

Januar 2021.

Uputstvo za upotrebu (priručnik) za QIAamp[®] DSP Viral RNA Mini Kit



Verzija 1



Za korišćenje u in vitro dijagnostici



61904



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



1122786RS



Sadržaj

Namena.....	5
Opis i princip rada.....	6
Adsorpcija u membranu QIAamp	8
Uklanjanje preostalih kontaminanata	8
Ispiranje pomoću Buffer AVE	8
Kontaminacija ćelijskom DNK	8
Zapremine uzoraka	9
Liziranje.....	9
RNK nosač.....	9
Dodavanje internih kontrola.....	10
Procedura centrifugiranja i vakuumska procedura	10
Automatizovana purifikacija virusne RNK na instrumentu QIAcube / QIAcube Connect MDx	11
Sažetak i objašnjenje	13
Obezbeđeni materijal.....	14
Sadržaj kompleta	14
Potreban materijal koji se ne isporučuje	15
Upozorenja i mere opreza	17
Informacije o bezbednosti	17
Čuvanje reagenasa i rukovanje njima.....	20
Čuvanje uzoraka i rukovanje njima.....	20
Procedura.....	21

Važne napomene pre početka	21
Priprema reagenasa i pufera.....	22
Rukovanje QIAamp Mini spin kolonicama	26
Podešavanje za QIAvac 24 Plus vakuum manifold	29
Centrifugiranje.....	30
Protokol: Koncentracija uzorka.....	31
Protokol: Purifikacija virusne RNK korišćenjem mikrocentrifuge ili instrumenta QIAcube / QIAcube Connect MDx.....	32
Protokol: Purifikacija virusne RNK (vakuumski protokol).....	35
Kontrola kvaliteta	38
Ograničenja	38
Simboli.....	39
Kontakt informacije	41
Dodatak	42
Informacije za naručivanje	45
Istorija revizija dokumenta	47

Namena

QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit je sistem koji koristi tehnologiju silikonske membrane (tehnologiju QIAamp) za izolaciju i purifikaciju virusne RNK iz bioloških uzoraka.

Ovaj proizvod je namenjen za upotrebu od strane profesionalnih korisnika, kao što su tehničari i lekari, koji su obučeni tehnikama koje se primenjuju u molekularnoj biologiji.

QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit je namenjen za in vitro dijagnostičku upotrebu.

Opis i princip rada

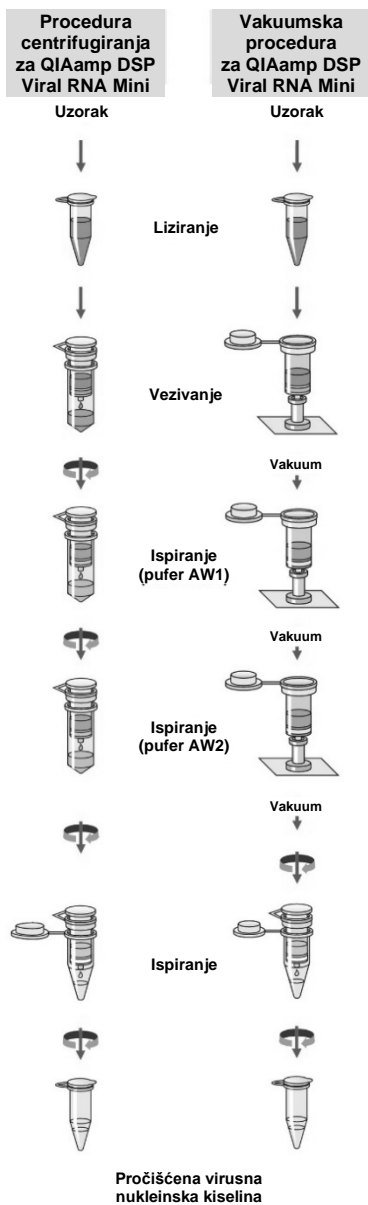
QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit predstavlja pouzdanu i rasprostranjenu tehnologiju za pripremu virusne RNK. Ovaj komplet nudi kombinaciju svojstava selektivnog vezivanja membrane na bazi silikonskog gela i brzine centrifugiranja ili vakuumske tehnologije, a pogodan je za istovremenu obradu većeg broja uzoraka. Protokoli centrifugiranja za QIAamp DSP Viral RNA mogu da se automatizuju na instrumentima QIAcube® i QIAcube Connect MDx.

Uzorak se najpre rastvara u uslovima povećane denaturacije kako bi se deaktivirale ribonukleaze i osigurala izolacija netaknute virusne RNK. Zatim se prilagođavaju uslovi puferovanja kako bi se omogućilo optimalno vezivanje RNK sa membranom QIAamp, a nakon toga se uzorak postavlja na QIAamp Mini spin kolonicu. RNK se vezuje sa membranom, a kontaminanti se uspešno ispiraju u dva koraka pomoću dva različita pufera za ispiranje. RNK visokog kvaliteta se ispira u specijalni pufer koji ne sadrži ribonukleazu i spremna je za neposrednu upotrebu ili bezbedno čuvanje.

Specijalna membrana QIAamp omogućava visoki nivo prinosa pročišćene i netaknute RNK za samo 20 minuta bez primene ekstrakcije fenola/hloroforma ili alkoholne precipitacije.

Svi puferi i reagensi garantovano ne sadrže ribonukleazu.

Automatski se sprovodi na instrumentu QIAcube / QIAcube Connect MDX



Adsorpcija u membranu QIAamp

Uslovi puferovanja lizata moraju da se prilagode kako bi se omogućili optimalni uslovi vezivanja za virusnu RNK pre ubacivanja uzorka na spin kolonicu QIAamp Mini. Usled velike zapremine lizata, neophodno je da se lizat ubaci na spin kolonicu QIAamp Mini u više koraka. Virusna RNK se adsorbuje u silikonsku membranu QIAamp u dva kratka koraka centrifugiranja ili pomoću vakuuma. So i pH vrednost lizata osiguravaju da se proteini i ostali kontaminanti koji mogu da inhibiraju naknadne enzimske reakcije ne zadržavaju na membrani QIAamp.

Uklanjanje preostalih kontaminanata

Sa virusne RNK, koja je vezana za membranu QIAamp, spiraju se kontaminanti u dva koraka centrifugiranja ili pomoću vakuuma. Ako se koriste dva različita pufera za ispiranje – AW1 i AW2, u velikoj meri se poboljšava čistoća isprane RNK. Optimizovani uslovi ispiranja osiguravaju efikasno uklanjanje eventualnih preostalih kontaminanata bez uticaja na vezivanje RNK.

Ispiranje pomoću Buffer AVE

Buffer AVE je voda koja ne sadrži ribonukleazu sa 0,04% natrijum azida koji sprečava mikrobiološki rast i naknadnu kontaminaciju ribonukleazama. Natrijum azid utiče na očitavanja spektrofotometrijske apsorpcije u opsegu između 220 i 280 nm, ali ne utiče na naknadne primene, kao što je RT-PCR testiranje. Ako želite da odredite čistoću isprane RNK, preporučujemo da kalibrišete spektrofotometar koristeći Buffer AVE pre merenja apsorpcije.

Kontaminacija ćelijskom DNK

QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit nije osmišljen za odvajanje virusne RNK od ćelijske DNK, tako da se obe prečišćavaju istovremeno ako su prisutne u uzorku. Da bi se izbegla istovremena purifikacija ćelijske DNK, preporučuje se korišćenje telesnih tečnosti koje ne sadrže ćelije prilikom pripreme virusne RNK. Uzorci koji sadrže ćelije, poput cerebrospinalne tečnosti, koštane srži, urina i većine briseva, treba najpre da se filtriraju ili centrifugiraju tokom 10 minuta na približno 1500 x g, pri čemu treba da se koristi supernatant.

Ako su RNK i DNK paralelno izolovane, eluat može da se razgradi pomoću dezoksiribonukleaze koja se ne sadrži ribonukleazu, nakon čega sledi toplotni tretman (15 minuta \pm 1 minut, $70\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$) da bi se deaktivirala dezoksiribonukleaza.

Zapremine uzoraka

Procedura sa kompletom QIAamp DSP Viral RNA je optimizovana za upotrebu sa uzorcima zapremine 140 μl . Manji uzorci pre ubacivanja treba da se prilagode na 140 μl korišćenjem fosfatom puferovanog fiziološkog rastvora (phosphate-buffered saline, PBS), dok uzorci sa niskim virusnim titrom treba da se koncentruju na 140 μl pre obrade. Pogledajte „Protokol: Koncentracija uzorka“ na strani 31.

Liziranje

Uzorak se prvo lizira u uslovima povećane denaturacije koji obezbeđuje Buffer AVL da bi se deaktivirale ribonukleaze i osigurala izolacija netaknute virusne RNK. RNK nosač koji se dodaje u Buffer AVL poboljšava vezivanje virusne RNK na membranu QIAamp, naročito u slučaju uzoraka sa niskim titrom i ograničava eventualnu degradaciju virusne RNK usled bilo kakve preostale aktivnosti ribonukleaze.

RNK nosač

RNK nosač ima dve namene. Kao prvo, poboljšava vezivanje virusnih nukleinskih kiselina za membranu spin kolonice QIAamp Mini, naročito ako u uzorku ima veoma malo ciljnih molekula. Kao drugo, dodavanje velike količine RNK nosača smanjuje verovatnoću degradacije virusne RNK u retkom slučaju kada molekuli ribonukleaze izbegnu denaturaciju haotropskim solima i deterdžentom u Buffer AVL. Ako se RNK nosač ne doda u Buffer AVL, to može da izazove umanjeni prinos virusne RNK.

Količina liofilizovanog RNK nosača je dovoljna za zapreminu Buffer AVL koji se dostavlja sa kompletom. Koncentracija RNK nosača je prilagođena tako da QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit može da se koristi kao opšti sistem za purifikaciju koji je kompatibilan sa brojnim i različitim sistemima za amplifikaciju i pogodan za široki spektar RNK virusa.

