatów uzyskanych za pomocą zestawu QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit wciąż trwają.



**Ryc. 6. Długoterminowa stabilność DNA wyizolowanego i oczyszczonego za pomocą kolumn wirówkowych QIAamp Mini.** DNA oczyszczone za pomocą zestawu QIAamp DNA Blood Mini Kit, eluowano w 200 µl buforu AE i przechowywano w temperaturze 2–8°C lub -20°C przez 8 lat. Próbkę DNA analizowano w żelu agarozowym barwionym bromkiem etydyny. **M:** marker.

## Symbole



Zawiera odczynniki wystarczające do wykonania <N> przygotowań próbek



Data ważności



Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro



Po otrzymaniu



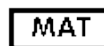
Otworzyć w momencie dostawy; kolumny wirówkowe QIAamp Mini przechowywać w temperaturze 2–8°C



Numer katalogowy



Numer serii



Numer materiału



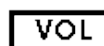
Składniki



Zawiera



Liczba



Objętość



Zakres temperatury



Producent



Po dodaniu etanolu do butelki zapisać bieżącą datę


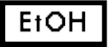



Dodawanie



Liofilizowane



<b>RCNS</b>	Rekonstruować w
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>GuHCl</b>	Chlorowodorek guanidyny
<b>SUBT</b>	Subtylizyna
	Prowadzi do
	Zapoznać się z instrukcją użycia
	Ważna informacja

## Literatura

Firma QIAGEN udostępnia obszerną, aktualną internetową bazę danych publikacji naukowych dotyczących produktów QIAGEN. Zaawansowane opcje wyszukiwania umożliwiają znajdowanie potrzebnych artykułów według słów kluczowych lub zastosowań, obszarów badań, tytułów itp.

W celu uzyskania listy pozycji literaturowych należy odwiedzić internetową bazę danych firmy QIAGEN pod adresem [www.qiagen.com/RefDB/search.asp](http://www.qiagen.com/RefDB/search.asp) lub skontaktować się z działem pomocy technicznej firmy QIAGEN lub lokalnym dystrybutorem firmy QIAGEN.

## Informacje kontaktowe

W firmie QIAGEN szcycimy się jakością i dostępnością naszej pomocy technicznej. W naszych działach pomocy technicznej pracują doświadczeni naukowcy o rozległej wiedzy praktycznej i teoretycznej w dziedzinie technologii postępowania z próbkami i wykonywania oznaczeń oraz stosowania produktów firmy QIAGEN. W razie jakichkolwiek pytań lub trudności dotyczących zestawu QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit lub produktów firmy QIAGEN prosimy o kontakt.

Klienci firmy QIAGEN są głównym źródłem informacji odnośnie do zaawansowanych lub wyspecjalizowanych zastosowań naszych produktów. Informacje takie są pomocne dla innych naukowców, jak również dla badaczy w firmie QIAGEN. Dlatego zachęcamy do kontaktu z nami w razie jakichkolwiek sugestii odnośnie skuteczności produktów lub nowych zastosowań i technik.

W celu uzyskania pomocy technicznej lub szczegółowych informacji należy odwiedzić witrynę naszego Centrum pomocy technicznej pod adresem [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support) lub skontaktować się z jednym z działów pomocy technicznej firmy QIAGEN lub lokalnym dystrybutorem (patrz tylna okładka lub strona [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden, Niemcy

## Informacje dotyczące zamawiania

Produkt	Spis treści	Nr kat.
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (50)	Na 50 przygotowań DNA: kolumny wirówkowe QIAamp Mini, złącza VacConnector, proteaza QIAGEN Protease, odczynniki, bufony i probówki do pobierania próbek	61104
<b>Akcesoria</b>		
QIAvac 24 Plus vacuum manifold*	Kolektor próżniowy do przetwarzania 1–24 kolumn wirówkowych: kolektor QIAvac 24 Plus Vacuum manifold, złącza typu Luer, szybkozłączki	19413
Vacuum Pump*	Uniwersalna pompa Vacuum Pump	84020

Aktualne informacje licencyjne oraz dotyczące wyłączenia odpowiedzialności dla poszczególnych produktów znajdują się w odpowiedniej instrukcji obsługi lub podręczniku użytkownika zestawu QIAGEN. Instrukcje obsługi lub podręczniki użytkownika zestawu QIAGEN są dostępne w witrynie [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Można je także zamówić w serwisie lub u lokalnego dystrybutora firmy QIAGEN.

\* Do użytku z protokołami próżniowymi.



Znaki towarowe: QIAGEN®, QIAamp®, QIAcube®, *artus*®, Pyrosequencing® (QIAGEN Group); ABI PRISM®, BigDye™ (Life Technologies Corporation); BD™, Vacutainer® (Becton, Dickinson and Company); Bio-One®, Vacuette® (Greiner Bio-One); Dynal®, *AllSe+*™ (Dynal Biotech); Eppendorf® (Eppendorf AG); LightCycler® (Roche Group); Monovette®, Sarstedt® (Sarstedt AG & Co.). Zastrzeżonych nazw, znaków towarowych itd. wykorzystywanych w niniejszym dokumencie, nawet jeżeli nie zostały oznaczone jako zastrzeżone, nie można uważać za niechronione przepisami prawa.

