

QIAamp® DSP Circulating NA Kit Gebrauchsanweisung (Handbuch)



50

Version 2



In-vitro-Diagnostikum



61504



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Deutschland



1127632DE

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Verwendungszweck | 4 |
| Vorgesehene Anwender | 4 |
| Beschreibung und Prinzip | 5 |
| Probenvolumina | 5 |
| Lysieren der Proben | 7 |
| Adsorption an die Membran der QIAamp Mini-Säule | 7 |
| Entfernung verbliebener Kontaminanten | 7 |
| Elution der reinen Nukleinsäuren | 8 |
| Ausbeute und Größe der Nukleinsäuren..... | 8 |
| Beschreibung der Protokolle..... | 9 |
| Zusammenfassung und Erläuterung | 9 |
| Im Lieferumfang enthaltene Materialien | 10 |
| Kit-Inhalt | 10 |
| Bestandteile des Kits | 11 |
| Erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien | 12 |
| Zusätzliche Reagenzien..... | 12 |
| Verbrauchsmaterialien | 12 |
| Ausstattung/Geräte | 13 |
| Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen | 14 |
| Sicherheitshinweise..... | 14 |
| Informationen für Notfälle..... | 15 |
| Vorsichtsmaßnahmen | 15 |

| | |
|--|----|
| Entsorgung | 16 |
| Lagerung und Handhabung der Reagenzien | 17 |
| Stabilität nach dem Öffnen | 17 |
| Lagerung und Handhabung der Spezimen | 18 |
| Verfahren | 19 |
| Vorbereitung von Puffern und Reagenzien | 26 |
| „Breeze“-Protokoll: Aufreinigung zirkulierender Nukleinsäuren aus 1–5 ml Humanblutplasma | 29 |
| Klassisches Protokoll: Aufreinigung zirkulierender Nukleinsäuren aus 1–5 ml Humanblutplasma | 34 |
| Qualitätskontrolle | 39 |
| Anwendungseinschränkungen | 39 |
| Leistungsmerkmale | 40 |
| Literatur | 41 |
| Hilfe zur Fehlerbehebung | 42 |
| Symbole | 45 |
| Anhang A: Empfehlungen für die Blutplasmatreinnung und -aufbewahrung | 48 |
| Anhang B: Allgemeine Hinweise zur Handhabung von RNA | 50 |
| Bestellinformationen | 51 |
| Bearbeitungshistorie des Dokuments | 52 |

Verwendungszweck

Das QIAamp DSP Circulating NA Kit ist ein System zur manuellen Isolierung und Aufreinigung zirkulierender zellfreier DNA und RNA aus humanen Blutplasmaproben unter Anwendung der Silikamembran-Technologie (QIAamp-Technologie).

Das QIAamp DSP Circulating NA Kit ist für den in-vitro-diagnostischen Gebrauch vorgesehen.

Vorgesehene Anwender

Das Produkt darf nur von Fachpersonal wie technischen Angestellten und Ärzten, die in der Anwendung molekularbiologischer Techniken geschult sind, verwendet werden.

Beschreibung und Prinzip

Das QIAamp DSP Circulating NA-Verfahren umfasst 4 Schritte (Lysieren, Binden, Waschen und Eluieren) und wird unter Verwendung von QIAamp Mini-Säulen auf dem QIAvac-System durchgeführt. Dieses robuste Verfahren hilft dabei, Kreuzkontaminationen von Probe zu Probe zu minimieren und erhöht die Anwendersicherheit bei Verarbeitung potenziell infektiöser Proben.

Das unkomplizierte Verfahren eignet sich für die gleichzeitige Verarbeitung von bis zu 24 Proben in weniger als 2 Stunden.

Probenvolumina

QIAamp Mini-Säulen binden fragmentierte Nukleinsäuren von nur 20 nt Länge, aber die Ausbeute ist abhängig vom Probenvolumen und der Konzentration zirkulierender Nukleinsäuren in der Probe (üblicherweise 1–100 ng/ml in Plasma). Das QIAamp DSP Circulating NA-Verfahren wurde für Probenvolumina von bis zu 5 ml optimiert.

Das Verfahren mit dem QIAamp
DSP Circulating NA Kit

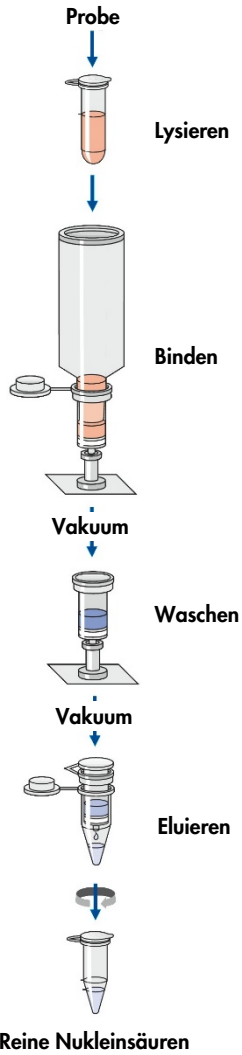


Abbildung 1. Überblick über das Verfahren mit dem QIAamp DSP Circulating NA Kit.

Lysieren der Proben

Frei zirkulierende Nukleinsäuren in biologischen Flüssigkeiten sind zumeist an Proteine gebunden oder in Vesikeln eingeschlossen. Aus diesem Grund ist ein effizienter Lyseschritt erforderlich, um die Nukleinsäuren freizusetzen und eine selektive Bindung an die QIAamp Mini-Säule zu ermöglichen. Dafür werden die Proben unter stark denaturierenden Bedingungen bei erhöhter Temperatur und in Anwesenheit von Proteinase K und Buffer ACL lysiert. Diese Behandlung gewährleistet die Inaktivierung von DNasen und RNasen und setzt an Proteine oder Lipide gebundene oder in Vesikeln eingeschlossene Nukleinsäuren frei.

Adsorption an die Membran der QIAamp Mini-Säule

Um eine optimale Bindung der zirkulierenden Nukleinsäuren an die Membran zu ermöglichen, werden die Bindungsbedingungen durch Versetzen des Lysats mit Buffer ACB eingestellt. Die Lysate werden dann auf eine QIAamp Mini-Säule gegeben, wo die zirkulierenden Nukleinsäuren aus einem großen Volumen auf der Silicamembran adsorbiert werden, während das Lysat durch Vakuumdruck durch die Säule gesogen wird. Salz- und pH-Bedingungen sorgen dafür, dass ein Großteil der Proteine und andere Kontaminanten, welche die PCR sowie weitere nachgelagerte Enzymreaktionen inhibieren können, nicht auf der Membran der QIAamp Mini-Säule zurückbleiben.

Für das Protokoll werden ein Vakuumverteiler (z. B. der QIAvac 24 Plus mit dem QIAvac Connecting System) sowie eine Vakuumpumpe, die ein Vakuum von ~800–900 mbar erzeugen kann (z. B. die QIAGEN® Vacuum Pump), benötigt. Für die einfache Überwachung des Vakuumdrucks und einen leichten Vakuumabbau sollte ein Vacuum Regulator (Teil des QIAvac Connecting System) verwendet werden.

Entfernung verbliebener Kontaminanten

Die Nukleinsäuren bleiben an die Membran gebunden, während Kontaminanten in drei Waschschritten einfach weggespült werden.

Elution der reinen Nukleinsäuren

Die Elution erfolgt in Buffer AVE. In einem einzigen Schritt werden die hochreinen zirkulierenden Nukleinsäuren in Buffer AVE, der auf Raumtemperatur äquilibriert wurde, eluiert. Das Elutionsvolumen kann flexibel zwischen 50 und 150 µl gewählt werden. Wenn die Nukleinsäuren in höheren Konzentrationen benötigt werden, kann das Elutionsvolumen bis auf 20 µl reduziert werden. Elutionsvolumen unter 50 µl resultieren in Eluaten mit höher konzentrierten Nukleinsäuren, können aber die Ausbeute verringern.

Das eluierte Volumen kann bis zu 5 µl unter dem Volumen des auf die Säule applizierten Elutionspuffers liegen.

Ausbeute und Größe der Nukleinsäuren

Die Ausbeute an frei zirkulierenden Nukleinsäuren, die aus biologischen Proben isoliert wurden, liegt normalerweise unter 1 µg; daher ist die Messung mit einem Spektralphotometer schwierig. Die absolute Ausbeute an zirkulierender DNA und RNA aus Proben, die mit dem QIAamp DSP Circulating NA Kit verarbeitet wurden, variiert zwischen Proben von verschiedenen Personen und hängt auch von anderen Faktoren ab (z. B. bestimmten Erkrankungen). Zudem ist es wahrscheinlich, dass die in den extrahierten Nukleinsäuren vorhandene Carrier-RNA das Ergebnis von Extinktionsmessungen bestimmt (siehe Seite 27). Zur Ermittlung der Ausbeute werden daher quantitative Amplifikationsmethoden empfohlen.

Die Größenverteilung der mit dem QIAamp DSP Circulating NA Kit aufgereinigten Nukleinsäuren kann mittels Agarose-Gelelektrophorese oder Hybridisierung an eine zielspezifische markierte Sonde (1) oder einer mikrofluidischen Elektrophoreselösung (z. B. Agilent® Bioanalyzer) überprüft werden.

Beschreibung der Protokolle

In diesem Handbuch werden zwei verschiedene Protokolle dargestellt.

- Das „Breeze“-Protokoll: Aufreinigung zirkulierender Nukleinsäuren aus 1–5 ml Humanblutplasma“ (Seite 29) ist für die Verarbeitung von bis zu 5 ml Plasma in 1-ml-Schritten vorgesehen. Es wurde für möglichst wenige manuelle Arbeitsschritte und eine kürzere Bearbeitungszeit optimiert.
- Das „Klassisches Protokoll: Aufreinigung zirkulierender Nukleinsäuren aus 1–5 ml Humanblutplasma“ (Seite 34) ist für die Verarbeitung von bis zu 5 ml Plasma in 1-ml-Schritten vorgesehen. Es handelt sich um das unveränderte Protokoll aus dem *QIAamp DSP Circulating NA Kit-Handbuch*, Version 1, Revision 3 (R3).

Zusammenfassung und Erläuterung

Frei zirkulierende Nukleinsäuren liegen in Humanplasma in der Regel in Form kurzer Fragmente von < 1000 bp (DNA), < 1000 nt (RNA) oder sogar nur 20 nt (miRNA) vor. Die Konzentration frei zirkulierender Nukleinsäuren in Humanblutplasma ist üblicherweise gering und variiert beträchtlich von Person zu Person. In Humanproben liegt sie zwischen 1 und 100 ng/ml (2–6).

