

Januari 2021

Bruksanvisning (handbok) till QIAamp[®] DSP Virus Spin Kit



Version 1



För in vitro-diagnostisk användning



61704



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden
Tel: +49-2103-29-0



1122785SE



Innehåll

Avsedd användning	5
Beskrivning och förfarande	6
Automatisk rening av virala nukleinsyror i QIAcube eller QIAcube Connect MDx.....	6
Sammanfattning och förklaring	13
Material som medföljer.....	14
Kitinnehåll	14
Material som behövs men inte medföljer.....	15
Varningar och försiktighetsåtgärder	16
Säkerhetsinformation	16
Förvaring och hantering av reagenser	19
Förvaring och hantering av prover	19
Procedur.....	20
Viktigt att tänka på före start.....	20
Hantering av QIAamp MinElute-kolonner	21
Centrifugering.....	21
Bearbetning av QIAamp MinElute-kolonner i en mikrocentrifug	22
Förbereda reagenser och buffertar	22
Protokoll: Rening av virala nukleinsyror från plasma eller serum med en mikrocentrifug eller QIAcube/QIAcube Connect MDx	26
Kvalitetskontroll	30
Begränsningar.....	30
Symboler	31

Kontaktinformation.....	33
Bilaga	34
Beställningsinformation.....	37
Dokumentrevisioner.....	39

Avsedd användning

QIAamp DSP Virus Spin Kit är ett system som använder kvartsmembranteknik (QIAamp-teknik) för isolering och rening av virala nukleinsyror från biologiska prover.

Produkten är avsedd att användas av yrkesanvändare, t.ex. laboratorietekniker och läkare som är utbildade i molekylärbiologiska tekniker.

QIAamp DSP Virus Spin Kit är avsedd för in vitro-diagnostiskt bruk.

Beskrivning och förfarande

QIAamp DSP Virus Spin-förfarandet består av 4 steg (lysering, bindning, tvätt, eluering) och utförs med användning av QIAamp MinElute®-kolonner i en mikrocentrifug av standardtyp eller automatiserat i QIAcube och QIAcube Connect MDx. Processen är utformad för att minimera risken för korskontaminering mellan prover och medger säker hantering av potentiellt smittbärande prover. Det enkla QIAamp DSP Virus Spin-förfarandet passar för simultan bearbetning av flera prover. QIAamp DSP Virus Spin Kit kan användas för isolering av viralt RNA och DNA från ett brett urval av RNA- och DNA-virus. Prestandaegenskaperna för varje virusart har emellertid inte fastställts, och måste valideras av användaren.

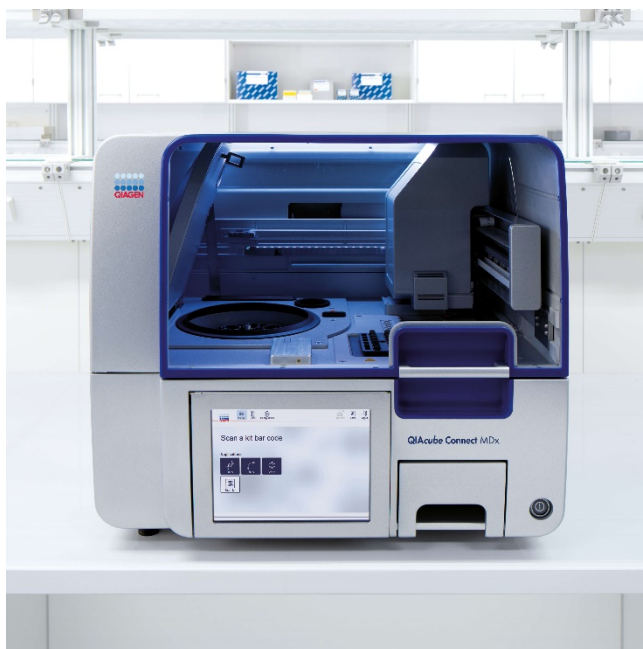
Automatisk rening av virala nukleinsyror i QIAcube eller QIAcube Connect MDx

QIAcube och QIAcube Connect MDx utför automatiserad isolering och rening av nukleinsyror. Den kan bearbeta upp till 12 prover per enskild körning.

Om QIAamp DSP Virus Spin Kit automatiseras i QIAcube Connect MDx kan instrumentet bearbeta färre än 50 prover på grund av dödvolym, avdunstning och extra reagensförbrukning genom automatiserad pipettering. QIAGEN garanterar endast 50 provberedningar vid manuell användning av QIAamp DSP Virus Spin Kit.



Figur 1. QIAcube.



Figur 2. QIAcube Connect MDx.

Lysering med QIAGEN Protease

Proverna lyseras under högdenaturerande förhållanden vid förhöjda temperaturer. Lysering utförs i närvaro av QIAGEN Protease och Buffer AL, som tillsammans säkerställer inaktivering av RNaser.

Adsorption av QIAamp MinElute-membranet

Bindningsförhållandena justeras genom att tillsätta etanol för att medge optimal bindning av viralt RNA och DNA till membranet. Lysatet överförs därefter till en QIAamp MinElute-kolonn, och virala nukleinsyror adsorberas till kvartsgelmembranet när lysatet dras igenom detta med hjälp av centrifugering. Salt- och pH-förhållandena säkerställer att protein och andra

kontaminanter som kan försämra PCR och andra nedströms enzymatiska reaktioner inte fastnar på QIAamp MinElute-membranet.

Tvättrören på 2 ml (medföljer) stödjer QIAamp MinElute-kolonnen under laddnings- och tvättstegen.

Avlägsnande av restkontaminanter

Nukleinsyrorna förblir bundna till membranet medan kontaminanterna effektivt tvättas bort under 3 tvättsteg. I ett och samma steg elueras högrenat viralt RNA och DNA i Buffer AVE, som ekvilibrerats till rumstemperatur.

Eluering av rena nukleinsyror

Eluering sker med användning av Buffer AVE. QIAamp MinElute-kolonnerna möjliggör minimala elueringsvolymen på endast 20 µl. Låga elueringsvolymen leder till högkoncentrerade nukleinsyreeluat.

För nedströms applikationer som kräver små startvolymen (t.ex. vissa PCR- och RT-PCR-analyser) kan ett mer koncentrerat eluat öka analysens känslighet.