Različiti sistemi amplifikacije se razlikuju prema efikasnosti, što zavisi od ukupne količine nukleinske kiseline koja je prisutna pri reakciji. Eluati iz ovog kompleta sadrže virusne nukleinske kiseline i RNK nosač, a količina RNK nosača u velikoj meri premašuje količinu virusne nukleinske kiseline. Samim tim, proračun toga koliko eluata treba dodati u naknadne amplifikacije treba da se zasniva na dodatoj količini RNK nosača. Da bi se dobili najveći nivoi osetljivosti u reakcijama amplifikacije, možda će biti neophodno da se prilagodi količina RNK nosača koja je dodata u Buffer AVL.

Dodavanje internih kontrola

Kada se koriste protokoli QIAamp DSP Viral RNA Mini u kombinaciji sa komercijalno dostupnim sistemima amplifikacije, preporučuje se uvođenje interne kontrole u proceduru purifikacije kako bi se osigurali pouzdani rezultati testa. RNK ili DNK interne kontrole treba da se doda zajedno sa RNK nosačem u pufer za liziranje. Radi optimalne efikasnosti purifikacije, molekuli interne kontrole treba da su duži od 200 nukleotida, budući da manji molekuli ne omogućavaju efikasan prinos.

Pogledajte uputstva proizvođača da biste odredili optimalnu koncentraciju. Ako koristite koncentraciju koja se razlikuje od preporučene, moguće je smanjenje efikasnosti amplifikacije.

Procedura centrifugiranja i vakuumska procedura

Procedura purifikacije pomoću kompleta QIAamp DSP Viral RNA Mini se sprovodi u tri koraka pomoću QIAamp Mini spin kolonice u standardnoj mikrocentrifugi, na vakuum manifoldu ili na instrumentu QIAcube. Ove procedure su osmišljene tako da se osigura da ne postoji unakrsna kontaminacija između uzoraka i omogući bezbedno rukovanje potencijalno infektivnim uzorcima.

QIAamp Mini spin kolonice uklapaju se u većinu standardnih mikrocentrifugalnih epruveta. Prilikom protokola centrifugiranja, (dostavljene) epruvete za ispiranje (wash tubes, WT) od 2 ml neophodne su usled zapremine filtrata kao podrška za QIAamp Mini spin kolonicu prilikom koraka ubacivanja i ispiranja. Prilikom vakuumnog protokola, neophodni su vakuum manifold (QIAvac 24 Plus ili sličan proizvod; pogledajte stranu 15) i vakuumska pumpa koja proizvodi vakuum od –800 do –900 mbar (npr. vakuumska pumpa QIAGEN®).

Isprana RNK može da se prikupi u standardne (dostavljene) mikrocentrifugalne epruvete od 1,5 ml. Ove epruvete ne smeju da sadrže ribonukleazu kako bi se sprečilo da ribonukleaze degradiraju virusnu RNK.

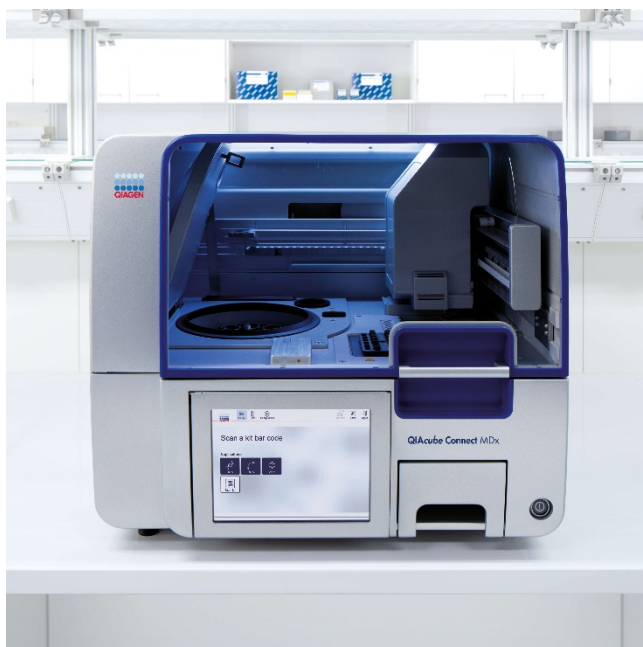
Automatizovana purifikacija virusne RNK na instrumentu QIAcube / QIAcube Connect MDx

Instrumenti QIAcube i QIAcube Connect MDx obavljaju automatizovanu izolaciju i purifikaciju nukleinskih kiselina. Oni mogu da obrade do 12 uzoraka odjednom.

Ako se obavlja automatizovana obrada pomoću kompleta QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit na instrumentu QIAcube ili QIAcube Connect MDx, instrument može da obradi manje od 50 uzoraka usled praznog prostora, isparavanja i dodatne potrošnje reagenasa usled automatskog pipetiranja. Kompanija QIAGEN garantuje pripremu 50 uzoraka pri ručnoj primeni kompleta QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit.



Slika 1. Instrument QIAcube.




Slika 2. Instrument QIAcube Connect MDx.

Sažetak i objašnjenje

QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit nudi metod za purifikaciju virusne RNK radi pouzdane primene pri tehnologijama amplifikacije. Virusna RNK može da se prečisti iz plazme (koja je tretirana antikoagulansima koji nisu heparin), seruma i drugih telesnih tečnosti koje ne sadrže ćelije.

Obezbeđeni materijal

Sadržaj kompleta

QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit			(50)
Kataloški br.			61904
Broj priprema			50†
QIAamp Mini Spin	QIAamp Mini Spin Columns with Wash Tubes (QIAamp Mini Spin Columns sa epruvetama za pranje)	COL	50
ET	Elution Tubes (1.5 ml) (epruvete za ispiranje (1,5 ml))	ELU TUBE	50
LT	Lysis Tubes (2 ml) (epruvete za liziranje (2 ml))	LYS TUBE	50
WT	Wash Tubes (2 ml) (epruvete za pranje (2 ml))	WASH TUBE	4 x 50
AVL	Buffer AVL*	VIR LYS BUF	31 ml
AW1	Buffer AW1* (koncentrat)	WASH BUF 1 CONC	19 ml
AW2	Buffer AW2† (koncentrat)	WASH BUF 2 CONC	13 ml
AVE	Buffer AVE‡	ELU BUF	3 x 2 ml
Carrier	Carrier RNA (poly A) (RNK nosač (poly A))	CAR RNA	310 µg
–	Uputstvo za upotrebu (priručnik)		1

* Sadrži haotropsku so. Nije kompatibilno sa sredstvima za dezinfekciju koja sadrže izbeljivač. Pogledajte stranu 17 za upozorenja i mere opreza.

† Sadrži natrijum azid kao konzervans.

‡ Ako se obavlja automatizovana obrada pomoću kompleta QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit na instrumentu QIAcube ili QIAcube Connect MDx, instrument može da obradi manje od 50 uzoraka usled praznog prostora, isparavanja i dodatne potrošnje reagenasa usled automatskog pipetiranja. Kompanija QIAGEN garantuje pripremu 50 uzoraka pri ručnoj primeni kompleta QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit.

Potreban materijal koji se ne isporučuje

Kada radite sa hemikalijama, uvek nosite odgovarajući laboratorijski mantil, rukavice za jednokratnu upotrebu i zaštitne naočare. Više informacija potražite u odgovarajućim tehničkim specifikacijama (Safety Data Sheet, SDS) dostupnim kod dobavljača proizvoda.

- Ethanol (96–100%) (etanol (96–100%))*
- 1.5 ml microcentrifuge tubes (mikrocentrifugalne epruvete od 1,5 ml)
- Sterilno, pipete koje ne sadrže ribonukleazu[†]
- Sterilni pipetni nastavci koji ne sadrže ribonukleazu (radi izbegavanja unakrsne kontaminacije, preporučujemo upotrebu pipetnih nastavaka sa barijerama od aerosola)
- Microcentrifuge (mikrocentrifuga)[†] (sa rotorom za epruvete od 1,5 ml i 2 ml)

Za vakuumske protokole

- QIAvac 24 Plus vakuum manifold (kat. br. 19413) ili ekvivalent
- VacConnectors (kat. br. 19407)
- Vacuum Regulator (kat. br. 19530) za jednostavno praćenje vakuumske pritiska i jednostavno otpuštanje vakuuma
- Vacuum Pump (kat. br. 84010 ili ekvivalentna pumpa koja proizvodi vakuum od –800 do –900 mbar)
- Opciono: VacValves (kat. br. 19408)
- Opciono: QIAvac Connecting System (kat. br. 19419)

* Nemojte da koristite denaturisani alkohol koji sadrži druge supstance poput metanola ili metiletilketona.

[†] Da bi se osiguralo da su uzorci ispravno obrađeni u okviru procedura pomoću kompleta QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit, preporučujemo da se instrumenti (npr. mikrocentrifuge) kalibrišu u skladu sa preporukama proizvođača.

Samo za automatizovanu proceduru

- Rotor Adapters, kat. br. 990394
- Rotor Adapter Holder, kat. br. 990392
- Sample Tubes CB (2 ml), kat. br. 990382 (cevčica za unos uzorka)
- Shaker Rack Plugs, kat. br. 9017854
- Reagent Bottles, 30 ml, kat. br. 990393
- Filter-Tips, 1000 μ l, kat. br. 990352

Upozorenja i mere opreza

Imajte u vidu da ćete možda morati da ozbiljne incidente koji su se desili u vezi sa uređajem prijavite proizvođaču i regulatornim telima koja su na snazi u zemlji u kojoj se nalazi korisnik i/ili pacijent.

Informacije o bezbednosti

Za korišćenje u in vitro dijagnostici

Kada radite sa hemikalijama, uvek nosite odgovarajući laboratorijski mantil, rukavice za jednokratnu upotrebu i zaštitne naočare. Više informacija potražite u odgovarajućim listovima sa bezbednosnim podacima (Safety Data Sheet, SDS). Dostupni su na mreži u praktičnom i kompaktnom PDF formatu na adresi www.qiagen.com/safety, na kojoj možete da pronađete, pogledate i odštampate tehničke specifikacije za svaki QIAGEN komplet i komponentu kompleta.