Das QIAamp DSP Circulating NA Kit ermöglicht die effiziente Aufreinigung zirkulierender Nukleinsäuren aus Humanplasma. Zu verarbeitende Proben können frisch oder gefroren sein. Durch die Verwendung von Verlängerungsröhrchen und die Vakuumverarbeitung auf dem QIAvac 24 Plus sind anfängliche Probenvolumen von bis zu 5 ml möglich, während das Elutionsvolumen flexibel zwischen 20 und 150 µl variiert werden kann, um die Aufkonzentration von Nukleinsäurespezies, die in niedriger Konzentration vorliegen, zu ermöglichen.

Eluierte frei zirkulierende genomische DNA oder RNA kann direkt für nachgelagerte Anwendungen eingesetzt oder ohne weitere Bearbeitung gelagert werden. Anwendern wird empfohlen, Plasma-Eingabevolumen und Elutionsvolumen für ihr spezifisches Ziel und die nachgelagerte Applikation in ihrem Labor zu optimieren.

Im Lieferumfang enthaltene Materialien

Kit-Inhalt

| | |
|--------------------------------------|--------------|
| QIAamp DSP Circulating NA Kit | (50) |
| Katalog-Nr. | 61504 |
| Anzahl Präparationen | 50 |

| | Identität | Symbole | Menge |
|-------------|--|------------------------|----------|
| QIAamp Mini | QIAamp Mini columns with Wash Tubes (WT) (QIAamp Mini-Säulen mit Waschröhrchen) (2 ml) | COL | 50 |
| EXT | Column Extenders (Säulenerweiterungen) (20 ml) | COL EXT | 2 x 25 |
| WT | Wash Tubes (Waschröhrchen) (2 ml) | WASH TUBE | 50 |
| ET | Elution Tubes (Elutionsröhrchen) (1,5 ml) | ELU TUBE | 50 |
| VC | VacConnectors (Verbindungsstücke) | VAC CON | 50 |
| ACL* | Lysis Buffer* (Lysepuffer) | LYS BUF | 220 ml |
| ACB* | Binding Buffer* (Bindungspuffer) (Konzentrat) | BIND BUF CONC | 300 ml |
| ACW1* | Wash Buffer 1* (Waschpuffer 1) (Konzentrat) | WASH BUF 1 CONC | 19 ml |
| ACW2† | Wash Buffer 2† (Waschpuffer 2) (Konzentrat) | WASH BUF 2 CONC | 13 ml |
| AVE† | Elution Buffer† (Elutionspuffer) (lila Deckel) | ELU BUF | 5 x 2 ml |
| PROTK | QIAGEN Proteinase K | PROTK | 4 x 7 ml |
| Carrier | Carrier RNA (Carrier-RNA) (rote Deckel) | CAR RNA | 310 µg |
| QIAamp Mini | QIAamp Mini columns with Wash Tubes (WT) (QIAamp Mini-Säulen mit Waschröhrchen) (2 ml) | COL | 50 |
| | Handbuch | H B | 1 |

* Enthält ein chaotropes Salz. Zu Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen siehe Seite 14.

† Enthält Natriumazid als Konservierungsmittel.

Bestandteile des Kits

Die Hauptbestandteile des Kits sind im Folgenden beschrieben.

Tabelle 1. Aktive Inhaltsstoffe in den bereitgestellten Reagenzien

| Reagenz | | Aktiver Inhaltsstoff | Konzentration |
|---------|---|----------------------|---------------------|
| Symbol | Name | | |
| ACL | Lysis Buffer (Lysepuffer) | Guanidinthiocyanat | ≥ 30 bis < 50 % w/w |
| ACB | Binding Buffer (Bindungspuffer) (Konzentrat) | Guanidinthiocyanat | ≥ 30 bis < 50 % w/w |
| ACW1 | Wash Buffer 1 (Waschpuffer 1) (Konzentrat) | Guanidinhydrochlorid | ≥ 30 bis < 60% w/w |
| ACW2 | Wash Buffer 2 (Waschpuffer 2) (Konzentrat) | Keine | – |
| AVE | Elution Buffer (Elutionspuffer) (lila Deckel) | Keine | – |
| PROTK | QIAGEN Proteinase K | Proteinase K | ≥ 1 bis < 3% w/w |
| Carrier | Carrier RNA (Carrier-RNA) (rote Deckel) | Keine | – |

Kontrollen und Kalibratoren

Um das Risiko negativer Auswirkungen auf die Diagnoseergebnisse zu minimieren, die nach der Nukleinsäure-Isolierung generiert werden, sollten in nachgelagerten Anwendungen geeignete Kontrollen mitgeführt werden.

Erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien

Zusätzliche Reagenzien

- Ethanol (96–100%)*
- Isopropanol (100 %)
- Zerstoßenes Eis (nur für das „Klassisches Protokoll: Aufreinigung zirkulierender Nukleinsäuren aus 1–5 ml Humanblutplasma“)
- Für einige Proben kann eine Verdünnung mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (Phosphate-buffered saline, PBS) erforderlich sein.

Verbrauchsmaterialien

- Pipetten (einstellbar)
- Sterile Pipettenspitzen (zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen werden Pipettenspitzen mit Aerosolbarrieren empfohlen)
- Nuklease-freie 1,5- oder 2-ml-Mikroröhrchen
- 50-ml-Zentrifugenröhrchen

* Es darf kein denaturierter Alkohol verwendet werden, der andere Stoffe wie z. B. Methanol oder Methyläthylketon enthält.

Ausstattung/Geräte

- Wasserbad oder Heizblock zur Temperierung von 50-ml-Zentrifugenröhrchen auf 56 °C oder 60 °C*
- Heizblock (oder vergleichbar) zur Temperierung von 2-ml-Waschröhrchen auf 56 °C (nur für das klassische Protokoll)*
- Vortexer
- Mikrozentrifuge (mit Rotor für 2-ml-Röhrchen)*
- QIAvac 24 Plus vacuum manifold (Kat.-Nr. 19413)
- QIAvac Connecting System (Kat.-Nr. 19419) oder vergleichbar
- Vacuum Pump (Kat.-Nr. 84010 [USA und Kanada], 84000 [Japan] oder 84020 [Rest der Welt]) oder vergleichbare Pumpe zur Erzeugung eines Vakuums von -800 bis -900 mbar
- Optional: VacValves (Kat.-Nr. 19408)

* Stellen Sie sicher, dass die Geräte gemäß den Empfehlungen des Herstellers geprüft und kalibriert wurden.

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

Bitte beachten Sie, dass Sie ggf. verpflichtet sind, Ihre lokalen Vorschriften zur Meldung schwerwiegender Vorfälle, die im Zusammenhang mit dem Produkt aufgetreten sind, an den Hersteller und die Regulierungsbehörde, welcher der Anwender und/oder der Patient unterliegt, zu konsultieren.

In-vitro-Diagnostikum

Sicherheitshinweise

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien stets einen geeigneten Laborkittel, Einmal-Laborhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen finden Sie in den jeweiligen Sicherheitsdatenblättern (Safety Data Sheets, SDS). Diese sind im praktischen, kompakten PDF-Format online unter www.qiagen.com/safety verfügbar; hier können Sie die Sicherheitsdatenblätter zu allen Kits und Kit-Komponenten von QIAGEN einsehen und ausdrucken.

WARNUNG Verletzungsgefahr



GEBEN SIE KEINE Chlorbleiche oder saure Lösungen direkt in den Flüssigabfall, der während der Probenverarbeitung anfällt.

Buffer ACL, Buffer ACB und Buffer ACW1 enthalten Guanidinsalze, welche in Kombination mit Bleiche hochreaktive Verbindungen bilden können.

Wenn eine Flüssigkeit, die einen oder mehrere dieser Puffer enthält, verschüttet wird, reinigen Sie die betroffenen Flächen mit einem geeigneten Labordetergens und Wasser. Enthält die verschüttete Flüssigkeit potenziell infektiöse Agenzien, reinigen Sie die Fläche zuerst mit Detergens und Wasser, danach mit 1 % (v/v) Natriumhypochlorit.

- Die Proben sind potenziell infektiös. Proben- und Assay-Abfälle sind gemäß den örtlichen Sicherheitsbestimmungen zu entsorgen.

Informationen für Notfälle

CHEMTREC

USA und Kanada 1-800-424-9300

Außerhalb der USA und Kanada +1 703 527-3887

Vorsichtsmaßnahmen

Die folgenden Gefahren- und Sicherheitssätze gelten für die Komponenten des QIAamp DSP Circulating NA Kit.

Buffer ACB



Enthält: Guanidinisothiocyanat. Gefahr! Gesundheitsschädlich bei Verschlucken. Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt oder Einatmen. Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden. Schädlich für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung. Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase. Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen. Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.

Buffer ACL



Enthält: Guanidinisothiocyanat. Gefahr! Gesundheitsschädlich bei Verschlucken. Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt oder Einatmen. Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden. Schädlich für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung. Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase. Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen. Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.

Buffer ACW1



Enthält: Guanidinhydrochlorid. Warnung! Gesundheitsschädlich bei Verschlucken oder Einatmen. Verursacht Hautreizungen. Verursacht schwere Augenreizung. Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen. Inhalt/Behälter bei zugelasenem Abfallentsorgungsdienst entsorgen.

Proteinase K



Enthält: Proteinase K. Gefahr! Verursacht leichte Hautreizungen. Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen. Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden.

Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. Atemschutz tragen. Bei Exposition oder falls betroffen: GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen. Die betroffene Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen. Inhalt/Behälter bei zugelassenem Abfallentsorgungsdienst entsorgen.

Entsorgung

Der Abfall besteht aus Proben und Reagenzien. In diesem Abfall können toxische oder infektiöse Probenmaterialien enthalten sein, die sachgerecht entsorgt werden müssen. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die geltenden Sicherheitsbestimmungen.

Weitere Informationen finden Sie in den jeweiligen Sicherheitsdatenblättern (Safety Data Sheets, SDS). Zu jedem QIAGEN-Kit und zu jeder Kitkomponente können Sie das jeweilige SDS im PDF-Format online unter www.qiagen.com/safety abrufen, einsehen und ausdrucken.

Lagerung und Handhabung der Reagenzien

QIAamp Mini-Säulen müssen bei 2–8 °C und trocken gelagert werden. Alle Puffer müssen bei Raumtemperatur (15–25 °C) gelagert werden. Unter diesen Bedingungen können QIAamp Mini-Säulen und Puffer ohne Leistungsminderung bis zu dem auf der Kit-Packung angegebenen Verfallsdatum aufbewahrt werden.

