

Gebruiksaanwijzing (handleiding) QIAamp[®] DSP DNA Blood Mini Kit



Versie 3



Voor in-vitrodiagnostisch gebruik

Voor gebruik in combinatie met QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit



61104



QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, DUITSLAND



1127543NL

Inhoud

Beoogd gebruik.....	4
Beoogde gebruiker	4
Beschrijving en principe	5
Bloedcellen lyseren.....	5
Genomisch DNA aan het membraan van de QIAamp Mini-spinkolom binden	5
Achtergebleven verontreinigingen verwijderen.....	6
Zuiver genomisch DNA elueren.....	6
Opbrengst en kwaliteit van genomisch DNA	7
Geautomatiseerde zuivering met QIAcube Connect MDx.....	7
Samenvatting en uitleg.....	10
Meegeleverde materialen	11
Inhoud van de kit	11
Bestanddelen van de kit	12
Benodigde, maar niet-meegeleverde materialen	13
Aanvullende reagentia	13
Verbruiksartikelen.....	13
Apparatuur.....	13
Alleen voor de vacuümprocedure	13
Alleen voor de geautomatiseerde procedure.....	14
Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen	15
Veiligheidsinformatie	15
Voorzorgsmaatregelen.....	16

Afvoer.....	17
Opslag en verwerking van reagentia	18
Stabiliteit tijdens gebruik	18
Afnemen, bewaren en verwerken van specimens.....	19
Belangrijke opmerkingen	21
Belangrijke punten voordat u start met een protocol.....	21
Reagentia en buffers bereiden	22
Werken met QIAamp Mini-spinkolommen	23
Het QIAvac 24 Plus-vacuümsysteem configureren	24
Procedure	26
Protocol: Isolatie en zuivering van genomisch DNA uit bloedmonsters met behulp van een microcentrifuge/geautomatiseerde zuivering met de QIAcube Connect MDx.....	26
Protocol: isolatie en zuivering van genomisch DNA uit bloedmonsters met behulp van een vacuümsysteem	30
Kwaliteitscontrole.....	34
Beperkingen.....	35
Prestatiekenmerken	36
Problemen oplossen	37
Symbolen	41
Bestelgegevens.....	44
Revisiegeschiedenis van document.....	46

Beoogd gebruik

De QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit is een systeem voor isolatie en zuivering van genomisch DNA uit biologische monsters met behulp van silicamembraantechnologie (QIAamp-technologie).

De QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit is bedoeld voor in-vitrodiagnostiek.

Beoogde gebruiker

Het product is bedoeld voor toepassing door beroepsmatige gebruikers, bijvoorbeeld analisten en artsen die zijn opgeleid in moleculair-biologische technieken.

Beschrijving en principe

Elke QIAamp DSP DNA Blood Mini-procedure bestaat uit 4 stappen:

- de cellen in het bloedmonster lyseren;
- het genomisch DNA in het cellysaat aan het membraan van een QIAamp Mini-spinkolom binden;
- het membraan wassen;
- het genomisch DNA uit het membraan elueren.

Deze handleiding bevat protocollen voor twee alternatieve QIAamp DSP DNA Blood Mini-procedures: de centrifugeerprocedure, waar een centrifuge voor nodig is of kan worden geautomatiseerd met de QIAcube® Connect MDx (afbeelding 1), en de vacuümprocedure, waar een centrifuge en een vacuümsysteem voor nodig is (zie het stroomschema op pagina 9).

Bloedcellen lyseren

De monsters worden bij verhoogde temperaturen gelyseerd onder denaturerende omstandigheden. Lysering wordt uitgevoerd in de aanwezigheid van QIAGEN® Protease (QP) en lysisbuffer (AL).

Genomisch DNA aan het membraan van de QIAamp Mini-spinkolom binden

Voor een optimale binding van genomisch DNA aan het membraan van de QIAamp Mini-spinkolom wordt eerst ethanol toegevoegd aan de lysaten. Daarna wordt elk lysaat aangebracht op een QIAamp Mini-spinkolom en wordt het door vacuümdruk of centrifugale kracht door het silicamembraan geperst, waardoor genomisch DNA wordt geadsorbeerd.

Achtergebleven verontreinigingen verwijderen

Terwijl genomisch DNA gebonden blijft aan het membraan van de QIAamp Mini-spinkolom, worden verontreinigingen doeltreffend weggespoeld met wasbuffer 1 (AW1) en daarna met wasbuffer 2 (AW2).

Zuiver genomisch DNA elueren

Genomisch DNA wordt geëluëerd van het membraan van de QIAamp Mini-spinkolom met 50-200 µl elutiebuffer (AE). Het geëluëerde DNA kan direct worden gebruikt voor verschillende vervolgassays, waaronder diverse vervolgassays voor in-vitrodiagnostiek. Elutiebuffer (AE) moet voordat deze wordt aangebracht op de kolom op kamertemperatuur (15-25 °C) zijn gekomen.

Vanwege de resterende elutiebuffer die na centrifugeren door het membraan van de spinkolom wordt vastgehouden, kan het verkregen volume van het eluaat lager zijn dan het volume van de elutiebuffer (AE) dat op de kolom wordt aangebracht. Het verkregen volume van het eluaat is afhankelijk van de aard van het monster. Geëluëerd DNA wordt verzameld in elutiebusjes (ET) en kan maximaal 4 weken worden opgeslagen bij 2 tot 8 °C. Voor langdurige opslag adviseren wij om ze te bewaren bij -20°C.

Opmerking: de stabiliteit van eluaat is sterk afhankelijk van verschillende factoren, en houdt verband met de specifieke latere toepassing. Deze is voor de QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit vastgesteld in combinatie met typische latere toepassingen. Het is de verantwoordelijkheid van de gebruiker om de gebruiksaanwijzing voor de specifieke latere toepassing die in het laboratorium wordt gebruikt te raadplegen en/of de gehele workflow te valideren om de juiste opslagomstandigheden te bepalen.

Opbrengst en kwaliteit van genomisch DNA

De DNA-opbrengst is afhankelijk van het monster en de kwaliteit van het uitgangsmateriaal. Door elutie in kleinere volumes stijgt de uiteindelijke DNA-concentratie in het eluaat, maar daalt de algehele DNA-opbrengst iets. Wij adviseren om een elutievolume te gebruiken dat geschikt is voor de beoogde vervolgtoeepassing.

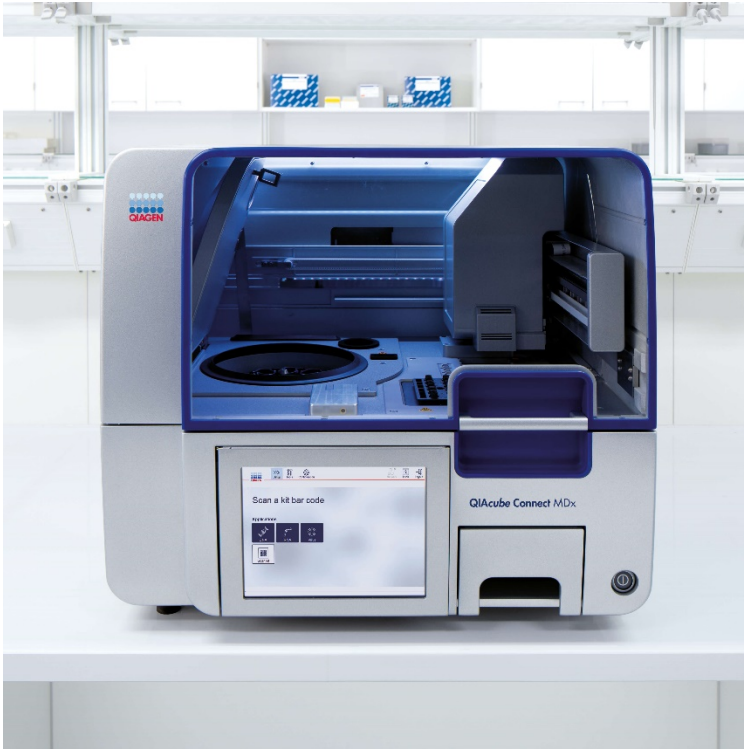
De opbrengst en kwaliteit van geïsoleerd, genomisch DNA zijn geschikt voor vervolgdetectieprocedures in moleculaire diagnostiek zoals PCR. Diagnostische assays moeten worden uitgevoerd in overeenstemming met de aanwijzingen van de fabrikant.

Geautomatiseerde zuivering met QIAcube Connect MDx

De QIAcube Connect MDx voert geautomatiseerde isolatie en zuivering van nucleïnezuren uit. Er kunnen tot wel 12 monsters per run worden verwerkt.

Bij monsterbereiding met de QIAcube Connect MDx worden dezelfde stappen gevolgd als bij de handmatige procedure (d.w.z. lyseren, binden, wassen en elueren), zodat u verder kunt gaan met het zuiveren van hoogwaardig DNA met de QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit.

Wanneer u de QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit geautomatiseerd verwerkt met de QIAcube Connect MDx, verwerkt het instrument mogelijk minder dan 50 monsters. Dit wordt veroorzaakt door dode volumes, verdamping en extra verbruik van reagentia door geautomatiseerd pipetteren. QIAGEN garandeert een verwerking van 50 monsters alleen bij handmatig gebruik van de QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit.



Afbeelding 1. De QIAcube Connect MDx.