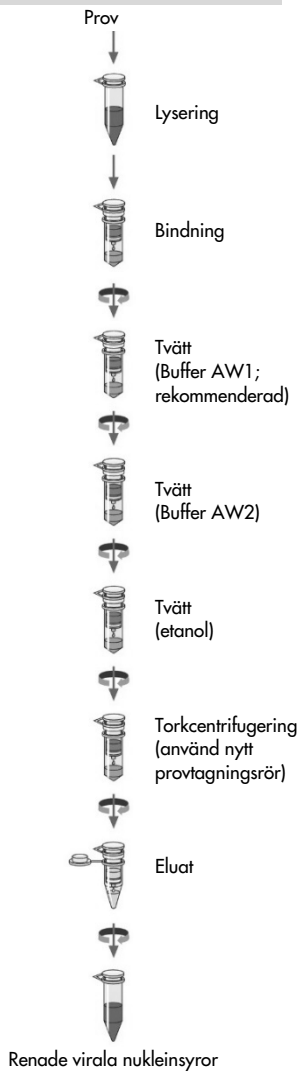
För nedströms applikationer som kräver en större startvolym kan elueringsvolymen ökas upp till 150 µl. En ökning av elueringsvolymen kommer emellertid att minska koncentrationen på nukleinsyror i eluatet.

Den erhållna eluatvolymen kan vara upp till 5 µl mindre än den volym elueringsbuffert som tillsattes till kolonnen. En elueringsbuffertvolym på 20 µl leder till exempel till > 15 µl slutligt eluat. Utbytesvolymen av eluatet beror på provets natur.

Eluerade nukleinsyror samlas upp i 1,5 ml elueringsrör (ET, medföljer). Förvaring av DNA eller RNA vid -30 till -15 °C rekommenderas.

Utbytet av virala nukleinsyror som isolerats från biologiska prover är normalt under 1 µg. Kvantitativa amplifieringsmetoder rekommenderas för att fastställa utbytet. Vid kvantifiering av nukleinsyror som isolerats med användning av QIAamp DSP Virus Spin-protokollet måste man komma ihåg att det kommer att finnas avsevärt mer bärar-RNA i provet än viralt RNA.

QIAamp DSP Virus Spin-förfarandet



Automatiserbart på QIAcube/QIAcube Connect MDx

Bärrar-RNA

Bärrar-RNA har två funktioner: För det första förbättrar det bindningen av virala nukleinsyror till QIAamp-membranet, särskilt om det är mycket få målmolekyler i provet. För det andra minskar tillsatsen av stora mängder bärrar-RNA risken för viral RNA-nedbrytning i den sällsynta händelsen att RNase-molekylerna undgår denatureringen genom de kaotropiska salterna och rengöringsmedlen i Buffer AL. Om bärrar-RNA inte tillsätts Buffer AL kan, detta leda till minskad återhämtning av viralt RNA eller DNA.

Olika amplifieringssystem har varierande effektivitet beroende på den totala mängden nukleinsyra som förekommer i reaktionen. Eluat från denna sats innehåller både virala nukleinsyror och bärrar-RNA, och mängden bärrar-RNA överstiger vida mängden virala nukleinsyror. Beräkningar av hur mycket eluat som ska tillsättas till nedströms amplifieringar ska därför baseras på mängden tillsatt bärrar-RNA. För att erhålla högsta känslighetsnivå på amplifieringsreaktionerna kan det bli nödvändigt att justera mängden bärrar-RNA som tillsätts till Buffer AL.

Tillsats av interna kontroller

Om man vill använda QIAamp DSP Virus Spin-protokollet i kombination med kommersiellt tillgängliga amplifieringssystem kan man behöva införa en intern kontroll i reningsprocessen. Internt kontroll-RNA eller -DNA ska tillsättas tillsammans med bärrar-RNA till lyseringsbufferten. För optimal renings effektivitet ska de interna kontrollmolekylerna inte vara längre än 200 nukleotider, då mindre molekyler inte återhämtas på ett effektivt sätt.


Se tillverkarens anvisningar för att fastställa optimal koncentration. Om man använder en annan koncentration än vad som rekommenderas kan amplifieringens effektivitet försämrats.

Sammanfattning och förklaring

QIAamp DSP Virus Spin Kit använder en väletablerad teknik för samtidig rening av viralt DNA och RNA. Satsen kombinerar de selektivt bindande egenskaperna hos ett silikonbaserat membran med flexibla elueringsvolymmer mellan 20 och 150 µl. Förfarandet lämpar sig för användning med plasma och serum. Proverna kan vara antingen färska eller frysta, under förutsättning att de inte har frysts in och tinats upp mer än en gång (se sida 19). Virala nukleinsyror elueras i Buffer AVE, bruksfärdigt för amplifieringsreaktioner eller förvaring vid -30 till -15 °C.

Material som medföljer

Kitinnehåll

QIAamp DSP Virus Spin Kit			
Katalognr.			61704
Antal beredningar			50 ^s
QIAamp MinElute	QIAamp MinElute Columns with Wash Tubes (WT) (QIAamp MinElute-kolonner med tvättrör (WT)) (2 ml)	COL	50
LT	Lysis Tubes (lyseringsrör) (2 ml)	LYS TUBE	50
ET	Elution Tubes (Elueringsrör) (1,5 ml)	ELU TUBE	50
WT	Wash Tubes (Tvättrör) (2 ml)	WASH TUBE	5 x 50
AL	Lysis Buffer* (lyseringsbuffert)	LYS BUF	33 ml
AW1	Wash Buffer 1* (Tvättbuffert 1) (koncentrat)	WASH BUF 1 CONC	19 ml
AW2	Wash Buffer 2† (Tvättbuffert 2) (koncentrat)	WASH BUF 2 CONC	13 ml
AVE	Elution Buffer† (Elueringsbuffert) (lila lock)	ELU BUF	4 x 2 ml
PS	Protease Solvent† (Proteaslösningsmedel)	QPROT SOLV	4,4 ml
Carrier	Carrier RNA (Bärrar-RNA) (röda lock)	CAR RNA	310 µg
QP	QIAGEN Protease‡	QPROT	1 flaska
–	Bruksanvisning (Handbok)		1

* Innehåller kaotopiskt salt. Vidta lämpliga säkerhetsåtgärder och använd handskar vid hantering. Inte kompatibel med desinfektionsmedel med blekmedel. För ytterligare information, se sida 16.