RNK je izuzetno osetljiva na ribonukleaze i uvek se treba pripremiti sa dužnom pažnjom. Na šakama i česticama prašine mogu se naći bakterije i buđi koje predstavljaju najčešći uzrok kontaminacije ribonukleazom. Pročitajte odeljak „Rukovanje RNK“ u okviru Dodatak (strana 42) ovog priručnika pre početka rada.

Prilikom PCR testiranja uvek treba primeniti dobre laboratorijske prakse. Shodno tome, u laboratoriji za PCR testiranje uvek treba da se izdvoje tri područja: područje za pripremu reagenasa, područje za pripremu uzoraka i područje za amplifikaciju i detekciju. Usled visoke osetljivosti PCR testiranja, apsolutno je neophodno da svi reagensi ostanu čisti i nekontaminirani i neophodno je da se prate pažljivo i redovno. Kontaminirani reagensi moraju da se odlože u otpad.



OPREZ: NEMOJTE da dodajete izbeljivač ili kisele rastvore direktno u Buffer AVL ili Buffer AW1.

Buffer AVL i Buffer AW1 sadrže soli gvanidina koje mogu da formiraju veoma reaktivna jedinjenja sa izbeljivačem. Ako se prospe tečnost koja sadrži ove puferne, očistite je adekvatnim laboratorijskim deterdžentom i vodom. Ako prosuta tečnost sadrži potencijalno infektivne agense, prvo očistite zahvaćeno područje laboratorijskim deterdžentom i vodom, a zatim natrijum hipohloritom od 1% (v/v).

Ako su bočice sa puferom oštećene ili cure, nosite rukavice i zaštitne naočare dok odlažete bočice u otpad da biste izbegli telesne povrede ili povrede drugih lica.

Kompanija QIAGEN nije testirala tečni otpad koji nastaje pri korišćenju kompleta QIAamp DSP Viral RNA Mini na preostale infektivne materijale. Kontaminacija tečnog otpada preostalim infektivnim materijalima je veoma malo verovatna, ali ne može da se isključi u potpunosti. Dakle, tečni otpad mora da se smatra infektivnim, tako da njime treba rukovati i odložiti ga u otpad u skladu sa lokalnim bezbednosnim propisima.

Sledeće izjave o opasnostima i merama opreza se odnose na komponente kompleta QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit:

Buffer AVL



Sadrži: gvanidin tiocijanat. Opasnost! Škodljivo u kontaktu sa kožom ili ako se udahne. Može biti škodljivo ako se proguta. Uzrokuje ozbiljne opekotine na koži i oštećenje očiju. Štetno po vodene organizme sa dugoročnim posledicama. Kontakt sa kiselinama oslobađa veoma toksičan gas. Odložite sadržaj/kontejner na odobreno mesto za odlaganje otpada. AKO UĐE U OČI: Pažljivo ispirajte vodom nekoliko minuta. Uklonite sočiva ako ih nosite i nastavite sa ispiranjem. Skinite kontaminiranu odeću i operite je pre sledeće upotrebe. AKO SE NAĐE NA KOŽI (ili kosi): Odmah uklonite/skinite svu kontaminiranu odeću. Kožu isperite vodom/istuširajte se. Odmah pozovite lekara ili CENTAR ZA TROVANJE. Čuvajte zaključano. Nosite zaštitne rukavice/zaštitnu odeću/zaštitu za oči i zaštitu za lice.

Buffer AW1



Sadrži: gvanidin hidrohlorid. Upozorenje! Štetno ako se proguta ili udahne. Dovodi do iritacije kože. Dovodi do ozbiljne iritacije kože. Pozovite CENTAR ZA TROVANJE ili lekara ako se ne osećate dobro. Odložite sadržaj/kontejner na odobreno mesto za odlaganje otpada. Skinite kontaminiranu odeću i operite je pre sledeće upotrebe. Nosite zaštitne rukavice/zaštitnu odeću/zaštitu za oči i zaštitu za lice.

Čuvanje reagenasa i rukovanje njima

QIAamp Mini spin kolonice treba da se čuvaju na suvom mestu na temperaturi u opsegu 2–8 °C; čuvanje pri višim temperaturama treba da se izbegne. Svi rastvori treba da se čuvaju na sobnoj temperaturi (15–25 °C), sem ako je drugačije naznačeno. QIAamp Mini spin kolonice i svi pufferi i reagensi mogu da se čuvaju u ovim uslovima do isteka roka upotrebe koji je naznačen na kutiji kompleta, a da ne dođe do pada učinka.

Liofilizovani RNK nosač može da se čuva na sobnoj temperaturi do isteka roka upotrebe koji je naznačen na kutiji kompleta. RNK nosač treba da se rastvori pomoću Buffer AVE; kod ručne procedure, rastvoreni RNK nosač treba da se odmah doda u Buffer AVL, kao što je opisano na strani 22. Ovaj rastvor treba da se pripremi svež i stabilan je na temperaturi 2–8 °C do 48 sati. U rastvoru Buffer AVL i RNK nosača se stvara talog prilikom čuvanja na temperaturi 2–8 °C, koji mora da se rastvori zagrevanjem na temperaturi 80 °C ± 3 °C pre upotrebe. Neiskorišćeni RNK nosač koji je rastvoren u Buffer AVE treba da se zamrzne u alikvotima pri –30 do –15 °C. Nemojte da zamrzavate i odmrzavate alikvote RNK nosača više od 3 puta.

NEMOJTE da zagrevate rastvor Buffer AVL i RNK nosača više od 6 puta. **NEMOJTE** da inkubirate pri 80 °C više od 5 minuta. Često zagrevanje i produžena inkubacija prouzrokuje degradaciju RNK nosača, što može dovesti do smanjenog prinosa virusne RNK, a nakon toga i do lažno negativnih rezultata RT-PCR testa, naročito kada se koriste uzorci sa niskim titrom.

Čuvanje uzoraka i rukovanje njima

Nakon prikupljanja i centrifugiranja, plazma (bilo netretirana ili tretirana antikoagulansima koji nisu heparin) ili serum mogu da se čuvaju na temperaturi u opsegu 2–8 °C do 6 sati. Zamrzavanje na temperaturi od –80 do –20 °C u alikvotima se preporučuje kod dugoročnog čuvanja. Zamrznuti uzorci plazme ili seruma smeju da se odmrznu samo jednom. Više ciklusa zamrzavanja i otapanja prouzrokuje denaturaciju i taloženje proteina, što dovodi do smanjenja vitalnih titara i kasnije i do smanjenja prinosa izolovane virusne RNK.

Osim toga, krioprecipitati koji se formiraju prilikom zamrzavanja i otpadanja izazivaju začepljenje membrane QIAamp. Ako su krioprecipitati vidljivi, mogu da se pretvore u kuglice kratkim centrifugiranjem na približno 6800 x g tokom 3 minuta ± 30 sekundi. Prečišćeni supernatant treba da se ukloni tako da se ne zahvati kuglica i da se odmah obradi.

Procedura

Važne napomene pre početka

- Kada primite ovaj komplet, proverite da li su njegove komponente oštećene. Ako su blister pakovanja ili bočice pufera oštećeni, obratite se tehničkoj službi kompanije QIAGEN ili lokalnom dobavljaču. U slučaju prosipanja tečnosti, pogledajte odeljak „Upozorenja i mere opreza“ (strana 17). Nemojte da koristite oštećene komponente kompleta, budući da njihova upotreba može da prouzrokuje loš učinak kompleta.
- Uvek koristite opremu koja ne sadrži ribonukleazu.
- Uvek zamenite pipetne nastavke između prenosa tečnosti. Da biste maksimalno umanjili mogućnost unakrsne kontaminacije, preporučujemo da koristite pipetne nastavke sa aerosolnom barijerom.
- Svi koraci centrifugiranja se sprovode na sobnoj temperaturi (15–25 °C).
- Uvek koristite rukavice za jednokratnu upotrebu i redovno proveravajte da li su kontaminirane materijalom uzorka. Odložite rukavice u otpad ako se kontaminiraju.
- Da biste maksimalno umanjili mogućnost unakrsne kontaminacije, otvarajte samo po jednu epruvetu odjednom.
- Nemojte da koristite komponente iz drugih kompleta sa kompletima koje trenutno koristite, sem ako se brojevi serije podudaraju.
- Izbegavajte mikrobnu kontaminaciju reagenasa u kompletu.
- Da biste osigurali maksimalnu bezbednost pri korišćenju potencijalno infektivnog materijala, preporučujemo da radite pod laminarnim tokom vazduha sve dok se uzorci ne rastvore.
- Kada je reč o automatizaciji, sledite uputstva iz listova protokola (QIAcube) ili na softverskom ekranu (QIAcube Connect MDx) i pogledajte odgovarajuće korisničke priručnike (za QIAcube i QIAcube Connect MDx).
- Ovaj komplet sme da koristi samo osoblje koje je obučeno za in vitro dijagnostičke laboratorijske prakse.

Važne napomene

Izdvojite vremena da pažljivo pročitate ovaj priručnik pre početka pripreme. Naročito su značajni komentari u okviru protokola QIAamp DSP Viral RNA Mini počev od strane 31.

Ako po prvi put pripremate RNK, pročitate odeljak „Rukovanje RNK“ u okviru Dodatak ovog priručnika (strana 42). Svi koraci u okviru QIAamp DSP Viral RNA Mini protokola treba da se sprovedu brzo i pri sobnoj temperaturi. Procedura pomoću kompleta QIAamp DSP Viral RNA Mini nije osmišljena tako da odvaja RNK od DNK. Da bi se izbegla kontaminacija ćelijskom DNK, sledite smernice koje navodi „Kontaminacija ćelijskom DNK“ na strani 8 ovog priručnika. Procedura pomoću kompleta QIAamp DSP Viral RNA Mini izoluje sve RNK molekule veće od 200 nukleotida. Manji RNK molekuli se ne vezuju kvantitativno u korišćenim okolnostima.