De QIAamp DSP DNA Blood Mini-centrifugeer- en vacuümprocedures

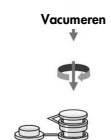
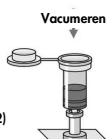
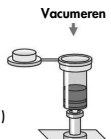
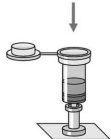
Centrifugeerpro- cedure QIAamp

Monster



Vacuümprocedure QIAamp

Monster



Lyseren

Binden

Vacumeren

Wassen
(Buffer AW1)

Vacumeren

Wassen
(Buffer AW2)

Vacumeren

Elueren

Lees de protocollen (pagina 26 en 30) zorgvuldig door voordat u begint.

Overbrengen naar LT, 20 µl QP, 200 µl monstermateriaal en 200 µl AL toevoegen.
15 sec. vortexen.
Incuberen gedurende 10 min. bij 56 °C.
200 µl ethanol toevoegen.
15 sec. vortexen.

Lysaat overbrengen naar QIAamp Mini-spin kolom.
Centrifugeerprocedure: 1 min centrifugeren met 6000 x g.

Vacuümprocedure: Vacuüm toepassen.

Centrifugeerprocedure: QIAamp Mini-spin kolom in nieuwe WT plaatsen, 500 µl AW1 toevoegen en 1 min centrifugeren met 6000 x g.

Vacuümprocedure: 750 µl AW1 toevoegen en vacuüm toepassen.

Centrifugeerprocedure: QIAamp Mini-spin kolom in nieuwe WT plaatsen, 500 µl AW2 toevoegen en 1 min centrifugeren op volle snelheid (ongeveer 20.000 x g of 14.000 tpm).

Vacuümprocedure: 750 µl AW2 toevoegen en vacuüm toepassen.

QIAamp Mini-spin kolom in WT plaatsen.

3 min centrifugeren op volle snelheid (ongeveer 20.000 x g of 14.000 tpm).

QIAamp Mini-spin kolom in ET plaatsen.

50-200 µl AE toevoegen en 1 min incuberen.

1 min centrifugeren met 6000 x g.

Samenvatting en uitleg

De QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit maakt gebruik van gerenommeerde technologie om genomisch DNA snel en eenvoudig uit 200 µl volbloed te isoleren en te zuiveren.

De procedures voor de QIAamp DSP DNA Blood Mini zijn geschikt voor het gelijktijdig verwerken van meerdere bloedmonsters en resulteren in gezuiverd DNA dat klaar is voor gebruik. De procedures kunnen worden toegepast bij vers of bevroren volbloed en bloed dat is behandeld met citraat of EDTA.

Het is niet nodig om vooraf leukocyten te scheiden. Voor de procedures is geen extractie van fenol/chloroform of alcoholprecipitatie nodig en hoeft u weinig handelingen uit te voeren, waardoor u veilig kunt werken met mogelijk besmettelijke monsters. Daarbij zijn de procedures gericht op het minimaliseren van kruisbesmetting tussen monsters. Het gezuiverde DNA kan direct worden gebruikt voor PCR of andere toepassingen, maar kan ook worden bewaard bij -20 °C voor langdurige opslag.

De eenvoudige centrifugeer- en vacuümprocedures van QIAamp DSP zijn geschikt om meerdere monsters gelijktijdig te verwerken. Een aantal van de QIAamp-centrifugeerprocedures kunnen volledig geautomatiseerd worden uitgevoerd met de QIAcube Connect MDx, zodat u meer gestandaardiseerd en nog gebruiksvriendelijker kunt werken (pagina 7).

Voor de vacuümprocedure zijn voor het protocol een vacuümverdeelstuk (zoals de QIAvac 24 Plus met het QIAvac Connecting System) en een vacuümpomp waarmee een vacuüm van ~800-900 mbar kan worden voortgebracht (zoals QIAGEN Vacuum Pump) nodig. Er moet een Vacuum Regulator worden gebruikt (onderdeel van het QIAvac Connecting System) voor eenvoudige bewaking van de vacuümdruk en handige opheffing van het vacuüm.

Meegeleverde materialen

Inhoud van de kit


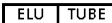

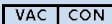
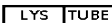








QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit

Catalogusnr.

61104

Aantal preparaten

50

	Identiteit	Symbolen	Aantal
5	QIAamp Mini Spin Columns with Wash Tubes (WT) (QIAamp Mini Spin Columns met wasbuisjes) (2 ml)		50
ET	Elution Tubes (Elutiebusjes) (1,5 ml)	 	50
VC	VacConnectors		50
LT	Lysis Tubes (Lysisbusjes) (1,5 ml)		50
WT	Wash Tubes (Wasbusjes) (2 ml)		3 x 50
AL	Lysis Buffer (Lysisbuffer)*		12 ml
AW1	Wash Buffer 1 (Wasbuffer 1) [†] (concentraat)		19 ml
AW2	Wash Buffer 2 (Wasbuffer 2) [†] (concentraat)		13 ml
AE	Elution Buffer (Elutiebuffer) [‡]		25 ml
PS	Protease Solvent (Proteaseoplosmiddel) [‡]		2 ml
QP	QIAGEN Protease (QIAGEN-protease) [§]		1 buisje
-	Gebruiksaanwijzing (Handleiding)		1

* Wanneer u de QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit geautomatiseerd verwerkt met de QIAcube Connect MDx, verwerkt het instrument mogelijk minder dan 50 monsters. Dit wordt veroorzaakt door dode volumes, verdamping en extra verbruik van reagentia door geautomatiseerd pipetteren. QIAGEN garandeert een verwerking van 50 monsters alleen bij handmatig gebruik van de QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit.

[†] Bevat guanidinehydrochloride. Niet geschikt voor gebruik met bleekhoudende desinfectiemiddelen. Zie Veiligheidsinformatie op pagina 15 voor meer informatie.

[‡] Bevat natriumazide als conserveermiddel.

[§] Resuspensievolume 1,2 ml. Zie 'Reagentia en buffers bereiden' op pagina 22.

Bestanddelen van de kit

De belangrijkste componenten van de kit die actieve bestanddelen bevatten worden hieronder besproken.

Reagens	Actieve bestanddelen	Concentratie (w/w) [%]
QIAGEN Protease	Subtilisine	≥ 0 tot ≤ 100
AL	Guanidinehydrochloride	≥ 30 tot < 50
	Maleïnezuur	$\geq 0,1$ tot < 1
AW1	Guanidinehydrochloride	≥ 50 tot < 70

Benodigde, maar niet-meegeleverde materialen

Aanvullende reagentia

- Ethanol (96-100%) *

Verbruiksartikelen

- Pipetten[†] en pipetpuntjes (om kruisbesmetting te voorkomen, adviseren wij dringend om pipetpuntjes met aerosolfilter te gebruiken)
- Wegwerphandschoenen

Apparatuur

- Verwarmblok[†] voor het lyseren van monsters bij 56 °C (voor microtestbuisjes van 1,5 ml)
- Microcentrifuge[†]
- Meetcilinder (50 ml)
- Vortexer

Alleen voor de vacuümprocedure

- QIAvac 24 Plus-vacuümsysteem (cat.nr. 19413) of equivalent[†]
- VacValves (cat.nr. 19408)
- QIAvac Connecting System (cat.nr. 19419)
- Vacuum Pump (cat.nr. 84020)
- Vacuum Regulator (cat.nr. 19530)

* Gebruik geen gedenatureerde alcohol, aangezien daarin andere stoffen aanwezig zijn zoals methanol of methylethylketon.

[†] Om te zorgen voor een goede verwerking van monsters tijdens de procedures met de QIAamp DSP DNA Blood Mini raden wij ten eerste aan alle instrumenten (d.w.z. pipetten en verwarmblokken) te controleren en te kalibreren volgens de aanbevelingen van de betreffende fabrikant.

Alleen voor de geautomatiseerde procedure

- QIAcube Connect MDx (cat.nr. 9003070) *
- Rotor Adapters (cat.nr. 990394)
- Rotor Adapter Holder (cat.nr. 990392)
- Sample Tubes CB (cat.nr. 990382; monsterinvoerbus)
- Shaker Rack Plugs (cat.nr. 9017854)
- Reagent Bottles, 30 ml (cat.nr. 990393)
- Filter Tips, 1000 µl (cat. no. 990352)
- Filter Tips, 200 µl (cat. no. 990332)
- SafeSeal Tube, 1,5 ml (Sarstedt®, cat. no. 72.706)

* Om te zorgen voor een goede verwerking van monsters tijdens de procedures met de QIAamp DSP DNA Blood Mini raden wij ten zeerste aan alle instrumenten (d.w.z. pipetten en verwarmblokken) te controleren en te kalibreren volgens de aanbevelingen van de betreffende fabrikant.

Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen


Onthoud dat u volgens de plaatselijke voorschriften verplicht kunt zijn om ernstige incidenten die hebben plaatsgevonden in verband met gebruik van het hulpmiddel te melden bij de fabrikant en/of diens geautoriseerde vertegenwoordiger en de regelgevende instantie van de locatie waar de gebruiker en/of de patiënt zich bevindt.

Voor in-vitrodiagnostisch gebruik.

Lees alle instructies zorgvuldig door voordat u de kit gebruikt.