Lyophilisierte Carrier-RNA kann bis zu dem auf dem Etikett der Komponente angegebenen Verfallsdatum bei Raumtemperatur (15–25 °C) gelagert werden. Carrier-RNA muss in Buffer AVE aufgelöst und die gelöste Carrier-RNA direkt in Buffer ACL gegeben werden, wie auf Seite 30 für das „Breeze“-Protokoll und auf Seite 35 für das klassische Protokoll beschrieben. Diese Lösung muss frisch zubereitet werden. Nicht verwendete, in Buffer AVE gelöste Carrier-RNA muss bei -30 °C bis -15 °C in Aliquoten eingefroren werden.

Das QIAamp DSP Circulating NA Kit enthält eine gebrauchsfertige Proteinase-K-Lösung in einem speziell formulierten Aufbewahrungspuffer. Die Proteinase K ist bei Lagerung bei Raumtemperatur (15–25 °C) bis zu dem auf dem Etikett der Komponente angegebenen Verfallsdatum stabil.

Stabilität nach dem Öffnen

Das Kit kann nach der ersten Verwendung 12 Monate oder bis zum Verfallsdatum verwendet werden, je nachdem, was zuerst eintritt.

Lagerung und Handhabung der Spezimen

Lagerung und Handhabung von Blut

Wir empfehlen, Vollblut (z. B. EDTA-Proben) maximal 6 Stunden bei 2–8 °C zu lagern, um eine Zersetzung der zellfreien Nukleinsäuren und die Freisetzung von Nukleinsäuren aus Zellen zu vermeiden. Bei Verwendung stabilisierter Blutentnahmeröhrchen bitte die vom Hersteller bereitgestellten Aufbewahrungsbedingungen beachten. Wir empfehlen die Validierung dieser Aufbewahrungsbedingungen unter Berücksichtigung Ihrer speziellen nachgelagerten Anwendung und Ihres Ziels.

Lagerung und Handhabung von Plasma

Bei Verwendung von EDTA als Antikoagulans wird empfohlen, Plasmatrennung und Nukleinsäure-Isolierung unmittelbar nach der Blutentnahme durchzuführen, insbesondere für RNA. Eine kurzzeitige Aufbewahrung des Plasmas bis zu 24 Stunden bei 2–8 °C ist möglich.

Längerfristig können Plasma-Aliquote aus stabilisierten oder unstabilierten Blutentnahmeröhrchen bis zu 12 Monate bei -20 °C oder -80 °C (nur bei DNA als Ziel) oder 4 Wochen bei -80 °C (RNA als Ziel) aufbewahrt werden.

Lagerung eluierter Nukleinsäuren

Die eluierten Nukleinsäuren werden in 1,5-ml-Elutionsröhrchen (im Lieferumfang enthalten) aufgefangen. Die aufgereinigten zirkulierenden Nukleinsäuren können bis zu 24 Stunden bei 2–8 °C aufbewahrt werden. Für eine längere Aufbewahrung wird für nachgelagerte Anwendungen mit DNA eine Lagerung bei -30 °C bis -15 °C und mit RNA bei -90 °C bis -60 °C empfohlen.

Verfahren

Wichtige Hinweise vor Beginn

Der QIAvac 24 Plus

Der QIAvac 24 Plus wurde für die schnelle und effiziente Vakuumverarbeitung von bis zu 24 QIAGEN Spin-Säulen gleichzeitig entwickelt. Statt durch Zentrifugation werden Proben und Waschlösungen mittels Vakuum durch die Säulenmembran gesogen, was das Aufreinigungsverfahren beschleunigt und weniger Arbeitsaufwand bedeutet.

In Kombination mit dem QIAvac Connecting System kann der QIAvac 24 Plus als Durchflusssystem verwendet werden. Der Probendurchfluss wird in einer separaten Abfallflasche aufgefangen.

Wartungsinformationen für den QIAvac 24 Plus sind den Handhabungsanweisungen im *QIAvac 24 Plus-Handbuch* zu entnehmen.

Verarbeitung der QIAamp Mini-Säulen auf dem QIAvac 24 Plus

Die Verarbeitung der QIAamp Mini-Säulen auf dem QIAvac 24 Plus erfolgt unter Verwendung von Einweg-Verbindungsstücken (VacConnectors) und wiederverwendbaren Ventilen (VacValves). Die VacValves (optional) werden direkt in die Luer-Aufnahmen des QIAvac 24 Plus-Vakuumverteilers eingesetzt und gewährleisten eine gleichmäßige Durchflussrate, was die gleichzeitige Verarbeitung unterschiedlicher Probenvolumina ermöglicht. Sie sollten eingesetzt werden, wenn sich die Durchflussraten der einzelnen Proben signifikant unterscheiden, um ein gleichbleibendes Vakuum zu erzielen. VacConnectors sind Einweg-Verbindungsstücke, die zwischen QIAamp Mini-Säule und VacValve oder zwischen QIAamp Mini-Säule und Luer-Aufnahme des QIAvac 24 Plus gesetzt werden. Sie verhindern während der Aufreinigung den direkten Kontakt zwischen Spin-Säule und VacValve und vermeiden so Kreuzkontaminationen zwischen den Proben. VacConnectors werden nach dem einmaligen Gebrauch entsorgt. Aufgrund der verwendeten großen Lösungsvolumen wird das QIAvac Connecting System (oder ein vergleichbares System mit Abfallflaschen) benötigt (siehe Abbildung 2).

Handhabungsanweisungen für den QIAvac 24 Plus

- Den QIAvac 24 Plus immer auf einer sicheren Arbeitsfläche platzieren. Der QIAvac 24 Plus-Vakuumverteiler kann zerbrechen, wenn er fallen gelassen wird.
- Den QIAvac 24 Plus immer sauber und trocken lagern. Informationen über Reinigungsverfahren sind dem *QIAvac 24 Plus Handbuch* zu entnehmen.
- Die Komponenten des QIAvac 24 Plus sind nicht beständig gegenüber bestimmten Lösungsmitteln (Tabelle 2). Wenn diese Lösungsmittel auf der Einheit verschüttet werden, diese ausgiebig mit Wasser spülen.
- Um eine gleichbleibende Leistung zu gewährleisten, auf keine Komponente des QIAvac 24 Plus-Vakuumverteilers Silikon oder Vakuumfett auftragen.
- Beim Arbeiten in der Nähe eines unter Druck stehenden Vakuumverteilers immer Vorsicht walten lassen und Schutzbrille tragen.
- Für Informationen bezüglich Ersatzteilen wenden Sie sich an den Technischen Service von QIAGEN oder Ihren Händler vor Ort.
- Der Vakuumdruck ist der Differenzdruck zwischen dem Inneren des Vakuumverteilers und der Atmosphäre (Standard-Atmosphärendruck: 1013 Millibar oder 760 mm Hg). Er kann mit dem QIAvac Connecting System gemessen werden (siehe Abbildung 2). Für die Protokolle ist eine Vakuumpumpe erforderlich, die ein Vakuum von -800 bis -900 mbar erzeugen kann (z. B. QIAGEN Vacuum Pump). Ein höherer Vakuumdruck ist zu vermeiden. Die Verwendung eines Vakuumdrucks unterhalb der Empfehlung kann zu einer Verringerung von Ausbeute und Reinheit der Nukleinsäuren führen und das Risiko einer Verstopfung der Membran erhöhen.

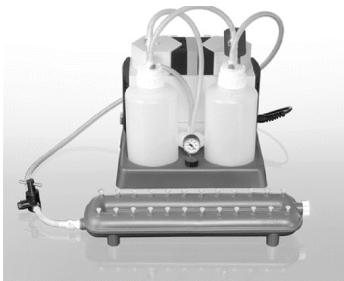


Abbildung 2. QIAvac 24 Plus, QIAvac Connecting System und Vacuum Pump.

Tabelle 2. Chemikalienbeständigkeit des QIAvac 24 Plus

| Beständig gegenüber | | Nicht beständig gegenüber |
|---------------------|--------------------------|---------------------------|
| Essigsäure | Chaotropen Salzen | Benzol |
| Chromsäure | Konzentrierten Alkoholen | Phenol |
| SDS | Natriumchlorid | Chloroform |
| Tween™ 20 | Harnstoff | Toluen |
| Chlorbleiche | Salzsäure | Ethern |
| Natriumhydroxid | | |

Einrichtung des QIAvac 24 Plus Vacuum Manifold

1. Verbinden Sie den QIAvac 24 Plus mit einer Vakuumquelle. Wenn Sie das QIAvac Connecting System verwenden, verbinden Sie dieses gemäß der Beschreibung in Anhang A des *QIAvac 24 Plus-Handbuchs* mit dem Vakuumverteiler und der Vakuumquelle.
2. Setzen Sie in jede zu verwendende Luer-Aufnahme des QIAvac 24 Plus ein VacValve ein (optional) (siehe Abbildung 3). Verschließen Sie nicht verwendete Luer-Aufnahmen mit Luer-Stopfen oder schließen Sie das eingesetzte VacValve.
VacValves sollten verwendet werden, wenn sich die Durchflussraten der einzelnen Proben signifikant unterscheiden, um ein gleichbleibendes Vakuum zu erzielen.
3. Setzen Sie in jedes VacValve einen VacConnector ein (siehe Abbildung 3).
Führen Sie diesen Schritt unmittelbar vor Beginn der Aufreinigung durch, um zu vermeiden, dass die VacConnectors potenziellen Kontaminanten in der Luft ausgesetzt werden.
4. Setzen Sie die QIAamp Mini-Säulen in die VacConnectors des Vakuumverteilers (siehe Abbildung 3).
Hinweis: Bewahren Sie das Waschröhrchen aus der Blisterverpackung für den Einsatz im Aufreinigungsprotokoll auf.
5. Stecken Sie in jede QIAamp Mini-Säule eine Säulenerweiterung (20 ml) (siehe Abbildung 3).
Hinweis: Stellen Sie sicher, dass die Säulenerweiterung fest in der QIAamp Mini-Säule sitzt, um ein Auslaufen der Probe zu vermeiden.

6. Befolgen Sie für die Aufreinigung von Nukleinsäuren die Anweisungen in den Protokollen. Entsorgen Sie die VacConnectors nach Gebrauch sachgerecht.
Lassen Sie den Deckel der QIAamp Mini-Säule geöffnet, während Sie Vakuum anlegen. Schalten Sie das Vakuum zwischen den einzelnen Schritten aus, um sicherzustellen, dass während der Verarbeitung ein beständiges, gleichmäßiges Vakuum angelegt wird. Zum schnelleren Abbau des Vakuums sollte ein Vacuum Regulator (Teil des QIAvac Connecting System) verwendet werden.