† Innehåller natriumazid som konserveringsmedel.

‡ Se "Förbereda reagenser och buffertar", sida 22.

^s Om QIAamp DSP Virus Spin Kit automatiseras på instrumentet QIAcube eller QIAcube Connect MDx kan instrumentet bearbeta färre än 50 prover på grund av dödvolym, avdunstning och ytterligare reagensförbrukning genom automatiserad pipettering. QIAGEN garanterar endast 50 provberedningar vid manuell användning av QIAamp DSP Virus Spin Kit.

Material som behövs men inte medföljer

Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (Safety Data Sheets, SDS) som kan erhållas av respektive tillverkare.

- Etanol (96–100 %)*
- Pipetter† och pipettspetsar (för att förhindra korskontaminering rekommenderar vi starkt användning av pipettspetsar med aerosolbarriärer)
- Värmeblock† för lysning av prover vid 56 °C
- Mikrocentrifug† (med rotor för 1,5 ml och 2 ml provrör)
- Vortexblandare
- För prover <200 µl: 0,9 % klorinlösning

Endast för det automatiserade förfarandet

- Rotor Adapters, kat.nr 990394
- Rotor Adapter Holder, kat.nr. 990392
- Sample Tubes CB (2 ml), kat.nr. 990382 (provinmatningsrör)
- Shaker Rack Plugs, kat.nr. 9017854
- Reagent Bottles, 30 ml, kat.nr 990393
- Filter-Tips, 1000 µl, kat.nr. 990352
- Filter-Tips, 1000 µl, breda, kat.nr. 990452
- Filter-Tips, 200 µl, kat.nr. 990332
- SafeSeal Tube, 1,5 ml, Sarstedt® (kat.nr. 72.706)

* Använd inte denaturerad alkohol som innehåller andra substanser såsom metanol eller metyletylketon.

† För att säkerställa att proverna bearbetas ordentligt under processerna i QIAamp DSP Virus Spin Kit rekommenderar vi bestämt att instrumenten (t.ex. pipetter och värmeblock) kalibreras i enlighet med tillverkarnas rekommendationer.

Varningar och försiktighetsåtgärder

Var medveten om att du kan behöva rapportera allvarliga incidenter som inträffat i samband med enheten till tillverkaren och den tillsynsmyndighet där användaren och/eller patienten befinner sig.

Säkerhetsinformation

För in vitro-diagnostisk användning

Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (safety data sheets, SDS). De finns tillgängliga på webben i behändigt PDF-format på adressen www.qiagen.com/safety, där du kan hitta, visa och skriva ut säkerhetsdatablad för varje QIAGEN-kit och kitkomponent.



FÖRSIKTIGHET: Tillsätt INTE blekmedel eller sura lösningar direkt i avfallet från provberedningen.

Buffer AL och Buffer AW1 innehåller guanidinhydroklorid som kan bilda starkt reaktiva sammansättningar i kombination med blekmedel. Om vätska med dessa buffertar spills ut ska rengöring utföras med lämpliga laboratorierengöringsmedel och vatten. Om den spillda vätskan innehåller potentiellt smittsamma ämnen ska området först rengöras med laboratorierengöringsmedel och vatten och därefter med 1 % (v/v) natriumhypoklorit.

Om buffertflaskorna är skadade eller läcker ska man använda handskar och skyddsglasögon när flaskorna kastas för att undvika personlig skada eller skada på andra.

QIAGEN har inte testat det vätskeavfall som genereras av QIAamp DSP Virus Spin-procedurer för resterande smittbärande material. Kontamination av det flytande avfallet med smittsamt

restmaterial är mycket osannolikt men kan inte fullständigt uteslutas. Därför måste det flytande avfallet anses vara smittsamt och ska hanteras och kastas i enlighet med lokala säkerhetsbestämmelser.

Följande risk- och skyddsmeddelanden gäller för komponenterna i QIAamp DSP Virus Spin Kit:

Buffer AL



Innehåller: guanidinhydroklorid; maleinsyra. Varning! Kan vara skadligt vid förtäring eller inandning. Irriterar huden. Orsakar allvarlig ögonirritation. Kan orsaka allergisk hudreaktion. Vid bestående ögonirritation: Sök läkarhjälp. Nedstänkta kläder tas av och tvättas innan de används igen. Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd.

Buffer AW1



Innehåller guanidinhydroklorid. Varning! Skadligt vid förtäring eller inandning. Irriterar huden. Orsakar allvarlig ögonirritation. Kontakta GIFTINFORMATIONSCENTRAL eller läkare om du känner dig sjuk. Innehållet/behållaren lämnas till en godkänd avfallsanläggning. Nedstänkta kläder tas av och tvättas innan de används igen. Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd.

QIAGEN Protease



Innehåller: Subtilisin. Fara! Orsakar lindrig hudirritation. Orsakar allvarlig ögonskada. Kan orsaka allergi- eller astmaliknande symptom eller andningssvårigheter vid inandning. Inandas inte damm/rök/gaser/dimma/ångor/sprej. Innehållet/behållaren lämnas till en godkänd avfallsanläggning. Vid besvär i luftvägarna: Kontakta GIFTINFORMATIONSCENTRAL eller läkare. VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja. VID INANDNING: Vid andningsbesvär, flytta personen till frisk luft och se till att han eller hon vilar i en ställning som underlättar andningen. Kontakta genast GIFTINFORMATIONSCENTRALEN/läkare. Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd. Använd andningsskydd.

Förvaring och hantering av reagenser

QIAamp MinElute-kolonner ska förvaras vid 2–8 °C vid ankomsten. Alla buffertar kan förvaras i rumstemperatur (15–25 °C).

Frystorkat bärar-RNA kan förvaras vid rumstemperatur fram till det utgångsdatum som står angivet på kitets kartong. Bärar-RNA kan endast lösas upp i AVE-buffert, löst bärar-RNA ska omedelbart tillsättas Buffer AL enligt beskrivningen på sidan 22 för det manuella förfarandet. Denna lösning ska beredas färsk, och är hållbar vid 2–8 °C i upp till 48 timmar. Oanvända delar av bärar-RNA upplöst i Buffer AVE ska frysas i alikvoter vid -30 till -15 °C.