Veiligheidsinformatie

Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg voor meer informatie de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen (VIB's). Deze zijn online beschikbaar in handig en compact pdf-formaat op www.qiagen.com/safety, waar u de veiligheidsinformatiebladen voor elke QIAGEN-kit en kitcomponent kunt vinden, bekijken en afdrukken.

<p>VOORZICHTIG</p> 	<p>Voeg GEEN bleekmiddel of zuuroplossingen rechtstreeks toe aan het afval van monsterbereiding.</p>
---	---

- Lysisbuffer (AL) en wasbuffer 1 (AW1) bevatten guanidinehydrochloride, dat sterk reactieve verbindingen kan vormen met bleekwater. Als u een vloeistof hebt gemorst die deze buffer bevat, moet die worden opgenomen met een geschikt laboratoriumreinigingsmiddel en water. Reinig de verontreinigde plek eerst met laboratoriumreinigingsmiddel en water en vervolgens met 1% (v/v) natriumhypochloriet als de gemorste vloeistof mogelijk infectieuze stoffen bevat. Draag handschoenen en een veiligheidsbril wanneer u beschadigde of lekkende bufferflessen weggooit om persoonlijk letsel of letsel aan anderen te voorkomen.

- QIAGEN heeft het vloeibare afval dat vrijkomt bij de procedures met de QIAamp DSP DNA Blood Mini niet getest op achtergebleven besmettelijke materialen. Besmetting van het vloeibare afval met achtergebleven besmettelijke materialen is onwaarschijnlijk, maar kan niet volledig worden uitgesloten. Behandel vloeibaar afval daarom als besmettelijk en handel bij het verwerken en afvoeren ervan in overeenstemming met de plaatselijke veiligheidsvoorschriften.
- Specimens en monsters kunnen besmettelijk zijn. Gooi afval van het monster en de assay weg conform uw lokale veiligheidsprocedures.

Informatie voor noodgevallen

CHEMTREC

VS & Canada 1-800-424-9300

Buiten de VS en Canada +1 703-527-3887

Voorzorgsmaatregelen

De volgende risico- en veiligheidszinnen zijn van toepassing op onderdelen van de QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit.

Buffer AL



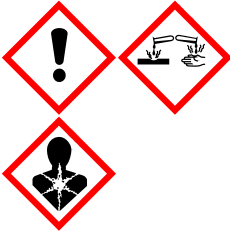
Bevat: guanidinehydrochloride en maleïnezuur. Waarschuwing! Kan schadelijk zijn bij inslikken en bij inademing. Veroorzaakt huidirritatie. Kan een allergische huidreactie veroorzaken. Veroorzaakt ernstige oogirritatie. Draag beschermende handschoenen/beschermende kleding/oogbescherming/gezichtsbescherming. Neem onmiddellijk contact op met een GIFCENTRUM of een arts wanneer u zich onwel voelt. Bij huidirritatie of uitslag: een arts raadplegen. Trek verontreinigde kleding uit en was deze voordat u deze opnieuw gebruikt. Voer de inhoud/container af naar een erkende stortlocatie.

Buffer AW1



Bevat: guanidinehydrochloride. Waarschuwing! Schadelijk bij inslikken en bij inademing. Veroorzaakt huidirritatie. Veroorzaakt ernstige oogirritatie. Draag beschermende handschoenen/beschermende kleding/oogbescherming/gezichtsbescherming. Trek verontreinigde kleding uit en was deze voordat u deze opnieuw gebruikt. Voer de inhoud/container af naar een erkende stortlocatie.

QIAGEN Protease



Bevat: subtilisine. Gevaar! Schadelijk bij opname door de mond. Veroorzaakt huidirritatie. Veroorzaakt ernstige oogschade. Kan bij inademing allergie- of astmasymptomen of ademhalingsmoeilijkheden veroorzaken. Kan irritatie aan de luchtwegen veroorzaken. Vermijd het inademen van stof/rook/gas/damp/nevel/spray. Draag beschermende handschoenen/beschermende kleding/oogbescherming/gezichtsbescherming. Draag ademhalingsbescherming. BIJ CONTACT MET DE OGEN: Voorzichtig spoelen met water gedurende een aantal minuten. Contactlenzen verwijderen, indien mogelijk. Blijven spoelen. NA (mogelijke) blootstelling: Neem onmiddellijk contact op met een GIFCENTRUM of arts. Breng de persoon in de frisse lucht, in een houding die het ademen vergemakkelijkt.

Afvoer

Het afval bevat monsters en reagentia. Dit afval kan giftig of infectieus materiaal bevatten en moet correcte wijze worden verwijderd. Raadpleeg uw lokale veiligheidsvoorschriften voor de juiste verwijderingsprocedures.

Raadpleeg voor meer informatie de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen (VIB's). Deze zijn online beschikbaar in pdf-formaat via www.qiagen.com/safety. Hier vindt u de VIB's van alle kits en kit-componenten van QIAGEN, die u kunt bekijken en afdrucken.

Opslag en verwerking van reagentia

Let op de vervaldatum en opslagcondities die op de verpakking en etiketten van alle componenten staan vermeld. Gebruik geen componenten na de uiterste gebruiksdatum of die op een verkeerde manier zijn bewaard.

De QIAamp Mini-spinkolommen moeten na aankomst worden bewaard bij 2-8 °C en kunnen worden gebruikt tot de houdbaarheidsdatum die op de verpakking van de kit staat vermeld.

Opmerking: om ervoor te zorgen dat de onderdelen van de kit uit verschillende kits niet door elkaar worden gebruikt, dient u de QIAamp Mini-spinkolommen te labelen met het desbetreffende partijnummer van de kit.

Alle buffers kunnen tot de houdbaarheidsdatum van de kit worden bewaard bij kamertemperatuur (15-25 °C).

Gelyofiliseerd QIAGEN Protease (QP) kan tot de houdbaarheidsdatum van de kit worden bewaard bij kamertemperatuur (15-25 °C) zonder aan werking te verliezen.

Stabiliteit tijdens gebruik

Gereconstitueerd QIAGEN Protease (QP) is maximaal 1 jaar of tot de houdbaarheidsdatum van de kit stabiel als het wordt bewaard bij 2-8 °C. Bewaar de voorraad QIAGEN Protease (QP)-oplossing niet langdurig bij kamertemperatuur.

Gereconstitueerde wasbuffer 1 (AW1) en gereconstitueerde wasbuffer 2 (AW2) zijn maximaal 1 jaar of tot de houdbaarheidsdatum van de kit stabiel als ze worden bewaard bij kamertemperatuur (15-25 °C).

Volg voor het voorbereiden van de buffers voor de geautomatiseerde procedure de instructies in de *Gebruikershandleiding van de QIAcube Connect MDx* (die te vinden is onder het tabblad 'Resources' (Hulpmiddelen) van de productpagina op www.qiagen.com).

Afnemen, bewaren en verwerken van specimens

Opmerking: de stabiliteit van monsters is sterk afhankelijk van verschillende factoren, en houdt verband met de specifieke latere toepassing. Deze is beoordeeld met behulp van typische latere toepassingen. Het is de verantwoordelijkheid van de gebruiker om de gebruiksaanwijzing voor de specifieke latere toepassing die in het laboratorium wordt gebruikt te raadplegen en/of de gehele workflow te valideren om de juiste opslagomstandigheden te bepalen.

Raadpleeg voor algemene aanbevelingen omtrent afname, transport en opslag de goedgekeurde CLSI-richtlijn MM13-A "Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods" (Afname, transport, voorbereiding en opslag van specimens voor moleculaire methoden). Bovendien moeten de instructies van de fabrikant voor het geselecteerde monsterafnamehulpmiddel worden gevolgd tijdens de voorbereiding, opslag, transport en algemene hantering van monsters. Onafhankelijk van de instructies van de fabrikant van het bloedafnamebuisje moet rekening worden gehouden met ISO 20186-2:2019 (E) voor extractie van genomisch DNA uit veneus volbloed.

Opmerking: volgens ISO 20186-2:2019(E) kan heparine uit bloedafnamebuisjes invloed hebben op de zuiverheid van de geïsoleerde nucleïnezuuren en mogelijke carry-over naar eluaten kan remmingen veroorzaken in bepaalde latere toepassingen. Daarom raden we aan bloedmonsters te gebruiken die zijn behandeld met EDTA of citraat als antistollingsmiddel.

Meng de bloedmonsters grondig indien er verse bloedmonsters in primaire buizen worden gebruikt (bijv. door de buizen een aantal keer om te draaien) alvorens deze over te brengen. Bevroren monsters (met een maximum van 3 vries-dooicycli) moeten snel worden ontdooid in een waterbad van 37 °C onder zacht schudden om voor een goede menging te zorgen. Laat de monsters vervolgens op kamertemperatuur komen (15-25 °C) voordat de procedure wordt gestart. Gebruik geen bloedmonsters die meer dan drie keer zijn bevroren en ontdooid. Om betrouwbare overbrenging van het monster te verzekeren, dient u schuimvorming in de monsterbuizen te vermijden. Probeer bloedstolsels in de monsters te voorkomen en breng de monsters zonder bloedstolsels over. Het membraan van de QIAamp Mini-spinkolom kan verstopt raken of de geautomatiseerde procedure met de QIAcube Connect MDx kan worden belemmerd door cryoprecipitaten die worden gevormd tijdens het ontdooien van bevroren monsters. Vermijd aspiratie van cryoprecipitaten, indien aanwezig.