Hinweis: Jedes VacValve kann individuell geschlossen werden, sobald die Probe vollständig durch die Spin-Säule gesogen wurde. Dadurch können Proben mit unterschiedlichen Volumina oder Viskositäten gleichzeitig verarbeitet werden.

7. Reinigen Sie den QIAvac 24 Plus nach Verarbeitung der Proben (siehe „Reinigung und Dekontamination des QIAvac 24 Plus“ im *QIAvac 24 Plus-Handbuch*).

Hinweis: Die Puffer ACL, ACB und ACW1 sind nicht mit bleichehaltigen Desinfektionsmitteln kompatibel. Zu Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen siehe Seite 14.

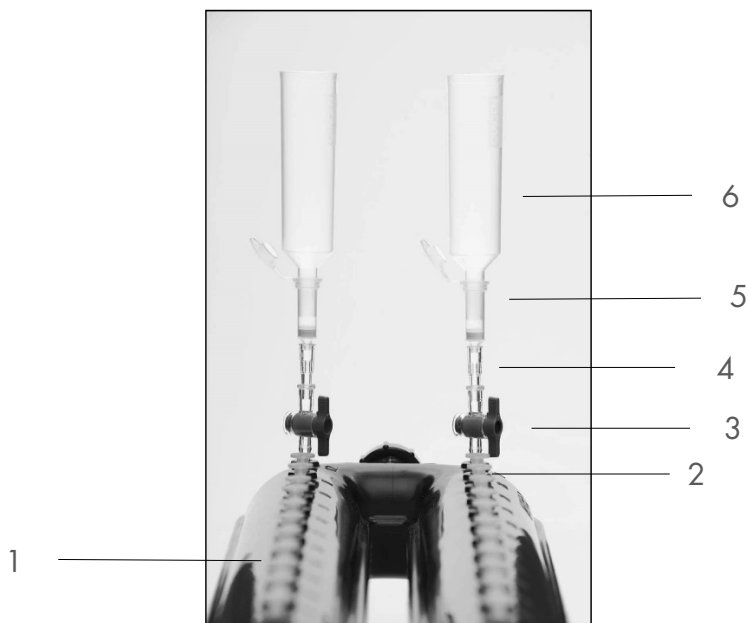
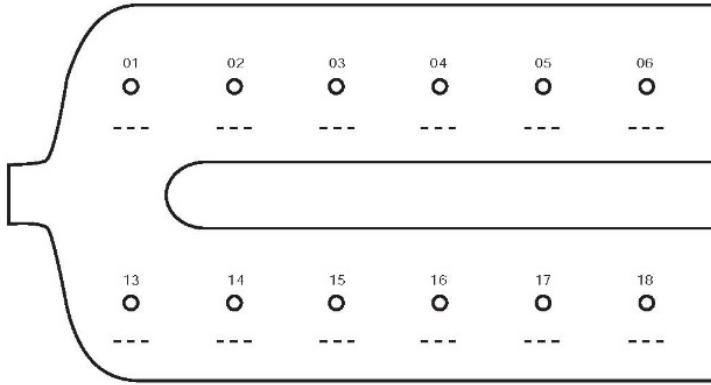


Abbildung 3. Einrichtung des QIAvac 24 Plus mit QIAamp Mini-Säulen bei Verwendung von VacValves, VacConnectors und Säulenerweiterungen.

- | | | | |
|----------|---|----------|-------------------|
| 1 | QIAvac 24 Plus Vacuum Manifold | 4 | VacConnector |
| 2 | Luer-Aufnahme des QIAvac 24 Plus (verschlossen mit Luer-Stopfen) | 5 | QIAamp Mini-Säule |
| 3 | VacValve* | 6 | Säulenerweiterung |

Wir empfehlen eine Beschriftung der Röhren und QIAamp Mini-Säulen zur Verwendung mit dem QIAvac 24 Plus-Vakuumsystem gemäß dem Schema in Abbildung 4, um eine Verwechslung der Proben zu verhindern. Diese Abbildung kann kopiert und mit den Namen der Proben beschriftet werden.

* Muss separat erworben werden.



Datum: _____

Bediener: _____

Lauf-ID: _____

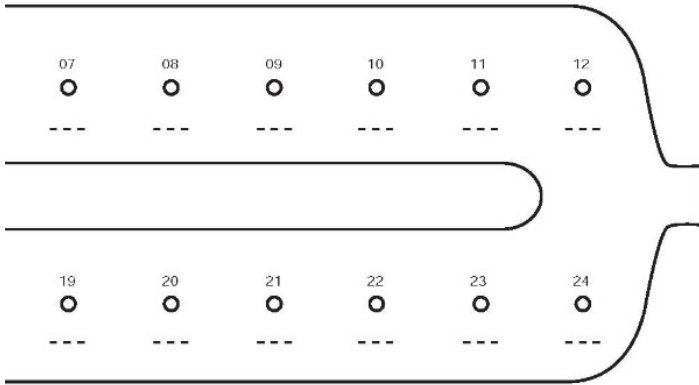


Abbildung 4. Beschriftungsschema für Röhrcchen und QIAamp Mini-Säulen zur Verwendung auf dem QIAvac 24 Plus-Vakuumsystem.

Vorbereitung von Puffern und Reagenzien

Buffer ACB

Vor der Verwendung 300 ml Buffer ACB-Konzentrat mit 200 ml Isopropanol (100 %) versetzen, um 500 ml Buffer ACB zu erhalten. Nach Zugabe von Isopropanol gut mischen.

Buffer ACW1 *

Vor der Verwendung 19 ml Buffer ACW1-Konzentrat mit 25 ml Ethanol (96–100 %) versetzen, um 44 ml Buffer ACW1 zu erhalten. Nach Zugabe von Ethanol gut mischen.

Buffer ACW2 †

Vor der Verwendung 13 ml Buffer ACW2-Konzentrat mit 30 ml Ethanol (96–100 %) versetzen, um 43 ml Buffer ACW2 zu erhalten. Nach Zugabe von Ethanol gut mischen.

Zugabe von Carrier-RNA zu Buffer ACL*

Carrier-RNA erfüllt 2 Funktionen: Zum einen fördert sie die Bindung der Nukleinsäuren an die Membran der QIAamp Mini-Säule, was besonders wichtig ist, wenn nur wenige Zielmoleküle in der Probe vorhanden sind. Zum anderen kann durch Zugabe von großen Mengen Carrier-RNA in dem seltenen Fall, dass nicht alle RNase-Moleküle durch die chaotropen Salze und Detergenzien in Buffer ACL denaturiert wurden, die Wahrscheinlichkeit des Abbaus von RNA verringert werden.

* Enthält chaotropes Salz. Zu Warnings and Precautions siehe Seite 14.

† Enthält Natriumazid als Konservierungsmittel.

Die mitgelieferte lyophilisierte Carrier-RNA ist für das im Kit enthaltene Volumen von Buffer ACL ausreichend. Die empfohlene Konzentration der Carrier-RNA wurde angepasst, sodass das QIAamp DSP Circulating NA-Protokoll nun als allgemeines Aufreinigungssystem eingesetzt werden kann, das mit vielen verschiedenen Amplifikationssystemen kompatibel und für eine Vielzahl von RNA- und DNA-Zielen geeignet ist.

Verschiedene Amplifikationssysteme unterscheiden sich je nach Gesamtmenge der in der Reaktion vorhandenen Nukleinsäuren in ihrer Effizienz. Eluate aus dem Kit enthalten sowohl zirkulierende Nukleinsäuren als auch Carrier-RNA, wobei in den meisten Fällen wesentlich mehr Carrier-RNA vorhanden ist als zirkulierende Nukleinsäuren. Aus diesem Grund ist eine Quantifizierung der isolierten zirkulierenden Nukleinsäuren durch Messung der Extinktion nicht geeignet; das Ergebnis einer solchen Messung würde durch die vorhandene Carrier-RNA verfälscht werden.

Um in Amplifikationsreaktionen die höchstmögliche Sensitivität zu erreichen, kann es erforderlich sein, die zum Buffer ACL zugegebene Menge an Carrier-RNA zu verringern.

Für Amplifikationssysteme, die mit Oligo-dt-Primern arbeiten, sollte bei der Isolierung frei zirkulierender Nukleinsäuren keine Carrier-RNA eingesetzt werden.

Geben Sie 1550 µl Buffer AVE* in das Röhrchen mit 310 µg lyophilisierter Carrier-RNA, um eine Lösung mit der Konzentration 0,2 µg/µl zu erhalten. Lösen Sie die Carrier-RNA sorgfältig auf, teilen Sie sie in Aliquote geeigneter Größe auf und lagern Sie diese bei -30 °C bis -15 °C. Die Aliquote der Carrier-RNA dürfen nicht mehrfach eingefroren und wieder aufgetaut werden.

Bitte beachten Sie, dass sich Carrier-RNA nicht in Buffer ACL löst. Sie muss zunächst in Buffer AVE gelöst werden; diese Lösung kann dann zu Buffer ACL gegeben werden.

*Enthält Natriumazid als Konservierungsmittel.

Berechnen Sie anhand der Tabellen in den Protokollen das pro Probencharge benötigte Volumen der Mischung aus Buffer ACL und Carrier-RNA. Entscheiden Sie, wie viele Proben gleichzeitig verarbeitet werden sollen.

Mischen Sie vorsichtig durch zehnmalsiges Umschwenken des Röhrchens/der Flasche. Um die Bildung von Schaum zu vermeiden, nicht mit dem Vortexmischer mischen.

Hinweis: Das Verfahren zur Probenvorbereitung ist für maximal 1,0 µg Carrier-RNA pro Probe optimiert. Falls Ihr Amplifikationssystem erwiesenermaßen mit weniger Carrier-RNA besser funktioniert, versetzen Sie die Röhrchen mit Buffer ACL nur mit der erforderlichen Menge gelöster Carrier-RNA. Versetzen Sie Buffer ACL für jedes Mikrogramm Carrier-RNA, das pro Präparation benötigt wird, mit 5 µl gelöster Carrier-RNA. (Die Verwendung von weniger als 1,0 µg Carrier-RNA pro Probe kann von Vorteil sein; dies ist für jeden Probentyp und jeden nachgelagerten Assay separat zu validieren.)

„Breeze“-Protokoll: Aufreinigung zirkulierender Nukleinsäuren aus 1–5 ml Humanblutplasma

Dieses Protokoll beschreibt die Aufreinigung zirkulierender DNA und RNA aus 1–5 ml Humanblutplasma und wurde für möglichst wenige manuelle Arbeitsschritte und eine kurze Bearbeitungszeit optimiert. Bereits von Anwendern des QIAamp DSP Circulating NA Kit Version 1/R3 validierte Workflows finden Sie unter „Klassisches Protokoll: Aufreinigung zirkulierender Nukleinsäuren aus 1–5 ml Humanblutplasma“ (Seite 34).