Frystorkat QIAGEN Protease (QP) kan förvaras i rumstemperatur fram till satsens utgångsdatum utan att dess prestanda påverkas.

QIAGEN Protease (QP) som rekonstituerats i proteaslösningsmedel (PS) är hållbart i upp till ett år vid förvaring vid 2–8 °C, men endast fram till satsens utgångsdatum. Förvaring av QIAGEN Protease-stamlösning i rumstemperatur under långa tidsperioder bör undvikas.

Rekonstituerad tvättbuffert 1 (AW1) och rekonstituerad tvättbuffert 2 (AW2) är hållbara i upp till ett år vid förvaring i rumstemperatur men endast fram till det utgångsdatum som står på kitets kartong.

Förvaring och hantering av prover

Efter provtagning och centrifugering kan plasma eller serum förvaras vid 2–8 °C i upp till 6 timmar. För långvarig förvaring rekommenderas frysning vid -80 till -20 °C i alikvoter. Frysta plasma- eller serumprover får inte tinas upp mer än en gång. Upprepad infrysning-upptining leder till denaturering och utfällning av proteiner, vilket kan resultera i minskade virala titrer och därmed minskat utbyte av virala nukleinsyror. Dessutom kan kryoprecipitat som bildas under frysning-upptining sätta igen QIAamp MinElute-membranet. Om kryoprecipitat är synliga kan de pelleras genom centrifugering vid cirka 6800 x g i 3 minuter. Den klarnade supernatanten ska avlägsnas och bearbetas omedelbart utan att rubba pelleten.

Procedur

Viktigt att tänka på före start

- Kontrollera att satskomponenterna inte är skadade efter mottagande av satsen. Om blisterförpackningar eller buffertflaskor är skadade ska du kontakta QIAGEN teknisk service eller den lokala distributören. Vid vätskespill, se Varningar och försiktighetsåtgärder (sid 16) Använd inte skadade satskomponenter eftersom det kan leda till dålig satsprestanda.
- Använd alltid RNase-fri utrustning.
- Byt alltid pipettspetsar mellan vätskeöverföringar. Användning av pipettspetsar med aerosolbarriärer rekommenderas för att minimera korskontaminering.
- Alla centrifugeringssteg utförs i rumstemperatur (15–25 °C).
- Använd alltid engångshandskar och kontrollera regelbundet att de inte kontaminerats av provmaterial. Kasta handskar om de blir kontaminerade.
- Öppna endast ett rör åt gången för att minimera korskontaminering.
- Använd inte satskomponenter från andra satser med den sats som för närvarande används såvida inte lotnumren är identiska.
- Undvik mikrobiell kontaminering av satsreagenser.
- Arbete under laminära luftflödesförhållanden rekommenderas tills proverna har lyserats för att undvika kontaminering från potentiellt smittsamma material.
- Följ anvisningarna från protokollbladen (QIAcube) eller på programskärmen (QIAcube Connect MDx) för automatisering och referera till relevanta användarhandböcker (för QIAcube och QIAcube Connect MDx).
- Denna sats bör endast användas av personal utbildad i in vitro-diagnostisk laboratoriepraxis.

Hantering av QIAamp MinElute-kolonner

På grund av nukleinsyreamplifieringsteknikens höga känslighet är följande försiktighetsåtgärder nödvändiga vid hantering av QIAamp MinElute-kolonner för att förhindra korskontaminering mellan provberedningarna:

- Applicera försiktigt provet eller lösningen till QIAamp MinElute-kolonnen. Pipettera provet i QIAamp MinElute-kolonnen utan att blöta ned kolonnens kant.
- Byt pipettspetsar mellan alla vätskeöverföringar. Användning av pipettspetsar med aerosolbarriär rekommenderas.
- Undvik att vidröra QIAamp MinElute-membranet med pipettspetsen.
- Efter puls-vortexblandning ska mikrocentrifugrören centrifugeras kortvarigt för att avlägsna droppar från lockets insida.
- Använd laboratoriehanskar under hela processen. Om handskarna kommer i kontakt med provet skall de genast bytas ut.

Centrifugering

- Tvättrör och elueringsrör för alla centrifugeringssteg medföljer satsen.
- Centrifugering av QIAamp MinElute-kolonnerna görs vid cirka 6000 x g för att minska centrifugljudet. Att centrifugera QIAamp MinElute-kolonnerna med full hastighet påverkar inte DNA- eller RNA-utbytet.
- För torkcentrifugeringen i slutet av tvättprocessen samt för eluering ska centrifugering utföras vid full hastighet.
- Samtliga centrifugeringssteg ska utföras vid rumstemperatur (15–25 °C).

Bearbetning av QIAamp MinElute-kolonner i en mikrocentrifug

- Stäng QIAamp MinElute-kolonnen innan du placerar den i mikrocentrifugen. Centrifugera enligt beskrivningen.
- Ta bort QIAamp MinElute-kolonnen och tvättröret från mikrocentrifugen.
- Placera QIAamp MinElute-kolonnen i ett nytt tvättrör. Kassera filtratet och tvättröret. Observera att filtratet kan innehålla farligt avfall och ska kasseras på lämpligt sätt.
- Öppna endast en QIAamp MinElute-kolonn åt gången och undvik aerosolbildning.

För en effektiv parallell bearbetning av flera prover rekommenderar vi att ett ställ fylls med tvättrör, så att QIAamp MinElute-kolonnerna kan överföras efter centrifugeringen. Använda tvättrör som innehåller filtrat kan kasseras, och de nya tvättrören som innehåller QIAamp MinElute-kolonner kan placeras direkt i mikrocentrifugen.

Förbereda reagenser och buffertar

- Beredning av RNA

Vid beredning av viralt RNA ska du genomföra de manuella stegen i processen snabbt och läsa Bilaga på sidan 34 innan du börjar.

- Förbereda QIAGEN Protease

Tillsätt hela innehållet i flaskan med 4,4 ml proteaslösningsmedel (PS) till flaskan med frystorkad QIAGEN Protease (QP) och blanda noga. Blanda genom att vända flaskan flera gånger för att undvika skumbildning. Se till att QIAGEN Protease (QP) är fullständigt upplöst.