De opbrengst en kwaliteit van het gezuiverde DNA zijn afhankelijk van de opslagcondities van het bloed. Versere bloedmonsters kunnen betere resultaten opleveren. We adviseren opslag bij 2-8 °C voor kortdurende opslag van maximaal 10 dagen. Voor toepassingen waarbij maximale fragmentgrootte benodigd is, zoals Southern blotting, wordt echter opslag van maximaal 3 dagen bij 2-8 °C aangeraden, omdat er na deze tijd een kleine hoeveelheid DNA-degradatie optreedt. Verzamel bloed voor langdurige opslag (meer dan 10 dagen) in buizen die een standaard antistollingsmiddel bevatten (bij voorkeur EDTA, indien DNA met hoog molecuulgewicht nodig is) en bewaar bij -20 °C of -80 °C.

Belangrijke opmerkingen

Belangrijke punten voordat u start met een protocol

- Controleer na ontvangst van de kit of de onderdelen van de kit niet zijn beschadigd. Neem contact op met de technische dienst van QIAGEN of uw plaatselijke leverancier als de blisterverpakkingen of flesjes met buffer zijn beschadigd. Raadpleeg in geval van gemorste vloeistof 'Veiligheidsinformatie' (pagina 15). Gebruik geen onderdelen van de kit die zijn beschadigd, omdat dit kan leiden tot een verminderde werking van de kit.
- Gebruik iedere keer na het overbrengen van vloeistof een nieuwe pipetpunt. Om het risico op kruisbesmetting te minimaliseren, adviseren wij om gebruik te maken van pipettips met aerosolfilter.
- Draag altijd wegwerphandschoenen tijdens de gehele procedure en controleer regelmatig of deze niet zijn verontreinigd met materiaal uit een monster. Gooi de handschoenen weg als u denkt dat ze zijn verontreinigd.
- Open niet meer dan één buisje tegelijk om het risico op kruisbesmetting te minimaliseren.
- Centrifugeer de microcentrifugebuisjes kort na elke vortexstap om eventuele druppeltjes aan de onderkant van de dop te verwijderen. De gebruiker dient ervoor te zorgen dat de monsters gedurende de gehele procedure traceerbaar blijven.
- Alle centrifugatiestappen moeten worden uitgevoerd bij kamertemperatuur (15-25 °C).
- Gebruik geen onderdelen uit andere kits met de kit die u op dit moment gebruikt, tenzij de partijnummers identiek zijn.
- Voorkom microbiële besmetting van de reagentia van de kit.
- Om het risico op besmetting door mogelijk besmettelijk materiaal te minimaliseren, adviseren wij om te werken in een laminaire luchtstroomkast totdat de monsters zijn gelyseerd.
- Deze kit mag alleen worden gebruikt door mensen die zijn opgeleid op het gebied van laboratoriumwerkwijzen voor in-vitrodiagnostiek.

Reagentia en buffers bereiden

- QIAGEN Protease bereiden

Voeg 1,2 ml proteaseoplosmiddel (PS) toe aan de flacon met gelyofiliseerde QIAGEN Protease (QP) en meng voorzichtig. Meng de inhoud van de flacon door deze meerdere keren om te keren. Zo voorkomt u dat het mengsel gaat schuimen. Zorg ervoor dat de QIAGEN Protease (QP) volledig wordt opgelost.

Belangrijk: Voeg QIAGEN Protease (QP) niet rechtstreeks toe aan lysisbuffer (AL).

- Wasbuffer 1 bereiden

Voeg met behulp van een maatcilinder 25 ml ethanol (96-100%) toe aan de fles met 19 ml wasbuffer 1-concentraat (AW1). Bewaar de gereconstitueerde wasbuffer 1 (AW1) bij kamertemperatuur (15-25 °C).

Belangrijk: Meng de gereconstitueerde wasbuffer 1 (AW1) altijd door de fles meerdere malen om te keren voordat u de procedure start.

- Wasbuffer 2 bereiden

Voeg met behulp van een maatcilinder 30 ml ethanol (96-100%) toe aan de fles met 13 ml wasbuffer 2-concentraat (AW2). Bewaar de gereconstitueerde wasbuffer 2 (AW2) bij kamertemperatuur (15-25 °C).

Belangrijk: Meng de gereconstitueerde wasbuffer 2 (AW2) altijd door de fles meerdere malen om te keren voordat u de procedure start.

- Elutiebuffer bereiden

De kit bevat één fles elutiebuffer (AE). Om besmetting van elutiebuffer (AE) te voorkomen, adviseren wij dringend om pipetpunten met aerosolfilters te gebruiken wanneer u de elutiebuffer (AE) uit de fles pipetteert en om de dop van de fles direct erna weer terug te plaatsen.

Belangrijk: Elutiebuffer (AE) bevat het conserveringsmiddel natriumazide, dat absorbeert bij 260 nm. Zorg er daarom voor dat het blanco monster dezelfde concentratie natriumazide bevat als het eluaat wanneer u de hoeveelheid DNA in het eluaat vaststelt met behulp van absorptiemetingen bij 260 nm, wanneer u de zuiverheid van het DNA in het eluaat bepaalt met behulp van absorptiemetingen bij 260 nm of 280 nm of wanneer u wilt vaststellen wanneer absorptie plaatsvindt bij 220 nm tot 350 nm. Als u bijvoorbeeld eluaat bereidt voor absorptiemetingen door 50 µl eluaat te verdunnen met 100 µl water, moet u het blanco monster bereiden door 50 µl elutiebuffer (AE) te verdunnen met 100 µl water. Bereid de verdunningen met schoon, gedestilleerd water.

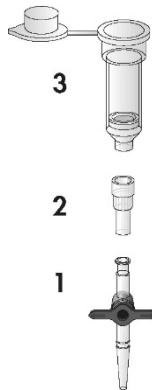
Werken met QIAamp Mini-spinkolommen

Omdat de technieken waarin gebruik wordt gemaakt van nucleïnezuuramplificatie erg gevoelig zijn, moeten tijdens het werken met QIAamp Mini-spinkolommen de volgende voorzorgsmaatregelen worden toegepast om kruisbesmetting tussen verschillende monsterbereidingen te voorkomen:

- ga zorgvuldig te werk bij het aanbrengen van het monster of de oplossing op de QIAamp Mini-spinkolom. Pipetteer het monster naar de QIAamp Mini-spinkolom zonder de rand van de kolom te bevochtigen.
- Raak het membraan van de QIAamp Mini-spinkolom niet aan met de pipetpunt.
- Open niet meer dan één QIAamp Mini-spinkolom tegelijk en zorg dat er geen aerosolen kunnen worden gevormd;

Het QIAvac 24 Plus-vacuümsysteem configureren

Zorg ervoor dat de QIAamp Mini-spinkolom, de VacConnector (VC) en het VacValve correct zijn geïnstalleerd (zie afbeelding 2).



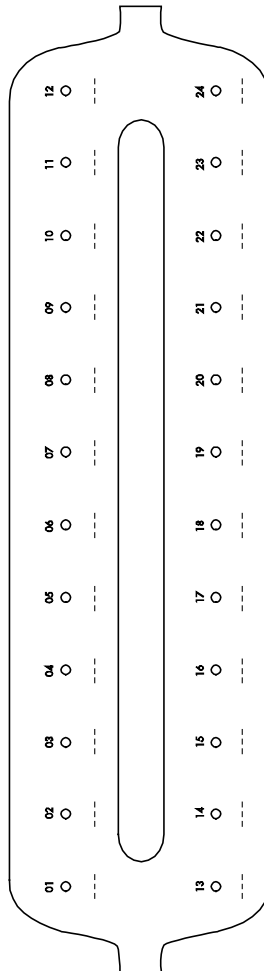
Afbeelding 2. De onderdelen van de QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit in elkaar zetten voor het vacuüm verwerken van monsters. (1) VacValve (2) VacConnector (VC) en (3) QIAamp Mini-spinkolom

Als u werkt aan de hand van de vacuümprocedure met het QIAvac 24 Plus-vacuümsysteem, adviseren wij om de lysisbuisjes (LT), elutiebuisjes (ET) en de QIAamp Mini-spinkolom te voorzien van een etiket volgens het schema in afbeelding 3 (zie volgende pagina) om te voorkomen dat monsters met elkaar worden verward. U kunt deze afbeelding kopiëren en op de kopie de namen van de monsters invullen. Als u een ander vacuümsysteem of de centrifugeerprocedure gebruikt, adviseren wij om een vergelijkbaar schema te gebruiken.

Datum: _____

Gebruiker: _____

Run-ID: _____



Afbeelding 3. Etiketteerschema voor lysisbuisjes (LT), elutiebuisjes (ET) en QIAamp Mini-spinkolommen voor gebruik met het QIAvac 24 Plus-vacuümsysteem.

Procedure

Protocol: Isolatie en zuivering van genomisch DNA uit bloedmonsters met behulp van een microcentrifuge/geautomatiseerde zuivering met de QIAcube Connect MDx

Voor isolatie en zuivering van genomisch DNA uit 200 µl volbloed dat is behandeld met EDTA of citraat met behulp van een microcentrifuge of geautomatiseerd met de QIAcube Connect MDx.