Priprema reagenasa i pufera

- Dodavanje RNK nosača u Buffer AVL* (samo kod ručne procedure)

Dodajte 310 µl Buffer AVE u epruvetu sa 310 µg liofilizovanog RNK nosača da biste dobili rastvor od 1 µg/µl. Temeljno rastvorite RNK nosač, razdelite ga u alikvote pogodne veličine i čuvajte na temperaturi od –25 do –15 °C. Nemojte da zamrzavate i odmrzavate alikvote RNK nosača više od 3 puta.

- Proverite da li se u Buffer AVL pojavio talog i po potrebi inkubirajte ponovo na 80 °C ± 3 °C dok ne rastvorite talog. Izračunajte zapreminu rastvora Buffer AVL i RNK nosača koja je potrebna po seriji uzoraka tako što ćete izabrati broj uzoraka koji će se istovremeno obraditi u Tabeli 1 (strana 24).

* Sadrži haotropsku so. Preduzmite adekvatne laboratorijske bezbednosne mere i nosite rukavice prilikom rukovanja. Nije kompatibilno sa sredstvima za dezinfekciju koja sadrže izbeljivač. Pogledajte stranu 17 za informacije o bezbednosti.

Kada je reč o većem broju uzoraka, zapremine mogu da se izračunaju pomoću sledeće formule za izračunavanje broja uzoraka:

$$n \times 0,56 \text{ ml} = y \text{ ml}$$

$$y \text{ ml} \times 10 \text{ } \mu\text{l/ml} = z$$

gde je: n = broj uzoraka koji treba da se obradi istovremeno

y = izračunata zapremina Buffer AVL

z = zapremina rastvora RNK nosača i Buffer AVE koja treba da se doda u Buffer AVL

Lagano mešajte okretanjem epruvete 10 puta. Nemojte da stavljate na vortex mešalicu da biste sprečili pojavu pene.

Napomena: Procedura pripreme uzorka je optimizovana za 5,6 μg RNK nosača po uzorku. Ako se pokazalo da je manja količina RNK nosača bolja za vaš sistem za amplifikaciju, prenesite samo potrebnu količinu RNK nosača u epruvete koje sadrže Buffer AVL. (Korišćenje manje od 5,6 μg RNK nosača po uzorku mora da se potvrdi kod svakog konkretnog tipa uzorka i naknadnog ispitivanja.)

Rastvor Buffer AVL i RNK nosača treba da se pripremi svež, a stabilan je na temperaturi u opsegu 2–8 °C do 48 sati. U ovom rastvoru se razvija talog kada se čuva na temperaturi u opsegu 2–8 °C, koji mora da se rastvori zagrevanjem na 80 °C \pm 3 °C pre upotrebe. Nemojte da zagrevate rastvor Buffer AVL i RNK nosača više od 6 puta. Nemojte da inkubirate na temperaturi 80 °C \pm 3 °C duže od 5 minuta. Često zagrevanje i produžena inkubacija dovodi do degradacije RNK nosača, što prouzrokuje smanjenje prinosa virusne RNK, a kasnije i lažno negativne rezultate RT-PCR testa. Ovo je naročito slučaj kod uzoraka sa niskim titrom.

Kada je reč o automatizovanoj proceduri, instrumentu QIAcube / QIAcube connect MDx obavlja pripremu mešavine Buffer AVL i RNK nosača.

Tabela 1. Zapremina mešavine Buffer AVL i RNK nosača sa Buffer AVE koja je potrebna za određeni broj uzoraka u okviru procedure pomoću kompleta QIAamp DSP Viral RNA Mini

Br. uzoraka	Zapremina Buffer AVL (ml)	Zapremina RNK nosača i AVE (μl)	Br. uzoraka	Zapremina Buffer AVL (ml)	Zapremina RNK nosača i AVE (μl)
1	0,56	5,6	13	7,28	72,8
2	1,12	11,2	14	7,84	78,4
3	1,68	16,8	15	8,40	84,0
4	2,24	22,4	16	8,96	89,6
5	2,80	28,0	17	9,52	95,2
6	3,36	33,6	18	10,08	100,8
7	3,92	39,2	19	10,64	106,4
8	4,48	44,8	20	11,20	112,0
9	5,04	50,4	21	11,76	117,6
10	5,60	56,0	22	12,32	123,2
11	6,16	61,6	23	12,88	128,8
12	6,72	67,2	24	13,44	134,4

Buffer AW1*

Buffer AW1 se dostavlja kao koncentrat. Pre prvog korišćenja, dodajte odgovarajuću količinu etanola (96–100%), kao što je naznačeno na bočici i u Tabeli 2. Buffer AW1 je stabilan 6 meseci kada se čuva zatvoren na sobnoj temperaturi, ali samo do isteka roka upotrebe kompleta.

Tabela 2. Priprema Buffer AW1

Kat. br. kompleta	Br. priprema	AW1 koncentrat	Etanol	Konačna zapremina
61904	50	19 ml	25 ml	44 ml

Buffer AW2†

Buffer AW2 se dostavlja kao koncentrat. Pre prvog korišćenja dodajte odgovarajuću količinu etanola (96–100%) u koncentrat Buffer AW2 kao što je naznačeno na bočici i u Tabeli 3.

Buffer AW2 je stabilan 6 meseci kada se čuva zatvoren na sobnoj temperaturi, ali samo do isteka roka upotrebe kompleta.

Tabela 3. Priprema Buffer AW2

Kat. br. kompleta	Br. priprema	AW2 koncentrat	Etanol	Konačna zapremina
61904	50	13 ml	30 ml	43 ml

* Sadrži haotropsku so. Preduzmite adekvatne laboratorijske bezbednosne mere i nosite rukavice prilikom rukovanja. Nije kompatibilno sa sredstvima za dezinfekciju koja sadrže izbeljivač. Pogledajte stranu 17 za informacije o bezbednosti.

† Sadrži natrijum azid kao konzervans.

Rukovanje QIAamp Mini spin kolonicama

Usled osetljivosti tehnologija amplifikacije nukleinske kiseline, sledeće mere opreza su neophodne pri rukovanju QIAamp Mini spin kolonicama da bi se izbegla unakrsna kontaminacija između priprema uzoraka:

- Pažljivo nanesite uzorak ili rastvor na QIAamp Mini spin kolonicu. Pipetirajte uzorak na QIAamp Mini spin kolonicu ali tako da ne pokvasite obod kolonice.
- Uvek zamenite pipetne nastavke između prenosa tečnosti. Preporučujemo da koristite pipetne nastavke sa aerosolnom barijerom.
- Izbegavajte kontakt pipetnog nastavka sa membranom QIAamp Mini spin kolonice.
- Nakon svih koraka koji se izvode na impulsnoj vortex mešalici, kratko centrifugirajte mikrocentrifugalne epruvete da biste uklonili kapi sa unutrašnje strane poklopaca.
- Otvarajte jednu po jednu QIAamp Mini spin kolonicu i vodite računa da sprečite stvaranje aerosola.
- Nosite rukavice tokom cele procedure. Odmah zamenite rukavice u slučaju kontakta između rukavica i uzorka.

Vakuumski protokol na QIAvac

QIAvac 24 Plus je osmišljen za brzu i efikasnu obradu pomoću vakuuma do 24 QIAGEN spin kolonice istovremeno. Uzorci i rastvori za pranje se uvlače kroz membrane kolonice preko vakuuma, umesto preko centrifugiranja, što pruža veću brzinu i smanjeno vreme rada prilikom procedura purifikacije.

QIAvac 24 Plus može da se koristi kao protočni sistem u kombinaciji sa QIAvac Connecting System (opciono). Protok uzoraka se prikuplja u posebnoj boci za otpad.

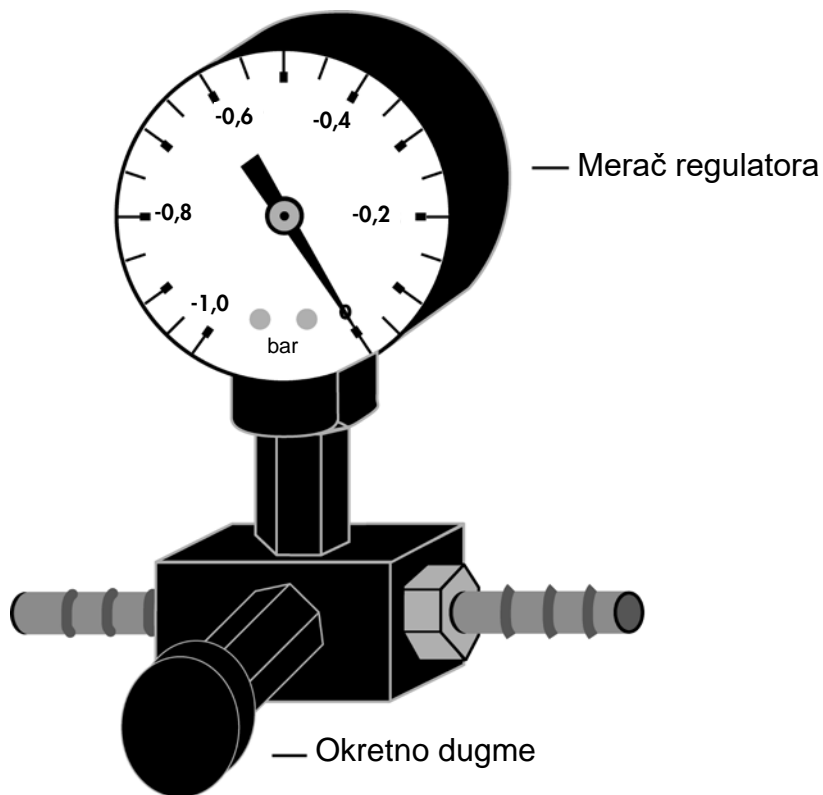
Za održavanje instrumenta QIAvac 24 Plus, pogledajte smernice za rukovanje koje navodi *Priručnik za QIAvac 24 Plus*.