Wichtige Hinweise vor Beginn

- Alle Zentrifugationsschritte sollten bei Raumtemperatur (15–25 °C) durchgeführt werden.
- Schalten Sie das Vakuum zwischen den einzelnen Schritten aus, um sicherzustellen, dass für das gesamte Protokoll ein beständiges, gleichmäßiges Vakuum angelegt wird.
Hinweis: Der Druck der Vacuum Pump sollte zwischen -800 und -900 mbar betragen.
- Äquilibrieren Sie die Proben auf Raumtemperatur.
- Füllen Sie die Proben mit PBS auf das nächste exakte Volumen (1 bis 5 ml) auf.
- Richten Sie den QIAvac 24 Plus gemäß der Beschreibung auf Seite 21 ein.
- Erwärmen Sie für Schritt 3 ein Wasserbad oder einen Heizblock (geeignet für 50-ml-Zentrifugenröhrchen) auf 56 °C.
- Äquilibrieren Sie die QIAamp Mini Spin-Säulen vor der Verwendung mindestens 1 Stunde lang auf Raumtemperatur.
- Stellen Sie sicher, dass Buffer ACB, Buffer ACW1 und Buffer ACW2 gemäß den Anweisungen auf Seite 26 vorbereitet wurden (Zugabe von Isopropanol oder Ethanol).
- Geben Sie gemäß den Anweisungen in Tabelle 3 in Buffer AVE rekonstituierte Carrier-RNA in den Buffer ACL.

Tabelle 3. Für die Verarbeitung von humanen Blutplasmaproben von 1–5 ml erforderliche Volumen Buffer ACL und Carrier-RNA (gelöst in Buffer AVE)

| Einrichtung für ml Plasma | A | B | C | D | E | |
|---------------------------|-----------------|------|------|------|-------|--------------------------------|
| | 1 ml | 2 ml | 3 ml | 4 ml | 5 ml | |
| Anzahl Proben | Buffer ACL (ml) | | | | | Carrier-RNA in 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 |

Verfahren: „Breeze“-Protokoll

1. Pipettieren Sie QIAGEN Proteinase K, Plasma und Buffer ACL **in dieser Reihenfolge** in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen (nicht im Lieferumfang enthalten).

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

2. Schließen Sie den Deckel und mischen Sie den Inhalt des Röhrchens durch Vortexen in Impulsen von 5 x 2 s.

Achten Sie darauf, dass sich ein erkennbarer Strudel im Röhrchen bildet. Zur Gewährleistung einer effizienten Lyse müssen Probe und Buffer ACL gut vermischt werden, sodass eine homogene Lösung entsteht.

Hinweis: Unterbrechen Sie zu keinem Zeitpunkt das Verfahren. Fahren Sie unverzüglich mit Schritt 3 fort, um die Lyse-Inkubation zu beginnen.

3. Inkubieren Sie 15 (\pm 1) min lang bei 56 °C (\pm 1 °C).
4. Stellen Sie das Röhrchen wieder auf die Laborbank und schrauben Sie den Deckel ab.
5. Versetzen Sie das Lysat im Röhrchen mit Buffer ACB. Wählen Sie das Volumen entsprechend der Einrichtung aus Schritt 1.

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

6. Schließen Sie den Deckel und mischen Sie den Inhalt des Röhrchens sorgfältig durch Vortexen in Impulsen von 5 x 2 s.

Achten Sie darauf, dass sich ein erkennbarer Strudel im Röhrchen bildet. Zur Gewährleistung einer effizienten Lyse müssen Lysat und Buffer ACB gut vermischt werden, sodass eine homogene Lösung entsteht.

7. Inkubieren Sie die Mischung aus Lysat und Buffer ACB im Röhrchen 5 (\pm 1) min lang bei Raumtemperatur.

8. Setzen Sie die QIAamp Mini-Säule in den VacConnector auf dem QIAvac 24 Plus (siehe „Einrichtung des QIAvac 24 Plus Vacuum Manifold“, Seite 21). Stecken Sie eine 20-ml-Säulenerweiterung in die offene QIAamp Mini-Säule.

Stellen Sie sicher, dass die Säulenerweiterung fest in der QIAamp Mini-Säule sitzt, um ein Auslaufen der Probe zu vermeiden.

Hinweis: Bewahren Sie das Waschröhrchen für die Trockenzentrifugierung in Schritt 13 auf.

9. Geben Sie vorsichtig das Lysat aus Schritt 7 in die Säulenerweiterung der QIAamp Mini-Säule. Schalten Sie die Vakuumpumpe ein. Schalten Sie die Vakuumpumpe wieder aus und bauen Sie den Druck auf 0 mbar ab, sobald alle Lysate vollständig durch die Säulen gesogen wurden. Entfernen Sie die Säulenerweiterung vorsichtig und entsorgen Sie sie. Bitte beachten Sie, dass es bei großen Lysatvolumen (ca. 18 ml bei 5 ml Probe) bis zu 20 min dauern kann, bis sie die Membran der QIAamp Mini-Säule durch Saugkraft passiert haben. Für einen schnellen und komfortablen Vakuumabbau sollte der Vacuum Regulator verwendet werden (Teil des QIAvac Connecting System).

Hinweis: Achten Sie zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen darauf, die Säulenerweiterungen beim Entfernen nicht über benachbarte QIAamp Mini-Säulen zu führen.

10. Geben Sie 600 μ l Buffer ACW1 auf die QIAamp Mini-Säule. Lassen Sie den Deckel der Säule offen und schalten Sie die Vakuumpumpe ein. Schalten Sie die Vakuumpumpe wieder aus und bauen Sie den Druck auf 0 mbar ab, sobald Buffer ACW1 vollständig durch die QIAamp Mini-Säule gesogen wurde.

11. Geben Sie 750 μ l Buffer ACW2 auf die QIAamp Mini-Säule. Lassen Sie den Deckel der Säule offen und schalten Sie die Vakuumpumpe ein. Schalten Sie die Vakuumpumpe wieder aus und bauen Sie den Druck auf 0 mbar ab, sobald Buffer ACW2 vollständig durch die QIAamp Mini-Säule gesogen wurde.

12. Geben Sie 750 μ l Ethanol (96–100 %) auf die QIAamp Mini-Säule. Lassen Sie den Deckel der Säule offen und schalten Sie die Vakuumpumpe ein. Schalten Sie die Vakuumpumpe wieder aus und bauen Sie den Druck auf 0 mbar ab, sobald das Ethanol vollständig durch die Spin-Säule gesogen wurde.

13. Schließen Sie den Deckel der QIAamp Mini-Säule. Nehmen Sie sie vom Vakuumverteiler und entsorgen Sie den VacConnector. Setzen Sie die QIAamp Mini-Säule in ein sauberes 2-ml-Waschröhrchen (aus Schritt 8) und zentrifugieren Sie 3 (\pm 0,5) min lang bei voller Drehzahl (20.000 x g; 14.000 rpm).
14. Setzen Sie die QIAamp Mini-Säule in ein neues 2-ml-Waschröhrchen. Öffnen Sie den Deckel und inkubieren Sie 3 min lang bei Raumtemperatur, damit die Membran vollständig trocknen kann.
15. Setzen Sie die QIAamp Mini-Säule in ein sauberes 1,5-ml-Elutionsröhrchen (im Lieferumfang enthalten) und entsorgen Sie das 2-ml-Waschröhrchen aus Schritt 14. Geben Sie vorsichtig 20–150 μ l Buffer AVE in die Mitte der Membran der QIAamp Mini-Säule. Schließen Sie den Deckel und inkubieren Sie 3 (\pm 0,5) min lang bei Raumtemperatur.

Wichtig: Stellen Sie sicher, dass Buffer AVE auf Raumtemperatur (15–25 °C) äquilibriert wurde. Bei Elution in kleinen Volumina (< 50 μ l) muss der Elutionspuffer für eine vollständige Elution der gebundenen Nukleinsäuren auf die Mitte der Membran gegeben werden.

Das Elutionsvolumen ist flexibel und kann den Anforderungen nachgelagerter Anwendungen angepasst werden.

Die Elution in kleineren Volumina Buffer AVE resultiert zwar in höheren Nukleinsäure-Konzentrationen, kann aber die Ausbeute verringern.

Das Volumen des gewonnenen Eluats kann bis zu 5 μ l weniger betragen als das auf die Membran der QIAamp Mini-Säule aufgetragene Elutionsvolumen.

Hinweis: Für die Elution bei erwartungsgemäß geringer NA-Ausbeute wird die Verwendung von bindungsarmen Röhrchen empfohlen (nicht im Lieferumfang enthalten).

16. Zentrifugieren Sie 1 min lang bei voller Drehzahl (20.000 x g; 14.000 rpm) in einer Mikrozentrifuge, um die Nukleinsäuren zu eluieren.

Hinweis: Richten Sie die Deckel der Elutionsröhrchen so aus, dass sie gegen die Drehrichtung des Rotors zeigen (wenn sich der Rotor also im Uhrzeigersinn dreht, müssen die Deckel gegen den Uhrzeigersinn zeigen und umgekehrt).

Klassisches Protokoll: Aufreinigung zirkulierender Nukleinsäuren aus 1–5 ml Humanblutplasma

Bei diesem Protokoll handelt es sich um das unveränderte Protokoll aus dem *QIAamp DSP Circulating NA Kit Handbuch*, Revision 3 (R3). Es kann z. B. mit vorhandenen anwendervalidierten Workflows für 1–5 ml Humanplasma verwendet werden.

Wichtige Hinweise vor Beginn

- Alle Zentrifugationsschritte sollten bei Raumtemperatur (15–25 °C) durchgeführt werden.
- Schalten Sie das Vakuum zwischen den einzelnen Schritten aus, um sicherzustellen, dass für das gesamte Protokoll ein beständiges, gleichmäßiges Vakuum angelegt wird.
Hinweis: Der Druck der Vacuum Pump sollte zwischen -800 und -900 mbar betragen.
- Äquilibrieren Sie die Proben auf Raumtemperatur.
- Füllen Sie die Proben mit PBS auf das nächste exakte Volumen (1 bis 5 ml) auf.
- Richten Sie den QIAvac 24 Plus gemäß der Beschreibung auf Seite 21 ein.
- Erwärmen Sie für Schritt 3 ein Wasserbad oder einen Heizblock (geeignet für 50-ml-Zentrifugenröhrchen) auf 60°C.
- Erwärmen Sie für Schritt 14 einen Heizblock (geeignet für 2-ml-Waschröhrchen) auf 56 °C.
- Äquilibrieren Sie die QIAamp Mini Spin-Säulen vor Gebrauch für mindestens 1 Stunde auf Raumtemperatur.
- Stellen Sie sicher, dass Buffer ACB, Buffer ACW1 und Buffer ACW2 gemäß den Anweisungen auf Seite 26 vorbereitet wurden (Zugabe von Isopropanol oder Ethanol).
- Geben Sie gemäß den Anweisungen in Tabelle 4 in Buffer AVE rekonstituierte Carrier-RNA in den Buffer ACL.