Wat u moet weten voordat u begint

- In onderstaande procedure staan instructies voor het verwerken van één bloedmonster. U kunt echter meerdere monsters gelijktijdig verwerken; het aantal is afhankelijk van de capaciteit van de gebruikte microcentrifuge.
- Met de QIAcube Connect MDx kan geautomatiseerde verwerking van 2-10 of 12 monsters worden uitgevoerd.
- Volg voor automatisering de instructies op de gebruikersinterface (QIAcube Connect MDx) en raadpleeg de *Gebruikershandleiding van de QIAcube Connect MDx* (die te vinden is onder het tabblad 'Resources' (Hulpmiddelen) van de productpagina op www.qiagen.com).

Wat u moet doen voordat u begint

- Laat de bloedmonsters op kamertemperatuur komen en controleer of ze goed zijn gemengd.
- Zorg ervoor dat alle reagentia en de QIAamp Mini-spinkolommen (in gesloten blisterverpakkingen) op kamertemperatuur zijn gebracht.
- Stel een verwarmblok in op 56 °C voor gebruik in stap 4 (vereist voor handmatige procedure en geautomatiseerde procedure met handmatige lysering zonder instrument).
- Controleer of wasbuffer 1 (AW1), wasbuffer 2 (AW2) en QIAGEN Protease (QP) is bereid volgens de instructies in de paragraaf 'Reagentia en buffers bereiden' op pagina 22.

- Als er zich precipitaat heeft gevormd in de lysisbuffer (AL), lost u deze op door te incuberen op 56 °C.
- Tijdens de procedures voor kwaliteitscontrole van QIAGEN worden op iedere afzonderlijke kitpartij functionele testen uitgevoerd. Meng daarom geen reagentia uit kits uit verschillende partijen, en voeg geen reagentia uit verschillende partijen samen.

Procedure

- Voor de handmatige procedure met een microcentrifuge volgt u stap 1-15.
- Deze procedure kan worden geautomatiseerd in 3 verschillende versies:
 - Elutievolume: volledige automatisering met 100 µl (vanaf stap 1 beginnen)
 - Elutievolume: volledige automatisering met 200 µl (vanaf stap 1 beginnen)
 - Handmatige lysering: gedeeltelijke automatisering met handmatige lysering zonder instrument en elutie volumes van 100-200 µl in stappen van 10 µl (automatisering vanaf stap 5 beginnen)

1. Pipetteer 20 µl QIAGEN-protease (QP) in een lysisbuisje (LT).

- ① Controleer voor gebruik de vervaldatum van de gereconstitueerde protease.

2. Voeg 200 µl van het bloedmonster toe aan het lysisbuisje (LT).

3. Voeg 200 µl lysisbuffer (AL) toe aan het lysisbuisje (LT), sluit het deksel en meng de inhoud gedurende 15 sec. met een puls-vortexmixer.

- ① Voor efficiënte lysering is het essentieel dat het monster en de lysisbuffer (AL) grondig worden gemengd tot een homogene oplossing.

- ① Aangezien lysisbuffer (AL) een hoge viscositeit heeft, moet u ervoor zorgen dat u het juiste volume aan lysisbuffer (AL) toevoegt door zorgvuldig te pipetteren en door een geschikte pipet te gebruiken.

- ① Voeg QIAGEN Protease (QP) niet rechtstreeks toe aan lysisbuffer (AL).

4. Incubeer gedurende 10 min. bij 56 °C.

5. Centrifugeer het lysisbuisje (LT) gedurende ≥ 5 sec. op volle snelheid om druppels van de binnenkant van het deksel te verwijderen.



Als de handmatige lysering (stap 1-5) is uitgevoerd zonder instrument, kunnen de volgende stappen (stap 6-15) worden geautomatiseerd met de QIAcube Connect MDx met behulp van het protocol voor handmatige lysering.

6. Voeg 200 μ l ethanol (96-100%) toe aan het lysisbuisje (LT), sluit het deksel en meng de inhoud grondig gedurende ≥ 15 sec. met een puls-vortexmixer.

7. Centrifugeer het lysisbuisje (LT) gedurende ≥ 5 sec. op volle snelheid om druppels van de binnenkant van het deksel te verwijderen.

8. Breng het volledige lysaat van stap 7 over naar de QIAamp Mini-spinkolom zonder de rand te bevochtigen. Raak het membraan van de QIAamp Mini-spinkolom niet aan met de pipetpunt.



Als u meerdere monsters verwerkt, opent u slechts één lysisbuisje (LT) tegelijk.

9. Sluit het deksel van de QIAamp Mini-spinkolom en centrifugeer 1 min. bij ongeveer $6000 \times g$. Plaats de QIAamp Mini-spinkolom in een schoon wasbuisje (WT) en gooi het buisje met het filtraat weg.



Als het lysaat na centrifugeren op $6000 \times g$ (8000 tpm) nog niet volledig het membraan is gepasseerd, centrifugeert u opnieuw op volledige snelheid (maximaal $20.800 \times g$) gedurende 1 min.




Gooi het monster weg en herhaal de stappen voor isolatie en zuivering met nieuw monstermateriaal vanaf stap 1 op pagina 27 als het lysaat tijdens het centrifugeren nog steeds niet het membraan passeert.


10. Open de QIAamp Mini-spinkolom voorzichtig en voeg 500 μ l wasbuffer 1 (AW1) toe zonder de rand te bevochtigen. Raak het membraan van de QIAamp Mini-spinkolom niet aan met de pipetpunt.


11. Sluit het deksel van de QIAamp Mini-spinkolom en centrifugeer 1 min. bij ongeveer 6000 x g. Plaats de QIAamp Mini-spinkolom in een schoon wasbuisje (WT) en gooi het buisje met het filtraat weg.
12. Open de QIAamp Mini-spinkolom voorzichtig en voeg 500 µl wasbuffer 2 (AW2) toe zonder de rand te bevochtigen. Raak het membraan van de QIAamp Mini-spinkolom niet aan met de pipetpunt.
13. Sluit het deksel van de QIAamp Mini-spinkolom en centrifugeer gedurende 1 min op volle snelheid (ongeveer 20.000 x g ofwel 14.000 tpm). Plaats de QIAamp Mini-spinkolom in een schoon wasbuisje (WT) en gooi het buisje met het filtraat weg.

Centrifugeer op volle snelheid (ongeveer 20.000 x g, ofwel 14.000 tpm) gedurende 3 min. om het membraan volledig te drogen.


 Als u het membraan niet droog centrifugeert, kan dit negatieve invloed hebben op de vervolgassay.


14. Plaats de QIAamp Mini-spinkolom in een nieuw elutiebusje (ET) en gooi het wasbuisje (WT) met het filtraat weg. Open voorzichtig het deksel van de QIAamp Mini-spinkolom en breng 50 tot 200 µl elutiebuffer (AE) over naar het midden van het membraan.

 Het is belangrijk om een nieuw elutiebusje te gebruiken om verontreiniging met resterende wasbuffers te voorkomen; deze kunnen een negatieve invloed op de vervolgassay hebben.

 Het doseren van de elutiebuffer (AE) in het midden van het membraan is met name belangrijk voor kleinere elutievolumes om een optimale terugwinning van nucleïnezuren en elutiebuffer (AE) te garanderen.

15. Sluit het deksel en incubeer 1 min. bij kamertemperatuur. Centrifugeer 1 min. bij ongeveer 6000 x g (8000 tpm) om het DNA te elueren.

 Oriënteer de deksels van de elutiebusjes zo dat deze in de tegenovergestelde richting van de rotatie van de rotor wijzen (oriënteer de deksels bijvoorbeeld linksom als de rotor rechtsom draait).

 Bij alle geautomatiseerde procedures verwijdert u het eluaat direct na een voltooide run uit het instrument en bewaart u deze naar behoren.

Protocol: isolatie en zuivering van genomisch DNA uit bloedmonsters met behulp van een vacuümsysteem

Voor isolatie en zuivering van genomisch DNA uit 200 µl volbloed dat is behandeld met EDTA of citraat met behulp van een vacuümsysteem, zoals het QIAvac 24 Plus-vacuümsysteem.

Wat u moet weten voordat u begint

In onderstaande procedure staan instructies voor het verwerken van één bloedmonster. Met het QIAvac 24 Plus-vacuümsysteem kunt u echter tot 24 monsters gelijktijdig verwerken.

Wat u moet doen voordat u begint

- Laat de bloedmonsters op kamertemperatuur komen en controleer of ze goed zijn gemengd.
- Zorg ervoor dat alle reagentia en de QIAamp Mini-spinkolommen (in gesloten blisterverpakkingen) op kamertemperatuur zijn gebracht.
- Stel een verwarmblok in op 56 °C om te gebruiken in stap 4.
- Controleer of wasbuffer 1 (AW1), wasbuffer 2 (AW2) en QIAGEN Protease (QP) is bereid volgens de instructies in de paragraaf 'Reagentia en buffers bereiden' op pagina 22.
- Als er zich precipitaat heeft gevormd in de lysisbuffer (AL), lost u deze op door te incuberen op 56 °C.
- Sluit een VacConnector (VC) aan op elke Luer-adapter van het vacuümsysteem om het risico op kruisbesmetting te minimaliseren.
- Controleer of de afvalfles van het vacuümsysteem leeg is en of alle koppelingen goed zijn aangesloten.
- Raadpleeg de meegeleverde handleiding voor meer informatie over de werking en met name het onderhoud van het vacuümsysteem.
- Tijdens de procedures voor kwaliteitscontrole van QIAGEN worden op iedere afzonderlijke kitpartij functionele testen uitgevoerd. Meng daarom geen reagentia uit kits uit verschillende partijen, en voeg geen reagentia uit verschillende partijen samen.