Smernice za QIAvac 24 Plus

- Uvek postavite QIAvac 24 Plus na stabilnu radnu površinu. Ako ispustite QIAvac 24 Plus, moguća je naprslina njegovog manifolda.
- Uvek čuvajte QIAvac 24 Plus na čistom i suvom mestu. Za procedure čišćenja pogledajte *Priručnik za QIAvac 24 Plus*.
- Komponente u sastavu instrumenta QIAvac 24 Plus nisu otporne na određene rastvarače (Tabela 4). Ako se ovi rastvarači prosu po jedinici, temeljno ih isperite vodom.
- Da biste osigurali dosledan učinak, nemojte da nanosite silikonsko mazivo ili vakuum-mast na bilo koji deo QIAvac 24 Plus priključka.
- Uvek budite oprezni i nosite sigurnosne naočare prilikom rada u blizini vakuum manifolda pod pritiskom.
- Obratite se tehničkoj službi kompanije QIAGEN ili lokalnom dobavljaču za informacije o rezervnim ili zamenskim delovima.
- Pritisak vakuuma je diferencijal pritiska između unutrašnjosti vakuum manifolda i atmosfere (standardni atmosferski pritisak iznosi 1013 milibara ili 760 mm Hg) i može da se izmeri pomoću QIAvac Connecting System ili vakuumskog regulatora (pogledajte Sliku 3, strana 28). Za vakuumski protokol potrebna je vakuumska pumpa koja proizvodi vakuum od –800 do –900 mbar (npr. QIAGEN Vacuum Pump). Morate da izbegnete viši pritisak vakuuma. Ako koristite pritisak vakuuma koji je niži od preporučenog, moguće je smanjenje prinosa i čistoće DNK i učestalije začepljenje membrana.

Tabela 4. Karakteristike otpornosti na hemikalije manifolda QIAvac 24 Plus

Otporan na:		Nije otporan na:
Sirćetna kiselina	Haotropske soli	Benzen
Hromna kiselina	Koncentrovani alkoholi	Fenol
Natrijum dodecil sulfat	Natrijum hlorid	Hloroform
Tween® 20	Urea	Toluen
Izbeljivač na bazi hlora	Hidrohlorna kiselina	Etri
Natrijum hidroksid		



Slika 3. Šematski prikaz Vacuum Regulator.

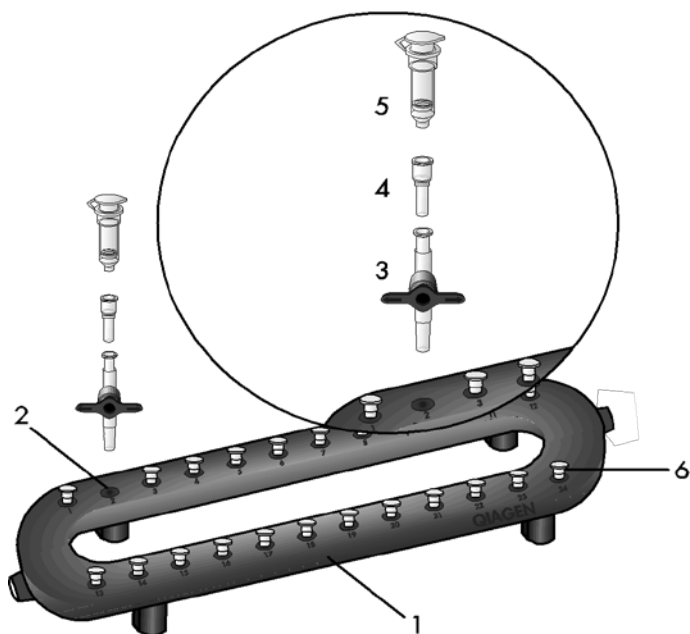
Podešavanje za QIAvac 24 Plus vakuum manifold

1. Povežite QIAvac 24 Plus sa izvorom vakuuma. Ako koristite QIAvac Connecting System, povežite sistem sa manifoldom i izvorom vakuuma kao što je opisano u Dodatku A *Priručnika za QIAvac 24 Plus*.
2. Preporučeno: Umetnite VacValve u svaki luer priključak na QIAvac 24 Plus koji je predviđen za korišćenje (pogledajte Sliku 4, strana 30).
Ventili VacValve treba da se koriste ako se brzina protoka uzoraka u velikoj meri razlikuje kako bi se održao ujednačen vakuum.
3. Umetnite VacConnector u svaki VacValve (pogledajte Sliku 4) ili direktno u svaki luer priključak na QIAvac 24 Plus koji je predviđen za korišćenje. Zatvorite nekorišćene luer priključke koristeći luer poklopce ili zatvorite umetnuti VacValve. Obavite ovaj korak neposredno pre početka purifikacije da biste sprečili izlaganje priključaka VacConnector potencijalnim kontaminantima.
4. Postavite QIAamp Mini spin kolonice u priključke VacConnector na manifoldu (pogledajte Sliku 4).
5. Sledite uputstva u vakuumskom protokolu za purifikaciju. Odložite priključke VacConnector u otpad nakon upotrebe na pravilan način.
Neka poklopac QIAamp Mini spin kolonice ostane otvoren dok primenjujete vakuum. Isključite vakuum između koraka da biste se uverili da se tokom obrade primenjuje ujednačen i ravnomeran vakuum. Za brže otpuštanje vakuuma treba da koristite regulator vakuuma (pogledajte Sliku 3, strana 28).

Napomena: Svaki VacValve može zasebno da se zatvori kada se uzorak u potpunosti uvuče kroz spin kolonicu, čime se omogućava istovremena obrada uzoraka različitih zapremina ili viskoziteta.

6. Nakon obrade uzoraka očistite QIAvac 24 Plus (pogledajte „Čišćenje i dekontaminacija QIAvac 24 Plus“ u *Priručniku za QIAvac 24 Plus*).

Napomena: Buffer AVL i Buffer AW1 koji se koriste pri proceduri pomoću kompleta QIAamp DSP Viral RNA Mini nisu kompatibilni sa sredstvima za dezinfekciju koja sadrže izbeljivač. Pogledajte stranu 17 za informacije o bezbednosti.



Slika 4. Podešavanje QIAvac 24 Plus sa QIAamp Mini spin kolonicama korišćenjem ventila VacValve i priključaka VacConnector.

1. QIAvac 24 Plus vakuum manifold
2. Luer priključak u QIAvac 24 Plus
3. VacValve (opciono)*

4. VacConnector*
5. QIAamp Mini spin kolonica
6. Luer priključak je zatvoren pomoću luer poklopca

* Mora da se nabavi zasebno.

Centrifugiranje

Centrifugiranje QIAamp Mini spin kolonica se sprovodi na približno 6000 x g kako bi se umanjila buka od centrifuge. Centrifugiranje pri najvećoj brzini ne poboljšava prinos RNK. Takođe je prihvatljivo centrifugiranje pri nižoj brzini za ubacivanje lizata i prvi korak pranja, pod uslovom da se kompletni rastvor prenese kroz membranu. Kod drugog koraka pranja se preporučuje centrifugiranje pri najvećoj brzini.

Svi koraci centrifugiranja treba da se sprovedu na sobnoj temperaturi.

Protokol: Koncentracija uzorka

Plazma, serum, urin, cerebrospinalna tečnost, koštana srž i druge telesne tečnosti često imaju veoma nisku vrednost virusnih titara. U tim slučajevima, preporučuje se koncentrovanje uzoraka do 3,5 ml na konačnu zapreminu od 140 μ l.

Važna napomena pre početka

- Koristite centrifugalne mikrokoncentratore poput Microsep 100 (Filtron: 3,5 ml, kat. br. OD100C40), Ultrafree[®]-CL (Millipore: 2 ml, kat. br. UFC4 THK 25) ili ekvivalentu opremu drugih dobavljača.

Procedura

1. Primenite do 3,5 ml uzorka u mikrokoncentrator u skladu sa uputstvima proizvođača.
2. Centrifugirajte u skladu sa uputstvima proizvođača do konačne zapremine od 140 μ l. Možda će biti otežano koncentrovanje pojedinih uzoraka do 140 μ l usled visokog viskoziteta, a naročito plazme. Možda će biti neophodno centrifugiranje do 6 sati.
3. Pipetirajte 140 μ l koncentrovanog uzorka u 1,5 ml mikrocentrifugalnu epruvetu i sledite QIAamp DSP Viral RNA protokol spina na strani 32.

Protokol: Purifikacija virusne RNK korišćenjem mikrocentrifuge ili instrumenta QIAcube / QIAcube Connect MDx

Za purifikaciju virusne RNK iz 140 µl plazme, seruma, urina, medijuma ćelijske kulture ili telesnih tečnosti koje ne sadrže ćelije pomoću mikrocentrifuge ili u okviru automatizovane procedure na instrumentu QIAcube ili QIAcube Connect MDx. Veće početne zapremine do 560 µl (u više koraka od po 140 µl) mogu da se obrade proporcionalnim povećavanjem početnih zapremina i ubacivanjem QIAamp Mini spin kolonice više puta, kao što je opisano u protokolu u nastavku. Neki uzorci sa veoma niskim virusnim titrima treba da se koncentruju pre procedure purifikacije; pogledajte odeljak „Protokol: Koncentracija uzorka“ (strana 31).

Važne napomene pre početka

- Pročitajte odeljak „Procedura“ (strane 21–28) pre pokretanja ovog protokola.
- Svi koraci centrifugiranja se sprovode na sobnoj temperaturi (15–25 °C).
- Automatizovana obrada 2–10 ili 12 uzoraka može da se sprovede na instrumentu QIAcube / QIAcube Connect MDx.
- Kada je reč o automatizaciji, sledite uputstva iz listova protokola (QIAcube) ili na softverskom ekranu (QIAcube Connect MDx) i pogledajte odgovarajuće korisničke priručnike (za QIAcube i QIAcube Connect MDx).

Šta je potrebno uraditi pre početka procedure

- Kalibrišite uzorke na sobnu temperaturu.
- Kalibrišite Buffer AVE na sobnu temperaturu za izdvajanje u 11. koraku.
- Proverite da li su Buffer AW1 i Buffer AW2 pripremljeni u skladu sa uputstvima na strani 25.
- Samo ručna procedura: dodajte RNK nosač koji je rekonstituisan pomoću Buffer AVE u Buffer AVL, u skladu sa uputstvima na strani 22.