Tabelle 4. Für die Verarbeitung von humanen Blutplasmaproben von 1–5 ml erforderliche Volumen Buffer ACL und Carrier-RNA (gelöst in Buffer AVE)

| Einrichtung für ml Plasma | A | B | C | D | E | |
|---------------------------|-----------------|------|------|------|-------|--------------------------------|
| | 1 ml | 2 ml | 3 ml | 4 ml | 5 ml | |
| Anzahl Proben | Buffer ACL (ml) | | | | | Carrier-RNA in 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 |

Verfahren: Klassisches Protokoll

1. Pipettieren Sie QIAGEN Proteinase K, Plasma und Buffer ACL in dieser Reihenfolge in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen (nicht im Lieferumfang enthalten).

| Einrichtung | A | B | C | D | E |
|------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| ProtK (μ l) | 100 | 200 | 300 | 400 | 500 |
| Plasma (ml) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| ACL (ml) | 0,8 | 1,6 | 2,4 | 3,2 | 4 |

2. Schließen Sie den Deckel und mischen Sie den Inhalt des Röhrchens durch Vortexen in Impulsen für 30 s.

Achten Sie darauf, dass sich ein erkennbarer Strudel im Röhrchen bildet. Zur Gewährleistung einer effizienten Lyse müssen Probe und Buffer ACL gut vermischt werden, sodass eine homogene Lösung entsteht.

Hinweis: Unterbrechen Sie zu keinem Zeitpunkt das Verfahren. Fahren Sie unverzüglich mit Schritt 3 fort, um die Lyse-Inkubation zu beginnen.

3. Inkubieren Sie 30 (\pm 2) min lang bei 60 °C (\pm 1 °C).
4. Stellen Sie das Röhrchen wieder auf die Laborbank und schrauben Sie den Deckel ab.
5. Versetzen Sie das Lysat im Röhrchen mit Buffer ACB. Wählen Sie das Volumen entsprechend der Einrichtung aus Schritt 1.

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

6. Schließen Sie den Deckel und mischen Sie den Inhalt des Röhrchens sorgfältig durch Vortexen in Impulsen für 30 s.

Achten Sie darauf, dass sich ein erkennbarer Strudel im Röhrchen bildet. Zur Gewährleistung einer effizienten Lyse müssen Lysat und Buffer ACB gut vermischt werden, sodass eine homogene Lösung entsteht.

7. Inkubieren Sie die Mischung aus Lysat und Buffer ACB im Röhrchen 5 (\pm 1) min lang auf Eis.
8. Setzen Sie die QIAamp Mini-Säule in den VacConnector auf dem QIAvac 24 Plus (siehe „Einrichtung des QIAvac 24 Plus Vacuum Manifold“, Seite 21). Stecken Sie eine 20-ml-Säulenerweiterung in die offene QIAamp Mini-Säule.

Stellen Sie sicher, dass die Säulenerweiterung fest in der QIAamp Mini-Säule sitzt, um ein Auslaufen der Probe zu vermeiden.

Hinweis: Bewahren Sie das Waschröhrchen für die Trockenzentrifugierung in Schritt 13 auf.

9. Geben Sie vorsichtig das Lysat aus Schritt 7 in die Säulenerweiterung der QIAamp Mini-Säule. Schalten Sie die Vakuumpumpe ein und legen Sie einen Druck von -800 bis -900 mbar an. Schalten Sie die Vakuumpumpe wieder aus und bauen Sie den Druck auf 0 mbar ab, sobald alle Lysate vollständig durch die Säulen gesogen wurden. Entfernen Sie die Säulenerweiterung vorsichtig und entsorgen Sie sie.

Bitte beachten Sie, dass es bei großen Lysatvolumen (ca. 18 ml bei 5 ml Probe) bis zu 20 min dauern kann, bis sie die Membran der QIAamp Mini-Säule durch Saugkraft passiert haben.

Für einen schnellen und komfortablen Vakuumabbau sollte der Vacuum Regulator verwendet werden (Teil des QIAvac Connecting Systems).

Hinweis: Achten Sie zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen darauf, die Säulenerweiterungen beim Entfernen nicht über benachbarte QIAamp Mini-Säulen zu führen.

10. Geben Sie 600 μ l Buffer ACW1 auf die QIAamp Mini-Säule. Lassen Sie den Deckel der Säule offen und schalten Sie die Vakuumpumpe ein. Schalten Sie die Vakuumpumpe wieder aus und bauen Sie den Druck auf 0 mbar ab, sobald Buffer ACW1 vollständig durch die QIAamp Mini-Säule gesogen wurde.
11. Geben Sie 750 μ l Buffer ACW2 auf die QIAamp Mini-Säule. Lassen Sie den Deckel der Säule offen und schalten Sie die Vakuumpumpe ein. Schalten Sie die Vakuumpumpe wieder aus und bauen Sie den Druck auf 0 mbar ab, sobald Buffer ACW2 vollständig durch die QIAamp Mini-Säule gesogen wurde.
12. Geben Sie 750 μ l Ethanol (96–100 %) auf die QIAamp Mini-Säule. Lassen Sie den Deckel der Säule offen und schalten Sie die Vakuumpumpe ein. Schalten Sie die Vakuumpumpe wieder aus und bauen Sie den Druck auf 0 mbar ab, sobald das Ethanol vollständig durch die Spin-Säule gesogen wurde.

13. Schließen Sie den Deckel der QIAamp Mini-Säule. Nehmen Sie sie vom Vakuumverteiler und entsorgen Sie den VacConnector. Setzen Sie die QIAamp Mini-Säule in ein sauberes 2-ml-Waschröhrchen (aus Schritt 8) und zentrifugieren Sie 3 (\pm 0,5) min lang bei voller Drehzahl (20.000 \times g; 14.000 rpm).
14. Setzen Sie die QIAamp Mini-Säule in ein neues 2-ml-Waschröhrchen. Öffnen Sie den Deckel und inkubieren Sie 10 (\pm 1) min lang bei 56 °C (\pm 1 °C), damit die Membran vollständig trocknen kann.
15. Setzen Sie die QIAamp Mini-Säule in ein sauberes 1,5-ml-Elutionsröhrchen (im Lieferumfang enthalten) und entsorgen Sie das 2-ml-Waschröhrchen aus Schritt 13. Geben Sie vorsichtig 20–150 μ l Buffer AVE in die Mitte der Membran der QIAamp Mini-Säule. Schließen Sie den Deckel und inkubieren Sie 3 (\pm 0,5) min lang bei Raumtemperatur.

Wichtig: Stellen Sie sicher, dass Buffer AVE auf Raumtemperatur (15–25 °C) äquilibriert wurde. Bei Elution in kleinen Volumina (< 50 μ l) muss der Elutionspuffer für eine vollständige Elution der gebundenen Nukleinsäuren auf die Mitte der Membran gegeben werden.

Das Elutionsvolumen ist flexibel und kann den Anforderungen nachgelagerter Anwendungen angepasst werden.

Die Elution in kleineren Volumina Buffer AVE resultiert zwar in höheren Nukleinsäure-Konzentrationen, kann aber die Ausbeute verringern.

Das Volumen des gewonnenen Eluats kann bis zu 5 μ l weniger betragen als das auf die QIAamp Mini-Säule aufgegebene Elutionsvolumen.

Hinweis: Für die Elution bei erwartungsgemäß geringer NA-Ausbeute wird die Verwendung von bindungsarmen Röhrchen empfohlen (nicht im Lieferumfang enthalten).

16. Zentrifugieren Sie 1 min lang bei voller Drehzahl (20.000 \times g; 14.000 rpm) in einer Mikrozentrifuge, um die Nukleinsäuren zu eluieren.

Hinweis: Richten Sie die Deckel der Elutionsröhrchen so aus, dass sie gegen die Drehrichtung des Rotors zeigen (wenn sich der Rotor also im Uhrzeigersinn dreht, müssen die Deckel gegen den Uhrzeigersinn zeigen und umgekehrt).

Qualitätskontrolle

Gemäß dem ISO-zertifizierten Qualitätsmanagement-System von QIAGEN wird jede Charge von QIAamp DSP Circulating NA Kits nach festgelegten Prüfkriterien kontrolliert, um eine einheitliche Produktqualität zu gewährleisten.

Anwendungseinschränkungen

Die Leistungsfähigkeit des Systems zur Isolierung zirkulierender, zellfreier Nukleinsäuren wurde mit Humanplasmaproben getestet, die in den folgenden Blutentnahmeröhrchen aufbewahrt wurden:

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

Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, für jedes Verfahren, das im Labor des Anwenders durchgeführt wird und das nicht durch die Leistungsstudien von QIAGEN abgedeckt ist, die Leistungscharakteristik des Systems selbst zu validieren.

Um das Risiko einer negativen Auswirkung auf die Ergebnisse der diagnostischen Tests zu minimieren, sollten in nachgelagerten Anwendungen geeignete Kontrollen mitgeführt werden. Zur weiteren Validierung werden die Richtlinien der International Conference on Harmonisation of Technical Requirements (ICH) im Dokument ICH Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Test And Methodology (Validierung analytischer Verfahren: Test und Methodik) empfohlen.

Alle mit dem System erhaltenen diagnostischen Ergebnisse dürfen nur im Zusammenhang mit anderen klinischen und/oder labormedizinischen Untersuchungsergebnissen interpretiert werden.

Leistungsmerkmale

Die zutreffenden Leistungsmerkmale sind unter der Registerkarte „Resources“ (Ressourcen) auf der Produktseite unter www.qiagen.com verfügbar.

Literatur

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.

Hilfe zur Fehlerbehebung

In diesem Abschnitt zur Fehlerbehebung finden Sie hilfreiche Informationen zur Behebung möglicher Probleme. Weitere Informationen finden Sie auch auf der Seite „Frequently Asked Questions“ (Häufig gestellte Fragen, FAQ) unseres TechniksUPPORT-Zentrums unter: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Darüber hinaus stehen die Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler beim Technischen Service von QIAGEN Ihnen stets unterstützend zur Seite, falls Sie Fragen zu den Informationen und/oder Protokollen in diesem Handbuch oder den für die Proben und Assays verwendeten Methoden haben sollten (Kontaktinformationen siehe unter www.qiagen.com).