Procedure

1. Pipetteer 20 µl QIAGEN Protease (QP) in een lysisbuisje (LT).
 - ① Controleer voor gebruik de vervaldatum van de gereconstitueerde protease.
2. Voeg 200 µl van het bloedmonster toe aan het lysisbuisje (LT).
3. Voeg 200 µl lysisbuffer (AL) toe aan het lysisbuisje (LT), sluit het deksel en meng de inhoud gedurende ≥ 15 sec. met een puls-vortexmixer.
 - ① Voor efficiënte lysering is het essentieel dat het monster en de lysisbuffer (AL) grondig worden gemengd tot een homogene oplossing.
 - ① Aangezien lysisbuffer (AL) een hoge viscositeit heeft, moet u ervoor zorgen dat u het juiste volume aan lysisbuffer (AL) toevoegt door zorgvuldig te pipetteren en door een geschikte pipet te gebruiken.
 - ① Voeg QIAGEN Protease (QP) niet rechtstreeks toe aan lysisbuffer (AL).
4. Incubeer gedurende 10 min. bij 56 °C.
5. Centrifugeer het lysisbuisje (LT) gedurende ≥ 5 sec. op volle snelheid om druppels van de binnenkant van het deksel te verwijderen.
6. Voeg 200 µl ethanol (96-100%) toe aan het lysisbuisje (LT), sluit het deksel en meng de inhoud grondig gedurende ≥ 15 sec. met een puls-vortexmixer.
7. Centrifugeer het lysisbuisje (LT) gedurende ≥ 5 sec. op volle snelheid om druppels van de binnenkant van het deksel te verwijderen.
8. Sluit de QIAamp Mini-spinkolom aan op de VacConnector (VC) van het vacuümsysteem. Controleer of het hoofdventiel (tussen het vacuümsysteem en het vacuümverdeelstuk) en het schroefdopventiel (op het vacuümverdeelstuk) zijn gesloten. Schakel de vacuümpomp in. Gooi het wasbuisje (WT) (2 ml) waarin de QIAamp Mini-spinkolom is geplaatst weg in de blisterverpakking.

Het vacuüm wordt alleen toegepast op het verbindingssysteem (als dat wordt gebruikt) en niet op het vacuümverdeelstuk.

9. Breng het volledige lysaat van stap 7 over naar de QIAamp Mini-spinkolom zonder de rand te bevochtigen. Raak het membraan van de QIAamp Mini-spinkolom niet aan met de pipetpunt.

i Als u meerdere monsters verwerkt, opent u slechts één lysisbuisje (LT) tegelijk.

10. Open het hoofdvacuümventiel. Sluit het hoofdvacuümventiel en open het schroefdoopventiel op het vacuümverdeelstuk om het vacuüm op te heffen nadat het lysaat het membraan van de QIAamp Mini-spinkolom is gepasseerd. Sluit het schroefdoopventiel nadat het vacuüm in het verdeelstuk is opgeheven.

Nadat het hoofdvacuümventiel is gesloten, wordt het vacuüm alleen toegepast op het verbindingssysteem (als dat wordt gebruikt) en niet op het vacuümverdeelstuk.

i Gebruik het schroefdoopventiel op het vacuümverdeelstuk om het vacuüm snel op te heffen.

i Als u meerdere QIAamp Mini-spinkolommen gelijktijdig verwerkt, adviseren wij om de VacValve van elke kolom te sluiten nadat het lysaat is gepasseerd, zodat deze vacuümstap sneller verloopt.

i Plaats, als het lysaat na 10 min. nog niet volledig het membraan is gepasseerd, de QIAamp Mini-spinkolom in een schoon wasbuisje, sluit het deksel en centrifugeer het busje 3 min. met 6000 x g (8000 tpm) of totdat het lysaat het membraan volledig is gepasseerd. Plaats de QIAamp Mini-spinkolom in een ander schoon wasbuisje (WT) en ga verder met stap 10 van het protocol op pagina 32.

i Gooi het monster weg en herhaal de stappen voor isolatie en zuivering met nieuw monstermateriaal vanaf stap 1 op pagina 31 als het lysaat tijdens het centrifugeren nog steeds niet het membraan passeert.

11. Voeg 750 µl wasbuffer 1 (AW1) toe aan de QIAamp Mini-spinkolom zonder de rand te bevochtigen. Raak het membraan van de QIAamp Mini-spinkolom niet aan met de pipetpunt. Laat het deksel van de kolom geopend en open het hoofdvacuümventiel. Sluit het hoofdvacuümventiel nadat de wasbuffer 1 (AW1) het membraan van de QIAamp Mini-spinkolom is gepasseerd en open het schroefdoopventiel om het vacuüm op te heffen. Sluit het schroefdoopventiel nadat het vacuüm in het verdeelstuk is opgeheven.

12. Voeg 750 µl wasbuffer 2 (AW2) toe aan de QIAamp Mini-spinkolom zonder de rand te bevochtigen. Raak het membraan van de QIAamp Mini-spinkolom niet aan met de pipetpunt. Laat het deksel van de kolom geopend en open het hoofdvacuümventiel. Sluit het hoofdvacuümventiel nadat de wasbuffer 2 (AW2) het membraan van de QIAamp Mini-spinkolom is gepasseerd en open het schroefdoventiel om het vacuüm op te heffen. Sluit het schroefdoventiel nadat het vacuüm in het verdeelstuk is opgeheven.
13. Sluit het deksel van de QIAamp Mini-spinkolom, verwijder deze van het vacuümsysteem en gooi de VacConnector (VC) weg. Plaats de QIAamp Mini-spinkolom in een schoon wasbuisje (WT) en centrifugeer dit buisje gedurende 3 min. op volle snelheid (ongeveer 20.000 x g of 14.000 tpm) om het membraan volledig te drogen.
- ❗ Als u het membraan niet droog centrifugeert, kan dit negatieve invloed hebben op de vervolgassay.
14. Plaats de QIAamp Mini-spinkolom in een nieuw elutiebuisje (ET) en gooi het wasbuisje (WT) met het filtraat weg. Open voorzichtig het deksel van de QIAamp Mini-spinkolom en breng 50 tot 200 µl elutiebuffer (AE) over naar het midden van het membraan.
- ❗ Het is belangrijk om een nieuw elutiebuisje (ET) te gebruiken om verontreiniging met resterende wasbuffers te voorkomen die een negatieve invloed op de vervolgassay kunnen hebben.
 - ❗ Het doseren van de elutiebuffer (AE) in het midden van het membraan is met name belangrijk voor kleinere elutievolumes om een optimale terugwinning van nucleïnezuren en elutiebuffer (AE) te garanderen.
15. Sluit het deksel en incubeer gedurende 1 min. bij kamertemperatuur. Centrifugeer 1 min. bij 6000 x g (8000 tpm) om het DNA te elueren.
- ❗ Oriënteer de deksels van de elutiebuisjes (ET) zo dat deze in de tegenovergestelde richting van de rotatie van de rotor wijzen (oriënteer de deksels bijvoorbeeld linksom als de rotor rechtsom draait).
 - ❗ Volg de onderhoudsprocedure voor het vacuümsysteem na het uitvoeren van dit protocol (zie de meegeleverde handleiding van het vacuümsysteem voor uitgebreidere informatie).

Kwaliteitscontrole

Elke partij QIAamp DSP DNA Blood Mini Kits wordt, in overeenstemming met het ISO-gecertificeerde kwaliteitsbeheersysteem van QIAGEN, getest op vooraf vastgestelde specificaties om een consistente kwaliteit van het product te waarborgen.

Beperkingen

De werking van het systeem is vastgesteld met behulp van volbloed voor de isolatie van genomisch DNA.

Informatie over het gebruik van de QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit is te vinden in het gedeelte 'Beschrijving en principe'. De geautomatiseerde procedure is te vinden in het gedeelte 'Protocol: Isolatie en zuivering van genomisch DNA uit bloedmonsters met behulp van een microcentrifuge/geautomatiseerde zuivering met de QIAcube Connect MDx'.

Het is de verantwoordelijkheid van de gebruiker om de systeemprestaties te valideren voor alle procedures die in het laboratorium worden gebruikt en niet worden gedekt door de prestatieonderzoeken van QIAGEN.

Om het risico van een negatieve invloed op de diagnostische resultaten zo klein mogelijk te houden, moeten de juiste controles worden gebruikt voor vervolgtoeepassingen. Voor verdere validering worden de richtlijnen van de 'International Conference on Harmonization of Technical Requirements (ICH)' in: 'ICH Q2(R1) Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology', aanbevolen.

Alle diagnostische resultaten die worden gegenereerd, moeten worden geïnterpreteerd in combinatie met andere klinische of laboratoriumbevindingen.

Prestatiekenmerken

De toepasselijke prestatiekenmerken kunt u vinden onder het tabblad 'Resources' (Hulpmiddelen) van de productpagina op www.qiagen.com.