#### **Ograniczona umowa licencyjna dla zestawu QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit**

Korzystanie z tego produktu oznacza zgodę nabywcy lub użytkownika produktu na następujące warunki:

1. Niniejszy produkt może być użytkowany wyłącznie zgodnie z protokołem dołączonym do produktu oraz niniejszą instrukcją i wyłącznie ze składnikami znajdującymi się w tym zestawie. Firma QIAGEN nie udziela żadnej licencji w zakresie praw własności intelektualnej do użytkowania niniejszego zestawu ze składnikami nienależącymi do zestawu, z wyjątkiem przypadków opisanych w protokołach dołączonych do produktu, niniejszej instrukcji oraz dodatkowych protokołach dostępnych na stronie [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Niektóre dodatkowe protokoły zostały sformułowane przez użytkowników rozwiązań QIAGEN z myślą o innych użytkownikach rozwiązań QIAGEN. Takie protokoły nie zostały dokładnie przetestowane, ani poddane procesowi optymalizacji przez firmę QIAGEN. Firma QIAGEN nie gwarantuje, że nie naruszają one praw osób trzecich.
2. Firma QIAGEN nie gwarantuje, że niniejszy zestaw i/lub jego użytkowanie nie narusza praw osób trzecich. Wyjątek stanowią jedynie wyraźnie określone licencje.
3. Zestaw oraz jego składniki są przeznaczone do jednorazowego użytku, nie można ich ponownie używać, regenerować ani odsprzedawać.
4. Firma QIAGEN nie udziela innych licencji wyrażonych lub dorozumianych poza tymi, które są wyraźnie określone.
5. Nabywca i użytkownik zestawu zobowiązuje się nie podejmować działań ani nie zezwalać innym osobom na podejmowanie działań, które mogą doprowadzić do wykonania lub umożliwić wykonanie zabronionych czynności wymienionych powyżej. Firma QIAGEN może wyegzekwować przestrzeganie zakazów niniejszej Umowy ograniczonej licencji i wnieść sprawę do dowolnego sądu i ma prawo zażądać zwrotu kosztów wszelkich postępowań i kosztów sądowych, w tym wynagrodzeń prawników, związanych z egzekwowaniem postanowień Umowy ograniczonej licencji lub wszelkich praw własności intelektualnej w odniesieniu zestawu i/lub jego składników.

Aktualne warunki licencyjne dostępne są na stronie [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

© 2012 QIAGEN, wszelkie prawa zastrzeżone.

---

[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

Australia ■ [techservice-au@qiagen.com](mailto:techservice-au@qiagen.com)

Austria ■ [techservice-at@qiagen.com](mailto:techservice-at@qiagen.com)

Belgium ■ [techservice-bnl@qiagen.com](mailto:techservice-bnl@qiagen.com)

Brazil ■ [suportetecnico.brasil@qiagen.com](mailto:suportetecnico.brasil@qiagen.com)

China ■ [techservice-cn@qiagen.com](mailto:techservice-cn@qiagen.com)

Denmark ■ [techservice-nordic@qiagen.com](mailto:techservice-nordic@qiagen.com)

Finland ■ [techservice-nordic@qiagen.com](mailto:techservice-nordic@qiagen.com)

France ■ [techservice-fr@qiagen.com](mailto:techservice-fr@qiagen.com)

Germany ■ [techservice-de@qiagen.com](mailto:techservice-de@qiagen.com)

Hong Kong ■ [techservice-hk@qiagen.com](mailto:techservice-hk@qiagen.com)

India ■ [techservice-india@qiagen.com](mailto:techservice-india@qiagen.com)

Ireland ■ [techservice-uk@qiagen.com](mailto:techservice-uk@qiagen.com)

Italy ■ [techservice-it@qiagen.com](mailto:techservice-it@qiagen.com)

Japan ■ [techservice-jp@qiagen.com](mailto:techservice-jp@qiagen.com)

Korea (South) ■ [techservice-kr@qiagen.com](mailto:techservice-kr@qiagen.com)

Luxembourg ■ [techservice-bnl@qiagen.com](mailto:techservice-bnl@qiagen.com)

Mexico ■ [techservice-mx@qiagen.com](mailto:techservice-mx@qiagen.com)

The Netherlands ■ [techservice-bnl@qiagen.com](mailto:techservice-bnl@qiagen.com)

Norway ■ [techservice-nordic@qiagen.com](mailto:techservice-nordic@qiagen.com)

Singapore ■ [techservice-sg@qiagen.com](mailto:techservice-sg@qiagen.com)

Sweden ■ [techservice-nordic@qiagen.com](mailto:techservice-nordic@qiagen.com)

Switzerland ■ [techservice-ch@qiagen.com](mailto:techservice-ch@qiagen.com)

UK ■ [techservice-uk@qiagen.com](mailto:techservice-uk@qiagen.com)