Tillsätt inte QIAGEN Protease (QP) direkt i Buffer AL. *

* Innehåller kaotropiska salter. Vidta lämpliga säkerhetsåtgärder och använd handskar vid hantering. Inte kompatibel med desinfektionsmedel med blekmedel. Säkerhetsinformation finns på sidan 16.

QIAGEN Protease (QP) som rekonstituerats i proteaslösningsmedel (PS) är hållbart i ett år vid förvaring vid 2–8 °C, men endast fram till satsens utgångsdatum. Förvaring av QIAGEN Protease-stamlösning i rumstemperatur under långa tidsperioder bör undvikas.

- Tillsätta bärar-RNA till Buffer AL* (endast för det manuella förfarandet)

Tillsätt 310 µl Buffer AVE till röret som innehåller 310 µg frystorkat bärar-RNA för att erhålla en lösning med 1 µg/µl. Lös upp bärar-RNA grundligt, dela upp det i alikvoter med lämplig storlek och förvara det i -25 till -15 °C. Undvik att frysa och tina upp alikvoterna med bärar-RNA mer än 3 gånger.



Det går inte att lösa upp bärar-RNA i AL-buffert. Det måste först lösas upp i Buffer AVE, och därefter tillsättas till Buffer AL.

Beräkna den volym Buffer AL-bärar-RNA-blandning som behövs per provsats genom att välja antalet prover som ska bearbetas samtidigt i tabell 1, sida 24. Vid större antal prover kan volymerna beräknas med hjälp av provberäkningen nedan:

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

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

där: n = antalet prover som ska bearbetas samtidigt

y = beräknad volym Buffer AL

z = den volym bärar-RNA-Buffer AVE som ska tillsättas till Buffer AL

Blanda försiktigt genom att vända röret 10 gånger. För att undvika skumbildning, vortexblanda inte. För det automatiserade förfarandet, utförs tillsatsen av bärar-RNA till Buffer AL av QIAcube/QIAcube Connect MDx.

* Innehåller kaotropiska salter. Vidta lämpliga säkerhetsåtgärder och använd handskar vid hantering. Inte kompatibel med desinfektionsmedel med blekmedel. Säkerhetsinformation finns på sidan 16.

Tabell 1. Volym av Buffer AL och bärar-RNA-Buffer AVE-blandning som krävs för specifika antal prover för QIAamp DSP Virus Spin-processen

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



Provberedningsproceduren är optimerad för 5,6 µg bärar-RNA per prov. Om mindre bärar-RNA har visat sig vara bättre för ditt amplifieringssystem ska endast erforderlig mängd upplöst bärar-RNA överföras till provrören med Buffer AL. För varje mikrogram bärar-RNA som krävs per preparering ska 5 µl AVE-buffert-upplöst bärar-RNA tillsättas per milliliter Buffer AL. Användning av mindre än 5,6 µg bärar-RNA per prov måste valideras för varje specifik provtyp och nedströms analys.

Buffer AW1 *

Tillsätt 25 ml etanol (96–100 %) till en flaska innehållande 19 ml Buffer AW1-koncentrat enligt beskrivningen på flaskan. Markera kryssrutan på etiketten för att visa att etanol har tillsatts. Förvara rekonstituerad Buffer AW1 vid rumstemperatur. Rekonstituerad Buffer AW1 är hållbar i upp till ett år vid förvaring vid rumstemperatur, men endast fram till satsens utgångsdatum.



Blanda alltid rekonstituerad Buffer AW1 genom att skaka den innan du startar processen.

Buffer AW2†

Tillsätt 30 ml etanol (96–100 %) till en flaska innehållande 13 ml Buffer AW2-koncentrat enligt beskrivningen på flaskan. Markera kryssrutan på etiketten för att visa att etanol har tillsatts. Förvara rekonstituerad Buffer AW2 vid rumstemperatur. Rekonstituerad Buffer AW2 är hållbar i upp till ett år vid förvaring vid rumstemperatur, men endast fram till satsens utgångsdatum.



Blanda alltid rekonstituerad Buffer AW2 genom att skaka den innan du startar processen.

Eluering av nukleinsyror

Elueringsbuffert ska ekvibreras till rumstemperatur innan den tillförs till kolonnen.

* Innehåller kaotropiska salter. Vidta lämpliga säkerhetsåtgärder och använd handskar vid hantering. Inte kompatibel med desinfektionsmedel med blekmedel. Säkerhetsinformation finns på sidan 16.

† Innehåller natriumazid som konserveringsmedel.

Protokoll: Rening av virala nukleinsyror från plasma eller serum med en mikrocentrifug eller QIAcube/QIAcube Connect MDx

För rening av virala nukleinsyror från 200 µl plasma eller serum med användning av QIAamp DSP Virus Spin Kit används en mikrocentrifug eller automatiserat på QIAcube eller QIAcube Connect MDx.

Viktigt att tänka på före start

- Alla centrifugeringssteg utförs i rumstemperatur (15–25 °C).
- Proceduren nedan ger anvisningar för bearbetning av ett enskilt prov. Flera prov kan emellertid bearbetas samtidigt. Antalet beror på kapaciteten för den mikrocentrifug som används.
- Automatiserad bearbetning av 2–10 eller 12 prov kan utföras på QIAcube eller QIAcube Connect MDx.
- Följ anvisningarna från protokollbladen (QIAcube) eller på programskärmen (QIAcube Connect MDx) för automatisering och referera till relevanta användarhandböcker (för QIAcube och QIAcube Connect MDx).


Saker som måste göras före start

- Ekvilibrera proverna till rumstemperatur (15–25 °C).
- Ekvilibrera Buffer AVE till rumstemperatur för eluering i steg 14.
- Sätt ett värmeblock på 56 °C ± 3 °C för användning i steg 4.
- Se till att Buffer AW1, Buffer AW2 och QIAGEN Protease har beretts i enlighet med anvisningarna på sidorna 20–25.
- Tillsätt bärar-RNA rekonstituerat i Buffer AVE till Buffer AL i enlighet med anvisningarna på sida 22 (endast för det manuella förfarandet).