Procedura

- Kada je reč o ručnoj proceduri pomoću mikrocentrifuge, sledite korake 1–11.
- Ova procedura može da se automatizuje u dve različite verzije:
 - Standardno: potpuno automatizacija pomoću 140 µl uzorka (počev od 1. koraka)
 - Ručno liziranje: delimično automatizovano uz ručno liziranje van instrumenta (počinje od 4. koraka)
- 1. Pipetirajte 560 µl pripremljenog Buffer AVL sa RNK nosačem u epruvetu za liziranje (Lysis Tube, LT).

Ako je zapremina uzorka veća od 140 µl, proporcionalno povećajte količinu rastvora Buffer AVL i RNK nosača (npr. uzorak od 280 µl zahteva 1120 µl rastvora Buffer AVL i RNK nosača) i koristite veću epruvetu.

- 2. Dodajte 140 µl plazme, seruma, urina, supernatanta ćelijske kulture ili telesne tečnosti koja ne sadrži ćelije u rastvor Buffer AVL i RNK nosača u epruveti za liziranje (Lysis Tube, LT). Promešajte na impulsnoj vortex mešalici tokom 15 s.

Da biste osigurali efikasno liziranje, neophodno je da se uzorak temeljno promeša pomoću Buffer AVL kako bi se dobio homogeni rastvor. Mogu da se koriste zamrznuti uzorci koji su samo jednom otopljeni.

- 3. Inkubirajte na sobnoj temperaturi tokom 10 min. ± 1 min.

Liziranje virusnih čestica je dovršeno nakon liziranja tokom 10 min. na sobnoj temperaturi.

- 4. Na kratko centrifugirajte epruvetu za liziranje (Lysis Tube, LT) da biste uklonili kapi sa unutrašnjosti poklopca.

Napomena: Ako je ručno liziranje (koraci 1–4) sprovedeno van instrumenta, možete da automatizujete sledeće korake (koraci 5–11) na instrumentu QIAcube ili QIAcube Connect MDx tako što ćete slediti uputstva (na ekranu) za protokol ručnog liziranja.

- 5. Dodajte 560 µl etanola (96–100%) u uzorak i promešajte na impulsnoj vortex mešalici tokom ≥15 s. Nakon mešanja na kratko centrifugirajte epruvetu da biste uklonili kapi sa unutrašnje strane poklopca.

Treba da koristite isključivo etanol jer ostali alkoholi mogu da izazovu umanjene prinose i čistoću RNK. Nemojte da koristite denaturisani alkohol koji sadrži druge supstance poput metanola ili metiletilketona. Ako je zapremina uzorka veća od 140 µl, proporcionalno povećajte količinu etanola (npr. uzorak od 280 µl iziskuje 1120 µl etanola).

Da biste osigurali efikasno vezivanje, neophodno je da se uzorak temeljno promeša sa etanolom kako bi se dobio homogeni rastvor.

6. Pažljivo nanosite 630 μ l rastvora iz 5. koraka na QIAamp Mini spin kolonicu (u epruveti za pranje (Wash Tube, WT)), ali tako da ne pokvasite obod. Zatvorite poklopac i centrifugirajte na približno 6000 x g tokom ≥ 1 min. Postavite QIAamp Mini spin kolonicu u čistu epruvetu za pranje (wash tube, WT) od 2 ml i odložite u otpad epruvetu za pranje koja sadrži filtrat. Zatvorite svaku spin kolonicu da biste izbegli unakrsnu kontaminaciju tokom centrifugiranja. Centrifugiranje se obavlja brzinom od približno 6000 x g da bi se izbegla buka od mikrocentrifuge. Centrifugiranje pri najvećoj brzini ne utiče na prinos niti na čistoću virusne RNK. Ako rastvor nije u potpunosti prošao kroz membranu, ponovo centrifugirajte većom brzinom sve dok sav rastvor ne prođe kroz membranu.
7. Pažljivo otvorite QIAamp Mini spin kolonicu i ponovite 6. korak. Ponavljajte ovaj korak sve dok ne ubacite sav lizat u spin kolonicu.
8. Pažljivo otvorite QIAamp Mini spin kolonicu i dodajte 500 μ l Buffer AW1. Zatvorite poklopac i centrifugirajte na približno 6000 x g tokom ≥ 1 min. Postavite QIAamp Mini spin kolonicu u čistu epruvetu za pranje (Wash Tube, WT) od 2 ml i odložite u otpad epruvetu za pranje koja sadrži filtrat. Nije neophodno da povećavate zapreminu Buffer AW1 čak iako je prvobitna zapremina uzorka bila veća od 140 μ l.
9. Pažljivo otvorite QIAamp Mini spin kolonicu i dodajte 500 μ l Buffer AW2. Zatvorite kapicu i centrifugirajte pri najvećoj brzini (približno 20.000 x g) tokom 3 min. ± 30 s.
10. Postavite QIAamp Mini spin kolonicu u novu epruvetu za pranje (wash tube, WT) od 2 ml i odložite u otpad epruvetu za pranje koja sadrži filtrat. Centrifugirajte pri najvećoj brzini tokom 1 min.
11. Postavite QIAamp Mini spin kolonicu u čistu epruvetu za ispiranje (Elution Tube, ET). Odložite u otpad epruvetu za pranje koja sadrži filtrat. Pažljivo otvorite QIAamp Mini spin kolonicu i dodajte 60 μ l Buffer AVE koji je kalibrisan na sobnu temperaturu. Zatvorite poklopac i inkubirajte na sobnoj temperaturi tokom ≥ 1 min. Centrifugirajte na približno 6000 x g tokom ≥ 1 min.

Važna napomena: Kada je reč o svim automatizovanim procedurama, uklonite eluate iz instrumenta odmah nakon završetka ciklusa i ispravno ih uskladištite.

Protokol: Purifikacija virusne RNK (vakuumski protokol)

Ovaj protokol je namenjen za purifikaciju RNK iz 140 µl plazme, seruma, urina, medijuma ćelijske kulture ili telesnih tečnosti koje ne sadrže ćelije pomoću QIAvac 24 Plus vakuum manifolda ili sličnog vakuum manifolda. Veće početne zapremine do 560 µl (u više koraka od po 140 µl) mogu da se obrade proporcionalnim povećavanjem početnih zapremina i ubacivanjem QIAamp Mini spin kolonice više puta, kao što je opisano u protokolu u nastavku. Neki uzorci sa veoma niskim virusnim titrima treba da se koncentruju pre procedure purifikacije; pogledajte odeljak „Protokol: Koncentracija uzorka“ (strana 31).

Važne napomene pre početka

- Pročitajte odeljak „Procedura“ (strane 21–28) pre pokretanja ovog protokola.
- Svi koraci centrifugiranja se sprovode na sobnoj temperaturi (15–25 °C).

Šta je potrebno uraditi pre početka procedure

- Kalibrišite uzorke na sobnu temperaturu.
- Kalibrišite Buffer AVE na sobnu temperaturu za izdvajanje u 14. koraku.
- Proverite da li su Buffer AW1 i Buffer AW2 pripremljeni u skladu sa uputstvima na strani 25.
- Dodajte RNK nosač koji je rekonstituisan pomoću Buffer AVE u Buffer AVL, u skladu sa uputstvima na strani 22.
- Za obradu korišćenjem priključaka VacConnector i ventila VacValve, podesite QIAvac 24 Plus kako je opisano na strani 29.

Procedura

1. Pipetirajte 560 µl pripremljenog Buffer AVL sa RNK nosačem u epruvetu za liziranje (Lysis Tube, LT).

Ako je zapremina uzorka veća od 140 µl, proporcionalno povećajte količinu rastvora Buffer AVL i RNK nosača (npr. uzorak od 280 µl zahteva 1120 µl rastvora Buffer AVL i RNK nosača) i koristite veću epruvetu.

2. Dodajte 140 µl plazme, seruma, urina, supernatanta ćelijske kulture ili telesne tečnosti koja ne sadrži ćelije u rastvor Buffer AVL i RNK nosača u epruvetu za liziranje (Lysis Tube, LT). Promešajte na impulsnoj vortex mešalici tokom ≥ 15 s.

Da biste osigurali efikasno liziranje, neophodno je da se uzorak temeljno promeša pomoću Buffer AVL kako bi se dobio homogeni rastvor. Mogu da se koriste zamrznuti uzorci koji su samo jednom otopljeni.

3. Inkubirajte na sobnoj temperaturi tokom 10 min. \pm 1 min.

Liziranje virusnih čestica je dovršeno nakon liziranja tokom 10 min. \pm 1 min. na sobnoj temperaturi.

4. Na kratko centrifugirajte epruvetu da biste uklonili kapi sa unutrašnje strane poklopca.

5. Dodajte 560 µl etanola (96–100%) u uzorak i promešajte na impulsnoj vortex mešalici tokom ≥ 15 s. Nakon mešanja na kratko centrifugirajte epruvetu da biste uklonili kapi sa unutrašnje strane poklopca. Ubacite QIAamp Mini spin kolonicu u VacConnector na QIAvac 24 Plus vakuum manifold.

Treba da koristite isključivo etanol jer ostali alkoholi mogu da izazovu umanjeni prinos i čistoću RNK. Nemojte da koristite denaturisani alkohol koji sadrži druge supstance poput metanola ili metiletiketona. Da biste osigurali efikasno vezivanje, neophodno je da se uzorak temeljno promeša sa etanolom kako bi se dobio homogeni rastvor. Epruveta za prikupljanje iz blister pakovanja može da se iskoristi i za centrifugiranje u 13. koraku.

6. Uverite se da su zatvoreni glavni vakuumski ventil (između vakuumske pumpe i vakuumskog manifolda) i ventila sa poklopcem na zavrtanje (na kraju QIAvac 24 Plus vakuum manifolda). Uključite vakuumsku pumpu pritiskom na prekidač za napajanje. Vakuum se primenjuje samo na spojnom sistemu (ako se koristi), a ne i na vakuum manifold.