Problemen oplossen

Dit gedeelte kan nuttig zijn bij het oplossen van eventuele problemen. Raadpleeg voor meer informatie de pagina Veelgestelde vragen in ons centrum voor technische ondersteuning: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. De wetenschappers van de technische diensten van QIAGEN beantwoorden graag al uw vragen over de informatie en/of protocollen in deze handleiding of over test- en assaytechnieken (kijk op www.qiagen.com voor contactgegevens).

Opmerkingen en suggesties

Algemeen werk

- a) Verstopping van pipettips tijdens monsteroverdracht
- Meng de bloedmonsters grondig (bijv. door de buizen een aantal keer om te draaien) alvorens deze over te brengen. Bevroren monsters moeten snel worden ontdooid in een waterbad van 37 °C onder zacht schudden om voor een goede menging te zorgen. Laat de monsters vervolgens op kamertemperatuur komen (15-25 °C) voordat de procedure wordt gestart.
- Probeer bloedstolsels in de monsters te voorkomen en breng de monsters zonder bloedstolsels over. Het membraan van de QIAamp Mini-spinkolom kan verstopt raken of er kunnen problemen ontstaan tijdens de geautomatiseerde procedure door cryoprecipitaten die worden gevormd tijdens het ontdooiden van bevroren monsters.
- b) Verstopte QIAamp Mini-spinkolom
- Centrifugatieworkflow:
- Als het lysaat na centrifugeren op 6000 × g (8000 tpm) nog niet volledig het membraan is gepasseerd, centrifugeert u opnieuw op volledige snelheid (maximaal 20.800 × g) gedurende 1 min.
- Gooi het monster weg en herhaal de stappen voor isolatie en zuivering met nieuw monstermateriaal vanaf stap 1 als het lysaat tijdens het centrifugeren nog steeds niet het membraan passeert.
- Vacuümworkflow:
- Als de flowsnelheid gereduceerd is, kan de vacuümtijd langer duren.
- Of sluit de VacValve, indien gebruikt, en verwijder voorzichtig het geheel van de VacConnector-VacValve van de QIAamp Mini-spinkolom zonder dat er lysaat verloren gaat.
- Verwijder de QIAamp Mini-spinkolom uit het vacuümverdeelstuk, plaats deze in een wasbuisje van 2 ml en draai deze op maximale snelheid tot het gehele monster het membraan is gepasseerd. Vervang het geheel van de VacConnector-VacValve met het resterende lysaat. Schakel de vacuümpomp in, open de VacValve en blijf het resterende lysaat plaatsen.
- Herhaal de bovenstaande procedure als de QIAamp Mini-spinkolom verstopt blijft.

Opmerkingen en suggesties

Gooi het monster weg en herhaal de stappen voor isolatie en zuivering met nieuw monstermateriaal vanaf stap 1 als het lysaat tijdens het centrifugeren nog steeds niet het membraan passeert.

Algemene informatie

Er kunnen zich cryoprecipitaten hebben gevormd vanwege herhaaldelijk invriezen en ontdooien. Deze kunnen de QIAamp Mini-spinkolom verstoppem. Gebruik geen bloedmonsters die meer dan drie keer zijn bevroren en ontdood. Bevroren monsters moeten snel worden ontdood in een waterbad van 37 °C onder zacht schudden om voor een goede menging te zorgen. Laat de monsters vervolgens op kamertemperatuur komen (15-25°C) voordat de procedure wordt gestart.

- c) Er heeft zich precipitaat gevormd in de lysisbuffer (AL) Oplossen door middel van incubatie van de lysisbuffer (AL) bij 56 °C.
- d) Variabele elutie volumes Het verkregen volume van het eluaat is afhankelijk van de aard van het monster. Vanwege de resterende elutiebuffer (AE) die na centrifugeren door het membraan van de spinkolom wordt vastgehouden, kan het verkregen volume van het eluaat lager zijn dan het volume van de elutiebuffer dat op de kolom wordt aangebracht.
Breng de elutiebuffer (AE) aan op het midden van het membraan. Het doseren van de elutiebuffer (AE) in het midden van het membraan is met name belangrijk voor kleinere elutie volumes om een optimale terugwinning van nucleïnezuren en elutiebuffer (AE) te garanderen.
- e) Vacuümdruk van ongeveer 800 tot 900 mbar niet bereikt Het vacuümverdeelstuk is niet goed gesloten. Druk het dopje op het vacuümverdeelstuk nadat het vacuüm is ingeschakeld. Controleer of de vacuümdruk wordt bereikt. Pakking van QIAvac-dop is versleten. Controleer de afdichting van het verdeelstuk visueel en vervang deze zo nodig.
VacValves zijn versleten. Verwijder alle VacValves en plaats VacConnectors (VC) direct op de luer-extensies. Plaats QIAamp Mini-spinkolommen in de VacConnectors (VC), sluit het dopje van de kolommen en schakel het vacuüm in. Controleer of de vacuümdruk wordt bereikt. Vervang de VacValves zo nodig.
Aansluiting met vacuümpomp is lek. Sluit alle luer-extensies met luer-doppen en schakel de vacuümpomp in. Controleer of de vacuümdruk stabiel is nadat de pomp is ingeschakeld (en het ventiel van de Vacuum Regulator gesloten is). Vervissel zo nodig de aansluitingen tussen de pomp en het vacuümverdeelstuk.
Als de vacuümdruk nog steeds niet wordt bereikt, vervangt u de vacuümpomp door een sterkere.
- f) Voor problemen tijdens de geautomatiseerde workflow Raadpleeg de *Gebruikershandleiding van de QIAcube Connect MDx* (te vinden onder het tabblad 'Resources' (Hulpmiddelen) van de productpagina op www.qiagen.com).
-

Opmerkingen en suggesties

Lage DNA-opbrengst

- a) Onvolledige lysering van monsters
- Als QIAGEN Protease (QP) langdurig is blootgesteld aan een hogere temperatuur, kan de activiteit verloren gaan. Herhaal de procedure met nieuwe monsters en verse QIAGEN Protease (QP).
- Zorg ervoor dat u QIAGEN Protease (QP) oplost met proteaseoplosmiddel (PS) volgens de bovenstaande instructies. Meng de inhoud van de flacon door deze meerdere keren om te keren. Zo voorkomt u dat het mengsel gaat schuimen. Zorg ervoor dat de QIAGEN Protease (QP) volledig wordt opgelost. Voeg QIAGEN Protease (QP) niet rechtstreeks toe aan lysisbuffer (AL).
- Voor efficiënte lysering is het essentieel dat het monster en de lysisbuffer (AL) grondig worden gemengd tot een homogene oplossing. Aangezien lysisbuffer (AL) een hoge viscositeit heeft, moet u ervoor zorgen dat u het juiste volume aan lysisbuffer (AL) toevoegt door zorgvuldig te pipetteren en door een geschikte pipet te gebruiken.
- b) Ethanol met laag percentage gebruikt in plaats van 96-100%
- Herhaal de zuiveringsprocedure met nieuwe monsters en 96-100% ethanol. Gebruik geen gedenatureerde alcohol, aangezien daarin andere stoffen aanwezig zijn zoals methanol of methylethylketon.
- c) Buffer AW1 of Buffer AW2 verkeerd voorbereid
- Zorg ervoor dat de Buffer AW1- en Buffer AW2-concentraten zijn verdund met het juiste volume 96-100% ethanol en zijn gemengd door de fles meerdere keren om te keren alvorens de procedure te starten.
- d) Bloedmonsters zijn niet op de juiste manier bewaard
- De opbrengst en kwaliteit van het gezuiverde DNA zijn afhankelijk van de opslagcondities van het bloed. Versere bloedmonsters kunnen betere resultaten opleveren. We adviseren opslag bij 2-8 °C voor kortdurende opslag van maximaal 10 dagen. Voor toepassingen waarbij maximale fragmentgrootte benodigd is, zoals Southern blotting, wordt echter opslag van maximaal 3 dagen bij 2-8 °C aangeraden, omdat er na deze tijd een kleine hoeveelheid DNA-degradatie optreedt. Verzamel bloed voor langdurige opslag (meer dan 10 dagen) in buisjes die een standaard antistollingsmiddel bevatten (bij voorkeur EDTA, indien DNA met hoog molecuulgewicht nodig is) en bewaar bij -20 °C of -80 °C.
- e) Bevroren bloedmonsters zijn na het ontdooien niet goed gemengd
- Bevroren monsters moeten snel worden ontdooid in een waterbad van 37 °C onder zacht schudden om voor een goede menging te zorgen. Laat de monsters vervolgens op kamertemperatuur komen (15-25 °C) voordat de procedure wordt gestart.

DNA presteert niet goed in vervolgreacties


- a) Weinig of geen DNA in het eluaat
- Raadpleeg 'Lage DNA-opbrengst' hierboven voor mogelijke oorzaken hiervan. Vergroot zo mogelijk de hoeveelheid eluaat dat wordt toegevoegd aan de reactie.
- b) Ongeschikt elutievolume gebruikt
- Bepaal het maximale volume van eluaat dat geschikt is voor uw vervolprocedure. Verlaag of verhoog dienovereenkomstig het volume van het eluaat dat wordt toegevoegd aan de vervolprocedure. Het elutievolume kan proportioneel worden aangepast. Elutie met kleinere volumes van Buffer AE leidt tot hogere concentraties nucleïnezuur maar kan leiden tot een lagere totale opbrengst.