Procedur

- För det manuella förfarandet med mikrocentrifug, följ stegen 1–14
 - Det här förfarandet kan automatiseras på QIAcube Connect Mdx i två olika versioner:
 - Plasma eller Serum_Standard: Fullständig automatisering med 200 µl prov (med start från steg 1)
 - Plasma eller Serum_Manual lysering: Delvis automatiserad med manuell extern lysering med 200 µl volym initialprov (med start efter steg 5)
- Obs! För protokollval på QIAcube, se protokollbladen (<https://www.qiagen.com/us/qiacube/standard/search/>).

1. Pipettera 25 µl QIAGEN Protease (QP) i ett lyseringsrör (LT).

 Läs Förbereda reagenser och buffertar på sida 22 för information om resuspendering av QIAGEN Protease (QP) i proteaslösningsmedel (PS).

2. Tillsätt 200 µl plasma eller serum till lyseringsröret (LT).

Om provvolymen är mindre än 200 µl ska lämplig volym 0,9 % natriumkloridlösning, tillsättas för en total volym av proteas och prov på 225 µl.

3. Tillsätt 200 µl Buffer AL (innehållande 28 µg/ml bärar-RNA). Stäng locket och blanda med puls-vortexblandning i ≥ 15 s.

För att säkerställa effektiv lysering är det viktigt att provet och Buffer AL blandas nogga för att få fram en homogen lösning.

 Tillsätt inte QIAGEN Protease (QP) direkt i Buffer AL.

4. Inkubera vid $56\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $15\text{ min} \pm 1\text{ min}$ i ett värmeblock.

5. Centrifugera lyseringsröret (LT) som hastigast för att avlägsna droppar från locket insida.

Obs! Om manuell lysering (steg 1–5) utfördes externt så kan följande steg (steg 6–14) automatiseras: "Protokoll för manuell lysering" på QIAcube eller QIAcube Connect MDx eller "Large Plasma samples_Manual lysis protocol" (protokoll för manuell lysering av stora plasmaprover) på QIAcube.

6. Tillsätt 250 µl etanol (96–100 %) till provet, stäng locket och blanda noggrant med puls-vortexblandning i ≥ 15 s. Inkubera lysatet med etanol i 5 min \pm 30 s vid rumstemperatur (15–25 °C).



Om rumstemperaturen är högre än 25 °C ska etanolen kylas på is innan den tillsätts lysatet.

7. Centrifugera provröret som hastigast för att avlägsna droppar från locket insida.

8. Applicera försiktigt allt lysat från steg 7 i QIAamp MinElute-kolonnen utan att blöta ned kanten. Stäng locket och centrifugera vid cirka 6000 x g i > 1 minut. Placera QIAamp MinElute-kolonnen i ett rent 2 ml tvättrör (WT) och kasta röret med filtratet.

Om lysatet inte har passerat helt genom kolonnen efter centrifugeringen ska du centrifugera på nytt vid en högre hastighet tills QIAamp MinElute-kolonnen är tom.

9. Öppna försiktigt QIAamp MinElute-kolonnen och tillsätt 500 µl Buffer AW1 utan att blöta ned kanten. Stäng locket på förslut och centrifugera vid cirka 6000 x g i ≥ 1 minut. Placera QIAamp MinElute-kolonnen i ett rent 2 ml tvättrör (WT) och kasta röret med filtratet.

10. Öppna försiktigt QIAamp MinElute-kolonnen och tillsätt 500 µl Buffer AW2 utan att blöta ned kanten. Stäng locket och centrifugera vid cirka 6000 x g i > 1 minut. Placera QIAamp MinElute-kolonnen i ett rent 2 ml tvättrör och kasta röret med filtratet.

11. Öppna försiktigt QIAamp MinElute-kolonnen och tillsätt 500 µl etanol (96–100 %) utan att blöta ned kanten. Stäng locket och centrifugera vid cirka 6000 x g i > 1 minut. Kasta röret med filtratet.

Korsöverföring av etanol till eluatet kan orsaka problem för nedströms applikationer.


Vissa centrifugorotorer kan vibrera vid inbromsningen, vilket kan leda till att genomflöde som innehåller etanol kommer i kontakt med QIAamp MinElute-kolonnen. Borttagning av QIAamp MinElute-kolonnen och tvättröret från rotorn kan också orsaka att genomflöde kommer i kontakt med QIAamp MinElute-kolonnen.


12. Placera QIAamp MinElute-kolonnen i ett rent 2 ml tvättrör (WT). Centrifugera i full hastighet (cirka 20 000 x g) i 3 min \pm 30 s för att torka membranet helt.

13. Placera QIAamp MinElute-kolonnen i ett nytt 2 ml tvättrör (WT), öppna locket och inkubera enheten vid $56\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $3\text{ min} \pm 30\text{ s}$ för att torka membranet helt.

Detta steg leder till avdunstning av eventuell kvarvarande vätska.

14. Placera QIAamp MinElute-kolonnen i ett elueringsrör (ET), och kassera det tvättrör som innehåller filtratet. Öppna försiktigt locket på QIAamp MinElute-kolonnen och tillsätt 20–150 μl Buffer AVE mitt på membranet. Stäng locket och inkubera i rumstemperatur i 5 minuter. Centrifugera i full hastighet (cirka 20 000 $\times g$) i >1 minut.

 För alla automatiserade procedurer, ta ut eluaten från instrumentet direkt efter att körningen avslutats och förvara dem korrekt.

 Se till att elueringsbufferten ekvilibreras till rumstemperatur. Om elueringen görs i små volymer (<50 μl) måste elueringsbufferten dispenserats mitt på membranet för fullständig eluering av bundet RNA och DNA.

Elueringsvolymen är flexibel och kan anpassas efter behoven hos nedströms applikationer. Kom ihåg att den återhämtade elueringsvolymen kommer att vara ungefär 5 μl mindre än den elueringsbuffertvolym som applicerades i kolonnen.

Kvalitetskontroll

För att säkerställa en enhetlig produktkvalitet testas varje lot av QIAamp DSP Virus Spin Kit med fastställda specifikationer enligt QIAGEN:s ISO-certifierade kvalitetshanteringssystem.