Napomena: Za brzo i praktično otpuštanje pritiska vakuuma, potrebno je da koristite QIAvac Connecting System ili Vacuum Regulator, pogledajte „Potreban materijal koji se ne isporučuje“ (strana 15).

7. Pažljivo nanosite 630 µl lizata iz 5. koraka na QIAamp Mini spin kolonicu, ali tako da ne pokvasite obod. Izbegavajte kontakt pipetnog nastavka sa membranom QIAamp Mini spin kolonice.
8. Otvorite glavni vakuumski ventil. Obavezno ostavite otvoren poklopac QIAamp Mini spin kolonice dok primenjujete vakuum. Kada se svi lizati uvuku preko QIAamp Mini spin kolonice, zatvorite glavni vakuumski ventil i otvorite ventil sa poklopcem na zavrtanje da biste ispustili vazduh iz manifolda. Zatvorite ventil sa poklopcem na zavrtanje kada otpustite vakuum iz manifolda.

- Kada zatvorite glavni vakuumski ventil, vakuum se primenjuje samo na spojnom sistemu (ako se koristi), a ne i na vakuum manifoldu. Ako lizati iz pojedinačnih uzoraka nisu u potpunosti prošli kroz membranu uprkos tome što su zatvoreni ventili VacValve za sve ostale QIAamp Mini spin kolonice, postavite QIAamp Mini spin kolonicu na čistu epruvetu za pranje (Wash Tube, WT) od 2 ml, zatvorite poklopac i centrifugirajte pri najvećoj brzini tokom 3 min. ili sve dok lizat ne prođe u potpunosti. Pređite na korake 7–11 u okviru spin protokola na strani 34 da biste dovršili proceduru. Centrifugiranje se obavlja brzinom od približno 6000 x g da bi se izbegla buka od mikrocentrifuge. Centrifugiranje pri najvećoj brzini ne utiče na prinos niti na čistoću virusne RNK.
9. Nanesite 750 µl Buffer AW1 na QIAamp Mini spin kolonicu, ali tako da ne pokvasite obod. Izbegavajte kontakt pipetnog nastavka sa membranom QIAamp Mini spin kolonice.
 10. Otvorite glavni vakuumski ventil. Kada se sav Buffer AW1 uvuče preko QIAamp Mini spin kolonice, zatvorite glavni vakuumski ventil i otvorite ventil sa poklopcem na zavrtnje da biste ispustili vazduh iz manifolda. Zatvorite ventil sa poklopcem na zavrtnje kada otpustite vakuum iz manifolda.
 11. Nanesite 750 µl Buffer AW2 na QIAamp Mini spin kolonicu, ali tako da ne pokvasite obod. Izbegavajte kontakt pipetnog nastavka sa membranom QIAamp Mini spin kolonice. Ostavite otvoren poklopac na kolonici.
 12. Otvorite glavni vakuumski ventil. Kada se sav Buffer AW2 uvuče preko QIAamp Mini spin kolonice, zatvorite glavni vakuumski ventil i otvorite ventil sa poklopcem na zavrtnje da biste ispustili vazduh iz manifolda. Zatvorite ventil sa poklopcem na zavrtnje kada otpustite vakuum iz manifolda.
 13. Zatvorite poklopac QIAamp Mini spin kolonice. Uklonite ga sa vakuum manifolda i odložite VacConnector u otpad. Postavite QIAamp Mini spin kolonicu u čistu epruvetu za pranje (Wash Tube, WT) od 2 ml koju ste koristili u 5. koraku i centrifugirajte je pri najvećoj brzini tokom 1 min. da biste u potpunosti osušili membranu.
 14. Postavite QIAamp Mini spin kolonicu u čistu epruvetu za ispiranje (Elution Tube, ET). Odložite u otpad epruvetu za prikupljanje koja sadrži filtrat. Pažljivo otvorite QIAamp Mini spin kolonicu. Dodajte 60 µl Buffer AVE koji je kalibrisan na sobnu temperaturu. Zatvorite poklopac i inkubirajte na sobnoj temperaturi tokom ≥ 1 min. Centrifugirajte na približno 6000 x g tokom ≥ 1 min.

Kontrola kvaliteta

U skladu sa QIAGEN ISO Sistemom upravljanja kvalitetom, svaka serija kompleta QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit testirana je prema unapred utvrđenim zahtevima kako bi se osigurao stalni kvalitet proizvoda.

Ograničenja














Učink sistem je utvrđen pomoću uzoraka plazme i seruma, telesnih tečnosti koje ne sadrže ćelije i supernatanta ćelijske kulture za izolaciju virusne RNK.



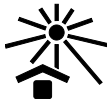

Odgovornost korisnika je potvrdi performanse sistema za sve procedure koje se koriste u njegovoj laboratoriji, a koje nisu pokrivene studijama performansi kompanije QIAGEN. Da bi se rizik od negativnog uticaja na dijagnostičke rezultate sveo na najmanju moguću meru, potrebno je da se primene adekvatne kontrole pri naknadnim primenama. Radi dodatne validacije, preporučuju se smernice Međunarodne konferencije za harmonizaciju tehničkih zahteva (ICH) u *ICH Q2(R1) Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology*.

Svi generisani dijagnostički rezultati se moraju tumačiti zajedno za drugim kliničkim ili laboratorijskim nalazima.

Simboli

Sledeći simboli mogu da se nalaze u uputstvu za upotrebu ili na pakovanju i oznakama:

Simbol	Definicija simbola
	Sadrži reagense koji su dovoljni za <N> reakcija
	Upotrebiti do
	Medicinski uređaj za in vitro dijagnostiku
	Po dostavi
	Otvoriti nakon isporuke; čuvati QIAamp Mini Spin Columns na 2–8 °C
	Kataloški broj
	Broj serije
	Broj materijala (tj. oznaka komponente)
	Komponente
	Zapremina
	Dodavanje
	Temperaturno ograničenje
	Proizvođač

Simbol	Definicija simbola
	Pogledajte uputstvo za upotrebu
	Zapišite trenutni datum nakon dodavanja etanola u bočicu
EtOH	Etanol
CONT	Sadrži
LYOPH	Liofilizovano
RCNS	Rekonstituisati u
→	Izaziva
GuHCl	Gvanidin hidrohlorid
GITC	Gvanidin tiocijanat
GTIN	Globalni broj trgovinske jedinice
NUM	Broj
Rn	„R“ označava reviziju uputstva za upotrebu, a „n“ je broj revizije
	Držite dalje od sunčeve svetlosti
	Upozorenje/oprez

Kontakt informacije

Tehničku pomoć i više informacija potražite u našem Centru za tehničku podršku na adresi **www.qiagen.com/Support**, pozovite 800-362-7737 ili se obratite jednom od QIAGEN odeljenja za tehničku pomoć ili lokalnim dobavljačima (pogledajte poledinu ili posetite adresu **www.qiagen.com**).

Dodatak

Rukovanje RNK

Ribonukleaze su veoma stabilni i aktivni enzimi koji suštinski ne zahtevaju veliki broj kofaktora za funkcionisanje. Pošto je teško inaktivirati ribonukleaze i budući da su veoma male količine potrebne za uništavanje RNK, nemojte da koristite plastični ili stakleni pribor a da pre toga ne eliminišete mogućnost kontaminacije ribonukleazom. Naročito vodite računa da slučajno ne uvedete ribonukleaze u uzorak RNK tokom procedure purifikacije ili nakon nje. Da biste uspostavili okruženje koje ne sadrži ribonukleaze i da biste ga održali u tom stanju, prilikom rada sa RNK morate da preduzmete sledeće mere opreza tokom predtretmana i korišćenja sudova i rastvora za jednokratnu upotrebu i više upotreba.

Opšte rukovanje

Prilikom rada sa RNK uvek morate da primenite pravilnu mikrobiološku i aseptičnu tehniku. Na šakama i česticama prašine mogu se naći bakterije i buđi koje predstavljaju najčešći uzrok kontaminacije ribonukleazom. Uvek nosite rukavice od lateksa ili vinila kada rukujete reagensima i uzorcima RNK da biste sprečili kontaminaciju ribonukleaze preko površine kože ili prašnjave laboratorijske opreme. Redovno menjajte rukavice i držite epruvete zatvorenim kada je god to moguće. Tokom procedure radite brzo da biste izbegli degradaciju RNK preko endogenih ili preostalih ribonukleaza.

Plastični pribor za jednokratnu upotrebu

Preporučuje se korišćenje sterilnih epruveta za jednokratnu upotrebu od polipropilena tokom procedure. Ove epruvete obično ne sadrže ribonukleaze i ne zahtevaju predtretman za inaktivaciju ribonukleaza.

Plastični pribor za višekratnu upotrebu

Plastični pribor za višekratnu upotrebu treba da se tretira pre upotrebe da bi se osiguralo da ne sadrži ribonukleaze. Plastični pribor treba da se temeljno ispere korišćenjem 0,1 M NaOH,* 1 mM EDTA* i vodom koja ne sadrži ribonukleazu (pogledajte odeljak „Rastvori“, strana 43). Osim toga, plastični pribor otporan na hloroform može da se ispere hloroformom* za inaktivaciju ribonukleaza.

* Kada radite sa hemikalijama, uvek nosite odgovarajući laboratorijski mantil, rukavice za jednokratnu upotrebu i zaštitne naočare. Više informacija potražite u odgovarajućim tehničkim specifikacijama (Safety Data Sheet, SDS) dostupnim kod dobavljača proizvoda.

Stakleni pribor

Stakleni pribor treba da se tretira pre upotrebe da bi se osiguralo da ne sadrži ribonukleaze. Stakleni pribor koji se koristi prilikom rada sa RNK pre upotrebe treba da se očisti deterdžentom,* temeljno ispere i tretira u laboratorijskoj peći na >240 °C tokom četiri sata ili duže (tokom noći, ako je to praktičnije). Ako se pribor samo tretira u autoklavu, to neće u potpunosti inaktivirati više ribonukleaza. Laboratorijska peć inaktivira ribonukleaze. Osim toga, stakleni pribor može da se tretira pomoću DEPC* (dietilpirokarbonat). Isperite stakleno posuđe koristeći 0,1% DEPC (0,1% u vodi) tokom noći (12 sati) na temperaturi 37 °C i zatim tretirajte u autoklavu ili zagrevajte na 100 °C tokom 15 minuta da bi se uklonio preostali DEPC.