Opmerkingen en suggesties








- | | |
|------------------------------------|--|
| c) Onvoldoende DNA gebruikt | Kwantificeer het gezuiverde DNA door spectrofotometrische meting van de absorptie bij 260 nm. |
| d) Te veel DNA gebruikt | Te veel DNA kan sommige enzymatische reacties nadelig beïnvloeden. Kwantificeer het gezuiverde DNA door spectrofotometrische meting van de absorptie bij 260 nm. |
| e) Mogelijke carry-over van remmer | Zorg ervoor dat u vóór de elutie droog centrifugeert om mogelijke remming van de vervolgassay te voorkomen. Het is belangrijk om een nieuw elutiebusje (ET) te gebruiken om verontreiniging met resterende wasbuffers te voorkomen die een negatieve invloed op de vervolgassay kunnen hebben. |

Symbolen

De volgende symbolen worden in de gebruiksaanwijzing of op de verpakking en etiketten weergegeven:

Symbol	Symboldefinitie
 Σ <N>	Bevat voldoende reagentia voor <N> reacties
	Uiterste gebruiksdatum
	Dit product voldoet aan de vereisten van de Europese regelgeving 2017/746 inzake in-vitrodiagnostische medische hulpmiddelen.
	In-vitrodiagnostisch medisch hulpmiddel
	Bij aankomst
	Direct na aankomst openen; QIAamp Mini-spinkolommen bewaren bij 2-8 °C
	Catalogusnummer
	Partijnummer
	Materiaalnummer (m.b.t. labeling van componenten)
	Bestanddelen

Symbol	Symboldefinitie
	Bevat
	Nummer
	Global Trade Item Number (Artikelnummer wereldhandel)
Rn	'R' staat voor de revisie van de gebruiksaanwijzing; 'n' is het revisienummer
	Temperatuurbepering
	Fabrikant
	Raadpleeg de gebruiksaanwijzing
	Volume
	Schrijf na toevoeging van ethanol aan het flesje de huidige datum op
	Toevoegen
	Gelyofiliseerd
	Reconstitueren in

Symbool	Symbooldefinitie
	Ethanol
	Guanidinehydrochloride
	Subtilisine
	Resulteert in
	Raadpleeg de gebruiksaanwijzing
	Belangrijke opmerking
	Uniek hulpmiddel-identificatienummer

Bestelgegevens

Product	Inhoud	Cat.nr.
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (50)	Voor 50 bereidingen: QIAamp Mini Spin Columns, buffers, reagentia, buisjes, VacConnectors	61104
Verwante producten		
QIAcube Connect MDx*	Het instrument en één jaar garantie op onderdelen en arbeidsloon	9003070
Hulpmiddelen		
QIAvac 24 Plus†	Vacuümverdeelstuk voor verwerking van 1-24-spinkolommen: omvat QIAvac 24 Plus Vacuum manifold, Luer Plugs, Quick Couplings	19413
Vacuümpomp (230 V, 50 Hz)†	Universele vacuümpomp (capaciteit 34 liter/min, 8 mbar vacuüm abs.)	84020
VacConnectors (500)†	500 wegwerpbare connectoren voor gebruik met QIAamp-spinkolommen op luer-connectoren	19407
VacValves (24)	24 ventielen voor gebruik met de QIAvac 24 en QIAvac 24 Plus	19408
Vacuum Regulator	Voor gebruik met de QIAvac-verdeelstukken	19530
QIAvac Connecting System	Systeem voor aansluiting van vacuümverdeelstuk met vacuümpomp: inclusief lade, afvalflessen, slangen, koppelingen, ventiel, meter, 24 VacValves	19419

Product	Inhoud	Cat.nr.
Rotor Adapters (10 x 24)	Voor 240 bereidingen: 240 wegwerprotoradapters en 240 elutiebuisjes (1,5 ml); voor gebruik met de QIAcube Connect MDx	990394
Rotor Adapter Holder	Houder voor 12 wegwerprotoradapters; voor gebruik met de QIAcube Connect MDx	990392
Sample Tubes CB (2 ml)	1000 conische buisjes van 2 ml met schroefdop zonder starand voor gebruik met de QIAcube Connect MDx	990382
Shaker Rack Plugs	Pluggen voor het schudderrek (12)	9017854
Reagent Bottles, 30 ml (6)	Reagensflessen (30 ml) met deksels; 6 in verpakking; voor gebruik met de QIAcube Connect MDx	990393
Filter-Tips, 1000 µl (1024)	Wegwerpfiltertips, in een rek; (8 x 128). Voor gebruik met de QIAcube Connect MDx	990352
Filter-Tips, 1000 µl, wide-bore (1024)	Wegwerpfiltertips, brede opening, in een rek; (8 x 128); niet vereist voor alle protocollen. Voor gebruik met de QIAcube Connect MDx	990452
Filter-Tips, 200 µl (1024)	Wegwerpfiltertips, in een rek; (8 x 128). Voor gebruik in combinatie met de QIAcube Connect MDx- en QIASymphony SP/AS-instrumenten	990332

* De QIAcube Connect MDx is niet in alle landen verkrijgbaar. Neem voor meer informatie contact op met de technische diensten van QIAGEN.

† Voor gebruik met vacuümprotocollen.

Raadpleeg voor bijgewerkte licentie-informatie en productspecifieke disclaimers de desbetreffende gebruiksaanwijzingen van de QIAGEN-kit. De gebruiksaanwijzingen van QIAGEN-kits zijn verkrijgbaar via www.qiagen.com of kunnen worden aangevraagd bij de technische diensten van QIAGEN of bij uw plaatselijke distributeur.

Revisiegeschiedenis van document

Revisie	Beschrijving
R1, juni 2022	<p data-bbox="412 376 594 400">Versie 3, revisie 1</p> <ul data-bbox="412 419 1003 1046" style="list-style-type: none"><li data-bbox="412 419 945 443">● Update naar kitversie 3 voor naleving van IVDR<li data-bbox="412 459 826 483">● Update van Beschrijving en principe<li data-bbox="412 499 972 603">● Update van Meegeleverde materialen (toevoeging van actieve bestanddelen) en Vereiste maar niet meegeleverde materialen<li data-bbox="412 619 1003 722">● Update van Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen (toevoeging van informatie bij noodgevallen en het gedeelte Afvoer)<li data-bbox="412 738 960 762">● Update van Opslag en verwerking van reagentia<li data-bbox="412 778 967 842">● Update van Afnemen, bewaren en verwerken van specimens<li data-bbox="412 858 981 882">● Update van Belangrijke opmerkingen en Procedure<li data-bbox="412 898 706 922">● Update van Beperkingen<li data-bbox="412 938 776 962">● Update van Prestatiekenmerken<li data-bbox="412 978 773 1002">● Update van gedeelte Symbolen<li data-bbox="412 1018 734 1042">● Update van Bestelgegevens

Deze pagina is met opzet leeg gelaten

Beperkte licentieovereenkomst voor de QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit

Door dit product te gebruiken, verklaart de koper of gebruiker zich akkoord met de volgende voorwaarden:

1. Het product mag uitsluitend worden gebruikt in overeenstemming met de protocollen die bij het product en deze handleiding zijn meegeleverd en mag alleen worden gebruikt met onderdelen die zich in het paneel bevinden. QIAGEN geeft onder haar intellectuele eigendom geen licentie om de bijgesloten onderdelen van dit paneel te gebruiken of samen te stellen met onderdelen die niet bij het paneel zijn meegeleverd, behalve zoals beschreven in de protocollen die bij het product en deze handleiding zijn meegeleverd en in aanvullende protocollen die beschikbaar zijn op www.qiagen.com. Enkele van deze aanvullende protocollen zijn door QIAGEN-gebruikers geleverd aan QIAGEN-gebruikers. Deze protocollen zijn niet grondig door QIAGEN getest of geoptimaliseerd. QIAGEN garandeert deze protocollen niet en garandeert evenmin dat ze geen rechten van derden schenden.
2. Anders dan uitdrukkelijk gesteld in licenties, garandeert QIAGEN niet dat dit paneel en/of het gebruik ervan geen rechten van derden schenden.
3. Dit paneel en de onderdelen ervan worden in licentie gegeven voor eenmalig gebruik en mogen niet worden hergebruikt, opgeknapt of doorverkocht.
4. QIAGEN doet in het bijzonder afstand van enige andere licenties die worden genoemd of geïmpliceerd, anders dan de uitdrukkelijk gestelde.
5. De koper en gebruiker van het paneel gaan ermee akkoord dat zij geen stappen ondernemen en niemand anders toestaan stappen te ondernemen die tot bovenstaande verboden handelingen kunnen leiden of deze vergemakkelijken. QIAGEN mag de verbodsbepalingen in deze Beperkte licentieovereenkomst afdwingen bij de rechter en zal alle onderzoekskosten en gerechtelijke kosten, inclusief advocaatkosten, verhalen bij elke handeling om deze Beperkte licentieovereenkomst of een intellectueel eigendomsrecht in verband met het paneel en/of de onderdelen ervan af te dwingen.

Raadpleeg www.qiagen.com voor de bijgewerkte licentievoorwaarden.

Handelsmerken: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIAcube® (QIAGEN Group); Sarsted® (Sarstedt AG and Co. KG).

Jun-2022 HB-3030-001 1127543NL © 2022 QIAGEN, alle rechten voorbehouden.

Bestellen www.qiagen.com/shop | Technische ondersteuning support.qiagen.com |
Website www.qiagen.com