Begränsningar

Systemets prestanda har fastställts med användning av plasma- och serumprover för isolering av virala nukleinsyror.











Det är användarnas ansvar att validera systemets prestanda för eventuella procedurer som används i deras laboratorium och inte ingår i QIAGEN:s prestandastudier.





För att minimera risken för negativ påverkan på diagnostiska resultat bör lämpliga kontroller för nedströmstillämpningar användas. För ytterligare validering rekommenderas riktlinjerna enligt International Conference on Harmonization of Technical Requirements (ICH) i *ICH Q2(R1) Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology*.

Eventuella diagnostiska resultat som erhålls måste tolkas tillsammans med övriga kliniska fynd eller laboratoriefynd.

Symboler

Nedanstående symboler kan finnas i användningsinstruktionerna eller på förpackningar och etiketter:

Symbol	Symbolförklaring
	Innehåller reagens som räcker till <N> reaktioner
	Läs bruksanvisningen innan användning
	Utgångsdatum
	In vitro-diagnostisk medicinsk produkt
	Katalognummer
	Viktig anmärkning
	Partinummer
	Materialnummer (dvs. komponentetikett)
	Komponenter
	Volym
	Temperaturbegränsning
	Tillverkare
	Vid ankomst

Symbol	Symbolförklaring
	Öppna vid leverans. Förvara QIAamp MinElute Columns vid 2–8 °C
	Skriv ner aktuellt datum efter tillsats av etanol i flaskan
ADD	Tillsätta
CONT	Innehåller
LYOPH	Frystorkad
RCNS	Rekonstituera
EtOH	Etanol
GuHCl	Guanidinhydroklorid
MALEIC ACID	Maleinsyra
SUBT	Subtilisin
GTIN	GS1-artikelnummer
→	Leder till
NUM	Antal
Rn	R betyder revidering av bruksanvisningen och n är revisionsnumret
	Utsätt inte för direkt solljus
	Varning/försiktighet

Kontaktinformation

För teknisk support och ytterligare information är du välkommen att besöka vårt tekniska supportcenter på **www.qiagen.com/Support** (gå till www.qiagen.com för att få kontaktinformation).

Bilaga

Arbeta med RNA

Ribonukleaser (RNaser) är mycket motståndskraftiga och aktiva enzymer, som normalt inte behöver kofaktorer för att fungera. RNaser är svåra att inaktivera och endast en liten mängd räcker för att bryta ner RNA. Därför skall inga laboratoriematerial av glas eller plast användas, där RNase-kontaminationer inte eliminerats först. Var noga med att se till att inga RNase-kontaminationer kan tillkomma på RNA-proven under eller efter isoleringsförfarandet. För att skapa och upprätthålla en RNase-fri omgivning bör följande försiktighetsåtgärder följas vid förbehandling och bruk av engångs- och flergångsbehållare och lösningar när du arbetar med RNA.

Allmän hantering

Arbetet med RNA skall alltid följa korrekta principer för mikrobiologiska och aseptiska arbetstekniker. Händer och dammpartiklar kan bära på bakterier och mögelsvampar, vilket är de vanligaste orsakerna till RNase-kontamination. För att undvika RNase-kontamination via huden eller genom dammiga laboratorieinstrument, bör du därför alltid bära latex- eller vinylhandskar vid hantering av reagenser eller RNA-prover. Byt laboratoriehandskarna ofta och håll provrören stängda.

Plastartiklar som inte är avsedda för engångsbruk

Plastartiklar som inte är avsedda för engångsbruk ska behandlas före användningen för att säkerställa att de är fria från RNase. Plastartiklar ska sköljas noga med 0,1 M NaOH, * 1 mM EDTA* följt av RNase-fritt vatten* (se Lösningar på sida 35). Alternativt kan kloroformtåliga plastartiklar sköljas med kloroform* för att inaktivera RNase.

* Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (Safety Data Sheets, SDS) som kan erhållas av respektive tillverkare.

Glasartiklar

Glasartiklar ska behandlas före användningen för att säkerställa att de är RNase-fria. Glasartiklar som ska användas för RNA-arbete ska rengöras med rengöringsmedel, sköljas noga och ugsbakas i > 240 °C i minst fyra timmar (över natten, om det är mer bekvämt) före användningen. Enbart autoklavering kommer inte helt att inaktivera många RNaser. Ugsbakning inaktiverar både ribonukleaser och säkerställer att inga andra nukleinsyror (exempelvis plasmid-DNA) finns kvar på glasytan. Alternativt kan glaset behandlas med DEPC* (dietylpyrokarbonat). Täck över glaset med 0,1 % DEPC i vatten över natten (12 timmar) vid 37 °C, och autoklavera sedan eller värm till 100 °C i 15 minuter för att avlägsna alla rester av DEPC.



Corex®-rör ska göras RNase-fria genom behandling med DEPC och inte genom ugsbakning. Detta minskar felfrekvensen för denna typ av rör under centrifugeringen.

Elektroferestankar

Elektroferestankar ska rengöras med rengöringslösning (t.ex. 0,5 % SDS), * sköljas med vatten, torkas med etanol,*† och därefter fyllas med en lösning av 3 % väteperoxid.* Efter 10 minuter i rumstemperatur ska elektroferestankarna sköljas noga med RNase-fritt vatten.

Lösningar

Lösningar (vatten och andra lösningar) ska behandlas med 0,1 % DEPC. DEPC reagerar med primäraminerna och kan inte användas direkt för att behandla Tris-buffertar. DEPC är mycket instabilt i närvaro av Tris-buffert och bryts snabbt ned till etanol och CO₂. Vid preparering av Tris-buffertar ska vattnet först behandlas med DEPC, och därefter ska Tris lösas upp för att bilda lämplig buffert.

* Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (Safety Data Sheets, SDS) som kan erhållas av respektive tillverkare.

† Innehåller natriumazid som konserveringsmedel.

DEPC är en stark, men inte en absolut, hämmare av RNaser. Det används ofta vid en koncentration av 0,1 % för att inaktivera RNaser på glas eller plast, eller för att bilda RNase-fria lösningar och vatten. DEPC inaktiverar RNaser genom kovalent modifiering. Spårbara mängder DEPC modifiera purina rester i RNA genom karboxylering. Karboxylerat RNA förflyttas med mycket låg effektivitet i cellfria system. Dess förmåga att bilda DNA:RNA- eller RNA:RNA-hybrider påverkas emellertid inte allvarligt, såvida inte en stor fraktion av purina rester har modifierats. Rester av DEPC måste alltid avlägsnas från lösningar och kärl genom autoklavering eller uppvärmning till $100\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 15 minuter ± 1 minut.