Kommentare und Vorschläge

Wenige oder keine Nukleinsäuren im Eluat

- | | | |
|----|--|---|
| a) | Verwendung von unstabilisiertem Plasma | Unstabilisierte Plasmaproben können zu einem beschleunigten DNA-Abbau führen. Wir empfehlen, CEN/TS 16835-3:2015 zu befolgen. Wiederholen Sie die Nukleinsäure-Aufreinigung mit neuen Proben. |
| b) | Verlängerter Zeitraum zwischen Blutentnahme und Plasmaverarbeitung | Kernhaltige Blutzellen können sich zersetzen und genomische DNA ins Plasma abgeben, was eine Verdünnung der Ziel-Nukleinsäuren zur Folge hat. |
| c) | Proben mehr als einmal eingefroren und wieder aufgetaut | Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden, da es zum Abbau von DNA führen kann. Verwenden sie immer frische Proben oder Proben, die nur einmal aufgetaut wurden. |
| d) | Geringe Konzentration der Ziel-DNA in den Proben | Die Plasmaproben wurden zu lange bei Raumtemperatur stehen gelassen. Wiederholen Sie die Nukleinsäure-Aufreinigung mit neuen Proben. Hinweis: Bei einigen Personen ist die Konzentration zellfreier NA im Plasma möglicherweise gering. In einem solchen Fall sollte das Probenvolumen größer und das Elutionsvolumen kleiner gewählt werden. |
| e) | Ineffiziente Lyse der Probe in Buffer ACL | Wenn QIAGEN Proteinase K für längere Zeiträume erhöhten Temperaturen ausgesetzt wird, kann sie ihre Aktivität verlieren. Wiederholen Sie das Verfahren mit neuen Proben und frischer QIAGEN Proteinase K. |
| f) | Mischung aus Buffer ACL und Carrier-RNA nicht ausreichend gemischt | Vermischen Sie Buffer ACL und Carrier-RNA durch sanftes, mindestens 10-maliges Umschwenken des Röhrchens mit Buffer ACL-Carrier-RNA. |
| g) | Verwendung von niedrigprozentigem Ethanol statt 96–100 % | Wiederholen Sie die Nukleinsäure-Aufreinigung mit neuen Proben und 96–100 % Ethanol. Es darf kein denaturierter Alkohol verwendet werden, der andere Stoffe wie z. B. Methanol oder Methyläthylketon enthält. |

Kommentare und Vorschläge

- | | | |
|----|--|--|
| h) | Buffer ACB inkorrekt zubereitet | Stellen Sie sicher, dass das Buffer ACB-Konzentrat mit dem korrekten Volumen Isopropanol rekonstituiert wurde (nicht Ethanol, siehe Seite 26). |
| i) | Buffer ACW1 oder Buffer ACW2 inkorrekt zubereitet | Stellen Sie sicher, dass die Buffer ACW1- und Buffer ACW2-Konzentrate mit den korrekten Volumina Ethanol rekonstituiert wurden (siehe Seite 26). Wiederholen Sie die Nukleinsäure-Aufreinigung mit neuen Proben. |
| j) | Buffer ACW1 oder Buffer ACW2 mit 70 % Ethanol zubereitet | Stellen Sie sicher, dass die Buffer ACW1- und Buffer ACW2-Konzentrate mit 96–100 % Ethanol verdünnt wurden (siehe Seite 26). Wiederholen Sie die Nukleinsäure-Aufreinigung mit neuen Proben. |

Unzureichende Leistung der DNA oder RNA in nachgelagerten enzymatischen Reaktionen

- | | | |
|----|-------------------------------------|---|
| a) | Wenig bis keine DNA im Eluat | Für mögliche Gründe siehe „Wenige oder keine Nukleinsäuren im Eluat“ weiter oben. Erhöhen Sie wenn möglich die Menge des in der Reaktion eingesetzten Eluats. |
| b) | Unpassendes Elutionsvolumen gewählt | Ermitteln Sie das für Ihre nachgelagerte Anwendung geeignete Maximalvolumen an Eluat. Reduzieren oder erhöhen Sie das in der nachgelagerten Anwendung eingesetzte Eluatvolumen entsprechend. Das Elutionsvolumen kann proportional angepasst werden. Hinweis: Die Elution in kleineren Volumina Buffer AVE führt zwar zu höheren Nukleinsäure-Konzentrationen, kann aber die Ausbeute verringern. |
| c) | Puffer nicht ausreichend vermischt | Die Salz- und Ethanolanteile des Waschpuffers Buffer ACW2 können sich absetzen, wenn der Puffer zwischen zwei Läufen für längere Zeit nicht verwendet wird. Vermischen Sie vor jedem Lauf sorgfältig alle Puffer. |
| d) | Interferenzen durch Carrier-RNA | Wenn die im Eluat vorhandene Carrier-RNA mit der nachgelagerten enzymatischen Reaktion interferiert, kann es erforderlich sein, weniger oder gar keine Carrier-RNA einzusetzen. |

Allgemeine Handhabung












- | | | |
|----|-----------------------------|--|
| a) | QIAamp Mini-Säule verstopft | Wenn sich die Durchflussrate reduziert, kann die Vakuumbehandlung verlängert werden. Alternativ können Sie das VacValve schließen (falls verwendet) und vorsichtig Säulenerweiterung, VacConnector und VacValve von der QIAamp Mini-Säule entfernen. Achten Sie darauf, nichts von dem Lysat in der Säulenerweiterung zu verlieren. Nehmen Sie die QIAamp Mini-Säule vom Vakuumverteiler, setzen Sie sie in ein 2-ml-Waschröhrchen und zentrifugieren Sie sie bei voller Drehzahl, bis die Probe die Membran vollständig passiert hat. Setzen Sie Säulenerweiterung, VacConnector und VacValve mit dem verbliebenen Lysat wieder auf die Säule. Schalten Sie die Vakuumpumpe ein, öffnen Sie das VacValve und laden Sie das restliche Lysat. |
|----|-----------------------------|--|










Kommentare und Vorschläge

- Wiederholen Sie dieses Vorgehen, wenn die QIAamp Mini-Säule weiterhin verstopft ist.
- Durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen könnten sich im Plasma Kryopräzipitate gebildet haben. Diese können die QIAamp Mini-Säule blockieren. Verwenden Sie kein Plasma, das mehr als einmal eingefroren und wieder aufgetaut worden ist.
- Falls Kryopräzipitate sichtbar sind, trennen Sie sie durch 5-minütige Zentrifugation bei 16.000 x g von der Probe.
- b) Variable Elutionsvolumina
Jede Probe kann sich anders auf das finale Eluatvolumen auswirken. Das Volumen des gewonnenen Eluats kann bis zu 5 µl weniger betragen als das auf die QIAamp Mini-Säule aufgegebene Elutionsvolumen.
- c) Vakuumdruck von -800 bis -900 mbar wird nicht erreicht
Die Vakuumstation ist nicht fest verschlossen. Drücken Sie nach Einschalten des Vakuums auf den Deckel des Vakuumverteilers. Überprüfen Sie, ob der Vakuumdruck erreicht wird.
Dichtung des QIAvac-Deckels hat sich abgenutzt. Überprüfen Sie visuell die Dichtung des Vakuumverteilers und ersetzen Sie sie bei Bedarf.
VacValves haben sich abgenutzt. Entfernen Sie alle VacValves und setzen Sie die VacConnectors direkt in die Luer-Aufnahmen. Setzen Sie die QIAamp Mini-Säulen in die VacConnectors, schließen Sie die Deckel der Säulen und schalten Sie das Vakuum ein. Überprüfen Sie, ob der Vakuumdruck erreicht wird. Ersetzen Sie die VacValves, falls erforderlich.
Verbindung mit der Vakuumpumpe ist undicht. Schließen Sie alle Luer-Aufnahmen mit Luer-Kappen und schalten Sie die Vakuumpumpe ein. Überprüfen Sie, ob der Vakuumdruck nach Einschalten der Pumpe (und bei geschlossenem Vacuum Regulator-Ventil) stabil bleibt. Tauschen Sie die Verbindungen zwischen Pumpe und Vakuumstation aus, falls erforderlich.
Wenn der Vakuumdruck noch immer nicht erreicht wird, ersetzen Sie die Vakuumpumpe durch eine leistungsstärkere.

Symbole

Die folgenden Symbole werden in der Gebrauchsanweisung oder auf der Verpackung und Kennzeichnung verwendet:

| Symbol | Bedeutung des Symbols |
|---|--|
|  Σ <N> | Inhalt ausreichend für <N> Reaktionen |
|  | Verfallsdatum |
|  | Dieses Produkt erfüllt die Anforderungen der europäischen Verordnung 2017/746 über In-vitro-Diagnostika. |
|  | In-vitro-Diagnostikum |
|  | Katalognummer |
|  | Chargennummer |
|  | Materialnummer (d. h. Kennzeichnung von Komponenten) |
|  | Komponenten |
|  | Enthält |
|  | Anzahl |
|  | Global Trade Item Number |

| Symbol | Bedeutung des Symbols |
|---|--|
| Rn | R steht für Revision der Gebrauchsanweisung, n ist die Revisionsnummer |
|  | Zulässiger Temperaturbereich |
|  | Hersteller |
|  | Gebrauchsanweisung beachten |
|  | Vor Sonneneinstrahlung schützen |
|  | Warnung/Vorsicht |
|  | Nach Lieferung |
|  | Bei Lieferung offen; QIAamp Mini Spin-Säulen bei 2–8 °C lagern |
|  | Volumen |
|  | Hinzugeben |

Symbol

Bedeutung des Symbols



Nach Zugabe von Ethanol in die Flasche das aktuelle Datum notieren

EtOH

Ethanol



Nach Zugabe von Isopropanol in die Flasche das aktuelle Datum notieren

IPA

Isopropanol

→

Führt zu

GITC

Guanidinthiocyanat

GuHCl

Guanidinhydrochlorid

BRIJ 58

BRIJ 58

PROTK

Proteinase K

UDI

Unique Device Identifier (eindeutige Geräteerkennung)

Anhang A: Empfehlungen für die Blutplasmatrenung und -aufbewahrung

Bitte befolgen Sie bei stabilisierten Blutentnahmeröhrchen (z. B. PAXgene ccfDNA Tube oder Streck Cell-Free DNA Tube) die Anweisungen des Herstellers für Plasmatrenung und -aufbewahrung. Wir empfehlen die Validierung dieser Aufbewahrungsbedingungen unter Berücksichtigung Ihrer speziellen nachgelagerten Anwendung und Ihres Ziels.