Napomena: Corex® epruvete treba da tretiraju pomoću DEPC kako bi se uklonile sve ribonukleaze, a ne u laboratorijskoj peći. To smanjuje stopu neuspeha ovih epruveta tokom centrifugiranja.

Rezervoari za elektroforezu

Rezervoari za elektroforezu treba da se očiste rastvorom deterdženta (npr. 0,5% SDS)*, da se isperu vodom, osuše pomoći etanola*† i zatim napune rastvorom od 3% H₂O₂.* Nakon 10 minuta na sobnoj temperaturi temeljno isperite rezervoare za elektroforezu koristeći vodu koja ne sadrži ribonukleaze.

Rastvori

Rastvori (voda i drugi rastvori)* treba da se tretiraju pomoću 0,1% DEPC. DEPC reaguje sa primarnim aminima i stoga ne može da se koristi direktno za tretiranje Tris pufera.* DEPC je izuzetno nestabilan u prisustvu Tris pufera i brzo se razgrađuje u etanol i CO₂. Kada pripremate Tris pufere, prvo tretirajte vodu DEPC-om, a zatim rastvorite Tris da biste napravili odgovarajući puffer.

* Kada radite sa hemikalijama, uvek nosite odgovarajući laboratorijski mantil, rukavice za jednokratnu upotrebu i zaštitne naočare. Više informacija potražite u odgovarajućim tehničkim specifikacijama (Safety Data Sheet, SDS) dostupnim kod dobavljača proizvoda.

† Plastika koja se koristi u nekim rezervoarima za elektroforezu nije otporna na etanol. Vodite računa i proverite uputstva dobavljača.

DEPC je snažan, ali ne i potpuno efikasan inhibitor ribonukleaza. Često se koristi pri koncentraciji od 0,1% za inaktivaciju ribonukleaza na staklenom ili plastičnom priboru ili za pravljenje rastvora ili vode koja ne sadrži ribonukleaze. DEPC inaktivira ribonukleaze kovalentnom modifikacijom. Veoma mala količina DEPC-a modifikuje ostatke purina u RNK putem karbetoksilacije. Karbetoksilovana RNK se prenosi sa vrlo niskom efikasnošću u sistemima koji ne sadrže ćelije. Međutim, njena sposobnost da formira DNK:RNK ili RNK:RNK hibride nije značajno ugrožena, sem ako je modifikovan veliki deo ostataka purina. Rezidualni DEPC mora uvek da se ukloni iz rastvora ili iz sudova tretiranjem u autoklavu ili zagrevanjem na 100 °C tokom 15 minuta.

Dodajte 0,1 ml DEPC u 100 ml rastvora koji treba da se tretira. Dobro promešajte da biste uneli DEPC u rastvor ili ostavite rastvor u laboratorijskoj peći tokom 12 sati na temperaturi 37 °C. Tretirajte u autoklavu 15 minuta da biste uklonili sve tragove DEPC-a. Možda će biti preporučljivo da testirate izvore vode na prisustvo kontaminirajućih ribonukleaza, jer mnogi izvori destilovane vode ne pokazuju aktivnost RNK.

Napomena: QIAamp DSP Viral RNA puferi se ne podvrgavaju tretmanu DEPC-om za uklanjanje ribonukleaze, pa samim tim nisu kontaminirani DEPC-om.

Informacije za naručivanje

Proizvod	Sadržaj	Kat. br.
QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit (50)	Za 50 priprema RNK: QIAamp Mini Spin Columns, RNK nosač, epruvete za prikupljanje (2 ml) i puferi koji ne sadrže ribonukleaze	61904
Srodni proizvodi		
QIAcube Connect MDx*	Instrument i jednogodišnja garancija na delove i rad	9003070
Dodaci		
QIAvac 24 Plus vacuum manifold	Vakuum manifold za obradu 1–24 spin kolonice: obuhvata QIAvac 24 Plus vakuum manifold, luer poklopce, brze spojnice	19413
VacConnectors	500 priključaka za jednokratnu upotrebu za korišćenje sa QIAamp spin kolonicama na luer priključcima	19407
Vacuum Regulator	Za korišćenje sa QIAvac manifoldima	19530
Vacuum Pump	Univerzalna vakuumska pumpa	84010
VacValves	24 ventila za upotrebu sa QIAvac 24 i QIAvac 24 Plus	19408
QIAvac Connecting System	Sistem za povezivanje vakuum manifolda sa vakuumskom pumpom obuhvata tacnu, boce za otpad, cevi, spojnice, ventil, merač, 24 ventila VacValve	19419

Proizvod	Sadržaj	Kat. br.
Rotor Adapters	Za 240 priprema: 240 adaptera za rotor za jednokratnu upotrebu i 240 epruveta za ispiranje (1,5 ml); za korišćenje sa instrumentom QIAcube	990394
Rotor Adapter Holder	Držač za 12 adaptera za rotor za jednokratnu upotrebu; za korišćenje sa instrumentom QIAcube	990392
Sample Tubes CB	1000 konusnih epruveta sa poklopcima na zavrtnje bez osnove za uspravni položaj (2 ml) za korišćenje sa instrumentima QIAcube i QIAcube Connect	990382
Shaker Rack Plugs	Za ubacivanje QIAcube nosača za šejker	9017854
Reagent Bottles, 30 ml	Reagent Bottles (30 ml) sa poklopcima; 6 u pakovanju; za korišćenje sa instrumentom QIAcube	990393
Filter-Tips, 1000 µl	Disposable Filter-Tips, na nosaču; (8 x 128). Za korišćenje sa instrumentom QIAcube	990352

* Instrument QIAcube Connect MDx nije dostupan u svim zemljama. Obratite se tehničkoj službi kompanije QIAGEN za detaljnije informacije.

Najnovije informacije o licenciranju i odricanjima od odgovornosti specifičnim za proizvod potražite u odgovarajućem priručniku za QIAGEN komplet ili korisničkom priručniku. Priručnici za QIAGEN komplet i korisnički priručnici dostupni su na veb-adresi **www.qiagen.com**, a možete da ih zatražite i od tehničke službe kompanije QIAGEN ili svog lokalnog dobavljača.

Istorija revizija dokumenta

Revizija	Opis
R6, 01/2021	<p>Ažurirani su sledeći odeljci: „Automatizovana purifikacija virusne RNK na instrumentu QIAcube / QIAcube Connect MDx“, „Potreban materijal koji se ne isporučuje“, „Upozorenja i mere opreza“, „Protokol: Purifikacija virusne RNK korišćenjem mikrocentrifuge ili instrumenta QIAcube / QIAcube Connect MDx“, „Simboli“ i „Informacije za naručivanje“.</p> <p>Uklonjen je odeljak „Reference“.</p> <p>Ubačena je nova slika (slika instrumenta QIAcube Connect MDx)</p> <p>Dodate su reference na QIAcube Connect MDx i pripadajući pribor.</p> <p>Promene uvodnika i rasporeda.</p>

Ova strana je namerno ostavljena prazna.

Sporazum o ograničenoj licenci za QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit

Korišćenje ovog proizvoda označava da je kupac ili korisnik ovog proizvoda saglasan sa sledećim uslovima:

1. Ovaj proizvod sme da se koristi samo u skladu sa protokolima navedenim uz proizvod i u ovom uputstvu i samo sa komponentama koje se nalaze u kompletu. QIAGEN ne odobrava licencu u okviru svoje intelektualne svojine za korišćenje ili kombinovanje isporučenih komponenti sa komponentama koje nisu deo ovog kompleta, osim kao što je opisano u protokolima navedenim uz proizvod, u ovom uputstvu i dodatnim protokolima dostupnim na adresi www.qiagen.com. Neke od ovih dodatnih protokola su obezbedili korisnici QIAGEN proizvoda za korisnike QIAGEN proizvoda. Kompanija QIAGEN nije detaljno testirala niti optimizovala te protokole. QIAGEN ne daje garancije za njih niti tvrdi da oni ne krše prava nezavisnih proizvođača.
2. Osim izričito navedenih licenci, QIAGEN ne garantuje da ovaj komplet i/ili njegovo korišćenje ne krše prava nezavisnih proizvođača.
3. Ovaj komplet i njegove komponente su licencirani za jednokratnu upotrebu i ne smeju da se ponovo koriste, dorađuju ili ponovo prodaju.
4. Kompanija QIAGEN posebno se odriče svih drugih licenci, izričitih ili impliciranih, osim onih izričito navedenih.
5. Kupac i korisnik ovog kompleta saglasni su da neće preduzeti i da neće drugim licima dozvoliti da preduzmu korake koji bi mogli da prouzrokuju ili omoguće bilo koje postupke zabranjene u prethodnom tekstu. QIAGEN može da primeni zabrane ovog Sporazuma o ograničenoj licenci na bilo kom sudu i povratice sve svoje istražne i sudske troškove, uključujući advokatske troškove, koji su u vezi sa primenom ovog Sporazuma o ograničenoj licenci ili prava na intelektualnu svojinu koja se odnose na komplet i/ili njegove komponente.

Da biste videli ažurirane uslove licenciranja, posetite www.qiagen.com.

Zaštićeni znakovi: QIAGEN®, QIAamp®, QIAcube® (QIAGEN Group); Corex® (Corning, Inc.); Tween® (ICI Americas Inc.); UltraFree® (Millipore Corporation); Sarstedt® (Sarstedt AG & Co.). Registrovani nazivi, zaštitni znakovi itd., koji se koriste u ovom dokumentu, čak iako nisu posebno naznačeni kao takvi, zaštićeni su zakonom.

01/2021 HB-0418-008 1122786 © 2021 QIAGEN, sva prava zadržana.

Porudžbine www.qiagen.com/shop | Tehnička podrška support.qiagen.com | Veb-lokacija www.qiagen.com