Tillsätt 0,1 ml DEPC till 100 ml av den lösning som ska behandlas och skaka kraftigt för att blanda DEPC i lösningen eller låt lösningen inkubera i >12 timmar vid $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$. Autoklavera i 15 ± 1 minut för att avlägsna alla spår av DEPC. Det kan vara önskvärt att testa vattenkällorna för närvaro av kontaminerande RNaser, eftersom många källor till destillerat vatten är fria från RNase-aktivitet.



Buffertarna i QIAamp DSP Virus Spin Kit behandlas inte med DEPC för att bli RNase-fria, och är därför fria från DEPC-kontamination.

Beställningsinformation

Produkt	Innehåll	Kat.nr
QIAamp DSP Virus Spin Kit (50)	För 50 beredningar: QIAamp Mini Spin Columns, buffertar, reagenser, rör, VacConnectors	61704
Relaterade produkter		
QIAcube Connect MDx*	Instrument och ett års garanti på artiklar och arbete	9003070
Tillbehör		
Rotor Adapters	För 240 beredningar: 240 rotoradapterar för engångsbruk och 240 elueringsrör (1,5 ml) för användning med QIAcube	990394
Rotor Adapter Holder	Hållare för 12 engångsrotoradapterar; för användning med QIAcube	990392
Sample Tubes CB	1000 konformade rör med skruvlock utan bred bas (2 ml) för användning med QIAcube och QIAcube Connect	990382
Shaker Rack Plugs	För laddning av QIAcube skakapparatställ	9017854
Reagent Bottles, 30 ml	Reagensflaskor (30 ml) med lock; 6-pack; för användning med QIAcube	990393
Filter-Tips, 1000 µl	Filterspetsar för engångsbruk, i ställ (8 x 128). För användning med QIAcube	990352

Produkt	Innehåll	Kat.nr
Filter-Tips, 1000 µl, wide-bore	Filterspetsar för engångsbruk, bred cylinder, i ställ (8 x 128) krävs inte för alla protokoll. För användning med QIAcube	990452
Filter-Tips, 200 µl	Filterspetsar för engångsbruk, i ställ (8 x 128). För användning med instrumenten QIAcube och QIASymphony SP/AS	990332

* QIAcube Connect MDx finns inte tillgänglig i alla länder. Kontakta QIAGEN teknisk service för ytterligare information.

Uppdaterad licensinformation och produktspecifika friskrivningsklausuler finns i respektive QIAGEN-kithandbok eller bruksanvisningen. Handböcker och bruksanvisningar till QIAGEN-kit finns på www.qiagen.com eller kan beställas från QIAGEN teknisk service eller din lokala återförsäljare.

Dokumentrevisioner

Revision	Beskrivning
R7, 01/2021	<p>Uppdaterade följande avsnitt: "Automatisk rening av virala nukleinsyror i QIAcube eller QIAcube Connect MDx", "Material som behövs men inte medföljer", "Varningar och försiktighetsåtgärder", "Protokoll: Avsnitten "Rening av virala nukleinsyror från plasma eller serum med en mikrocentrifug eller QIAcube/QIAcube Connect MDx", "Symboler" och "Beställningsinformation".</p> <p>Tog bort avsnitten "Prestandaegenskaper" och "Referenser".</p> <p>Infogade en ny figur (bild av QIAcube Connect MDx).</p> <p>Lade till referenser till QIAcube Connect Mdx och dess tillbehör.</p> <p>Redaktionella ändringar och layoutändringar.</p>

Begränsat licensavtal för QIAamp DSP Virus Spin Kit

Användning av den här produkten innebär att köpare eller användare av produkten godkänner följande villkor:

1. Produkten får endast användas i enlighet med de protokoll som medföljer produkten och den här handboken och får endast användas med komponenterna som ingår i panelen. QIAGEN ger ingen licens för någon av sina immateriella tillgångar för att använda eller inkludera komponenterna i denna panel med komponenter som inte ingår i denna panel förutom vad som beskrivs i de protokoll som medföljer produkten, den här handboken och ytterligare protokoll som finns på www.qiagen.com. Vissa av de här ytterligare protokollen har tillhandahållits av QIAGEN-användare för andra QIAGEN-användare. De här protokollen har inte testats noggrant eller optimerats av QIAGEN. QIAGEN garanterar inte att de inte kränker tredje parts rättigheter.
2. Förutom de uttryckligen angivna licenserna kan QIAGEN inte garantera att denna panel och/eller dess användning inte kränker tredje parts rättigheter.
3. Panelen och dess komponenter är licensierade för engångsbruk och får inte återanvändas, förbättras eller säljas vidare.
4. QIAGEN avsäger sig specifikt ansvar för alla andra licenser, uttryckliga eller underförstådda, förutom de uttryckligen angivna.
5. Köparen och användaren av panelen godkänner att inte tillåta någon annan att utföra något som kan leda till eller orsaka otillåtna situationer beskrivna ovan. QIAGEN kan kräva att detta avtal om begränsad licens upprätthålls i domstol, och ska ersättas för alla undersöknings- och rättegångskostnader, inklusive advokatkostnader, som uppstår vid försök att bestrida detta avtal om begränsad licens eller någon av de immateriella rättigheter som avser panelen och/eller någon av dess komponenter.

För uppdaterade licensvillkor, se www.qiagen.com.

Varumärken: QIAGEN®, QIAamp®, QIAcube®, MinElute® (QIAGEN Group); Corex® (Corning, Inc.); Sarstedt® (Sarstedt AG & Co.). Registrerade namn, varumärken med mera som används i det här dokumentet ska inte anses som oskyddade enligt lag, även om de inte uttryckligen anges som skyddade.

01/ 2021 HB-0417-007 1 122785 © 2021 QIAGEN, med ensamrätt.

Beställning www.qiagen.com/shop | Teknisk support support.qiagen.com | Webbplats www.qiagen.com