Bei Verwendung unstabiler Blutentnahmeröhrchen empfehlen wir die Befolgung 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 (Molekularanalytische in-vitro-diagnostische Verfahren – Spezifikationen für präanalytische Prozesse für venöse Vollblutproben – Teil 3: Aus Plasma isolierte zirkulierende zellfreie DNA) oder CEN/TS 17742 Molecular in vitro diagnostic examinations – Specifications for pre-examination processes for venous whole blood – Isolated circulating cell free RNA from plasma (Molekularanalytische in-vitro-diagnostische Verfahren – Spezifikationen für präanalytische Prozesse für venöse Vollblutproben – Isolierte zirkulierende zellfreie RNA aus Plasma).

Für die Isolierung zirkulierender, zellfreier Nukleinsäuren aus Blutproben empfehlen wir das nachstehende Protokoll. Es enthält einen Zentrifugationsschritt mit hoher g-Kraft, um Zelltrümmer zu entfernen und so die Menge an zellulärer und genomischer DNA und RNA in der Probe zu verringern.

1. Setzen Sie BD Vacutainer®-Röhrchen (oder andere Primärröhrchen, die EDTA als Koagulans enthalten) mit EDTA-Vollblut in eine auf 4 °C heruntergekühlte Zentrifuge mit Ausschwingrotor und passenden Bechern.
2. Zentrifugieren Sie die Blutproben 10 min lang bei 1900 x g (3000 rpm) und 4 °C.

3. Nehmen Sie vorsichtig den Plasma-Überstand ab, ohne den Buffy Coat zu berühren. Aus einem 10-ml-Primärröhrchen können 4–5 ml Plasma gewonnen werden.

Hinweis: In diesem Stadium kann das Plasma bereits für die Extraktion zirkulierender Nucleinsäuren verwendet werden. Allerdings werden in der nachfolgenden Zentrifugation bei hoher Geschwindigkeit weitere Zelltrümmer und Kontaminationen der zirkulierenden Nucleinsäuren durch genomische DNA und RNA, die aus beschädigten kernhaltigen Blutzellen stammt, entfernt.

4. Das abgenommene Plasma wird in ein frisches Zentrifugenröhrchen gegeben.
5. Zentrifugieren Sie die Plasmaproben 10 min lang bei 16.000 x g (in einem Festwinkelrotor) und 4 °C.

In diesem Schritt werden weitere zelluläre Nucleinsäuren, die an Zelltrümmer gebunden sind, entfernt.

6. Nehmen Sie vorsichtig den Überstand ab und übertragen Sie ihn in ein neues Röhrchen. Berühren Sie dabei nicht das Pellet.
7. Wenn aus dem Plasma am gleichen Tag Nucleinsäuren extrahiert werden sollen, bewahren Sie es bis zur weiteren Verarbeitung bei 2–8 °C auf. Eine längere Lagerung von Plasma-Aliquoten aus stabilisierten oder unstabilierten Blutentnahmeröhrchen für mindestens 4 Wochen ist bei -20 °C (DNA als Ziel) oder -80 °C (RNA als Ziel) möglich. Tauen Sie die Plasmaröhrchen vor der Extraktion zirkulierender Nucleinsäuren bei Raumtemperatur auf.
8. **Optional:** Zentrifugieren Sie die Plasmaproben 5 min lang bei 16.000 x g (in einem Festwinkelrotor), um Kryopräzipitate zu entfernen.

Optional: Übertragen Sie den Überstand in ein neues Röhrchen und beginnen Sie mit dem Protokoll zur Extraktion zirkulierender Nucleinsäuren.

Anhang B: Allgemeine Hinweise zur Handhabung von RNA

Handhabung von RNA

Ribonukleasen (RNasen) sind sehr stabile und aktive Enzyme, die üblicherweise keine Cofaktoren für ihre Funktion benötigen. Da RNasen nur schwer zu inaktivieren sind und schon geringe Mengen ausreichen, um RNA zu degradieren, dürfen Kunststoff- oder Glas-Laborartikel nur dann verwendet werden, wenn mögliche RNase-Kontaminationen beseitigt wurden. Es sollte darauf geachtet werden, dass während und nach dem Aufreinigungsverfahren keine RNase unbeabsichtigt in die RNA-Probe eingeschleppt wird. Um ein RNase-freies Umfeld zu schaffen und zu erhalten, müssen beim Arbeiten mit RNA bei der Vorbehandlung und Verwendung von Einweg- und Mehrwegbehältnissen sowie Lösungen die folgenden Vorsichtsmaßnahmen eingehalten werden.

Allgemeine Handhabung

Beim Arbeiten mit RNA sollten immer angemessene mikrobiologische und aseptische Arbeitsweisen verwendet werden. An Händen und Staubpartikeln können Bakterien und Schimmelpilze haften; sie sind die häufigste Quelle von RNase-Kontaminationen. Tragen Sie daher immer Latex- oder Vinylhandschuhe, wenn Sie mit Reagenzien oder RNA-Proben arbeiten, um eine RNase-Kontamination über die Hautoberfläche oder durch staubige Laborgeräte zu vermeiden. Wechseln Sie die Einmal-Handschuhe häufig und halten Sie Röhren möglichst immer verschlossen. Halten Sie die aufgereinigte RNA auf Eis, wenn Sie für nachfolgende Applikationen Aliquote pipettieren.

Einweg-Kunststoffartikel

Für das gesamte Verfahren wird die Verwendung steriler, RNase-freier Einwegröhren aus Polypropylen empfohlen.

Bestellinformationen

| Produkt | Inhalt | Kat.-Nr. |
|---------------------------------------|---|---|
| QIAamp DSP Circulating NA Kit (50) | Für 50 Präparationen: QIAamp Mini-Säulen, Säulenerweiterungen, VacConnectors, QIAGEN Proteinase K, Reagenzien, Puffer und Entnahmeröhrchen | 61504 |
| Zubehör | | |
| QIAvac 24 Plus vacuum manifold* | Vakuumverteiler zur Verarbeitung von 1– 24 Spin-Säulen: QIAvac 24 Plus Vacuum Manifold, Luer-Stopfen und Schnellkupplungen | 19413 |
| Vacuum Pump* | Universal-Vakuumpumpe | 84010 [USA und Kanada] 84000 [Japan] 84020 [Rest der Welt] |
| QIAvac Connecting System* | System zur Verbindung von Vakuumverteiler und Vakuumpumpe: enthält Ablage, Abfallflaschen, Schläuche, Kupplungen, Ventil, Messgerät und 24 VacValves | 19419 |

* Zur Verwendung mit Vakuumprotokollen.

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische rechtliche Haftungsausschlüsse finden Sie im Handbuch oder der Gebrauchsanweisung des jeweiligen QIAGEN-Kits. QIAGEN Kit-Handbücher und Benutzerhandbücher sind unter www.qiagen.com verfügbar oder können beim Technischen Service von QIAGEN oder Ihrem örtlichen Händler angefordert werden.

Bearbeitungshistorie des Dokuments

Revision

Beschreibung

R1, Juni 2022

Veröffentlichung IVDR Kit Version 2, keine Änderungen an Protokollen oder Leistungsdaten gegenüber Kit-Version 1; Ergänzung der „manuellen“ Isolierung unter „Verwendungszweck“; geringfügige Aktualisierungen und Korrekturen

Diese Seite wurde absichtlich leer gelassen

Diese Seite wurde absichtlich leer gelassen

Eingeschränkte Nutzungsvereinbarung für das QIAamp DSP Circulating NA Kit

Mit der Nutzung dieses Produkts erkennen Käufer oder Anwender des Produkts die folgenden Bedingungen an:

1. Das Produkt darf nur gemäß den mit dem Produkt und diesem Handbuch bereitgestellten Protokollen und nur mit den Komponenten, die im Panel mitgeliefert werden, verwendet werden. QIAGEN gewährt im Rahmen ihrer Eigentumsrechte keinerlei Lizenz, die zum Panel gehörenden Komponenten mit anderen Komponenten, die nicht zum Panel gehören, zu verwenden oder zu kombinieren, mit Ausnahme der mit dem Produkt, diesem Handbuch, bereitgestellten und in zusätzlichen, unter www.qiagen.com verfügbaren Protokollen beschriebenen Anwendungen. Einige dieser zusätzlichen Protokolle wurden von QIAGEN-Anwendern für andere QIAGEN-Anwender zur Verfügung gestellt. Diese Protokolle wurden von QIAGEN nicht eingehend geprüft oder optimiert. QIAGEN übernimmt für diese Protokolle keine Garantie und garantiert auch nicht, dass sie keine Rechte Dritter verletzen.
2. Über die ausdrücklich erwähnten Lizenzanwendungen hinaus übernimmt QIAGEN keinerlei Garantie dafür, dass dieses Panel und/oder die mit diesem Panel durchgeführte(n) Anwendung(en) die Rechte Dritter nicht verletzen.
3. Dieses Panel und die zugehörigen Komponenten sind für die einmalige Verwendung lizenziert und dürfen nicht wiederverwendet, wiederaufgearbeitet oder weiterverkauft werden.
4. QIAGEN lehnt außer der ausdrücklich gewährten Lizenzgewährung jede weitere Lizenzgewährung ab, sowohl ausdrücklich als auch konkludent.
5. Käufer und Anwender des Panels stimmen zu, keinerlei Schritte zu unternehmen oder anderen die Einleitung von Schritten zu gestatten, die zu unerlaubten Handlungen im obigen Sinne führen oder solche erleichtern könnten. QIAGEN kann die Verbote dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung an jedem Ort gerichtlich geltend machen und wird sämtliche Ermittlungs- und Gerichtskosten, inklusive Anwaltsgebühren, zurückfordern, die ihr bei der Geltendmachung dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung oder irgendeines ihrer geistigen Eigentumsrechte im Zusammenhang mit dem Panel und/oder seinen Komponenten entstehen. Aktualisierte Nutzungs- und Lizenzbedingungen finden Sie unter www.qiagen.com.

Warenzeichen: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, (QIAGEN Group); Agilent® (Agilent Technologies, Inc.); BD™, Vacutainer® (Becton Dickinson and Company); PAXgene® (PreAnalytiX GmbH); Tween™ (ICI Americas Inc.). Eingetragene Marken, Warenzeichen usw., die in diesem Dokument verwendet werden, gelten auch ohne ausdrückliche Kennzeichnung als gesetzlich geschützt.

Jun-2022 HB-3049-001 1127632 © 2022 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

