

September 2019

# QIAamp<sup>®</sup> DSP Circulating NA Kit Kasutusjuhised (käsiraamat)

1. versioon



50

IVD

CE

REF

61504



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden

R4 MAT

1118364ET

# Sisukord

Sihtotstarve .....	4
Ülevaade ja selgitus.....	4
Protseduuri põhimõtted .....	5
Proovi mahud.....	5
Lüüsimise proovid .....	7
QIAamp Mini kolonni membraanile adsorbeerimine.....	7
Jääksaasteainete eemaldamine .....	7
Puhaste nukleiinhapete elueerimine.....	8
Saagis ja nukleiinhapete suurus .....	8
Protokollide kirjeldus.....	9
Kaasasolevad materjalid .....	10
Komplekti sisu .....	10
Vajalikud, kuid tarnekomplekti mittekuuluvad materjalid .....	11
Hoiatused ja ettevaatusabinõud.....	12
Reaktiivide hoiustamine ja käsitsemine .....	15
Proovi säilitamine ja käsitsemine.....	16
Protseduur.....	17
Puhvrite ja reaktiivide ettevalmistamine.....	24
Protokoll Breeze: Tsirkuleerivate nukleiinhapete puhastamine 1–5 ml inimese vereplasmast .....	27
Protokoll Classic: Tsirkuleerivate nukleiinhapete puhastamine 1–5 ml inimese vereplasmast .....	32

---

Kvaliteedikontroll .....	37
Piirangud .....	37
Sümbolid .....	38
Viited .....	40
Kontaktteave .....	40
Tõrkeotsingjuhend .....	41
Lisa A: Soovitused vereplasma eraldamiseks ja säilitamiseks.....	43
Lisa B: RNA käsitlemise üldised märkused .....	45
Tellimisteave .....	46
Käsiraamatu redaktsiooniajalugu.....	47

# Sihtotstarve

QIAamp DSP Circulating NA Kit on süsteem, mis kasutab silikaatmembraani tehnoloogiat (QIAamp tehnoloogia), et isoleerida ja puhastada inimese vereplasmaproovidest tsirkuleeriv raku DNA ja RNA.

Toode on ette nähtud kasutamiseks kutseala esindajatele, nagu nt tehnikutele ja arstidele, kes on saanud väljaõppe molekulaarbioloogia meetodite kasutamiseks.

QIAamp DSP Circulating NA Kit on ette nähtud kasutamiseks *in vitro* diagnostikas.

## Ülevaade ja selgitus

Vabalt tsirkuleerivad nukleiinhapped esinevad inimese plasmas tavaliselt lühikeste fragmentidena < 1000 bp (DNA), < 1000 nt (RNA) või isegi ainult 20 nt (miRNA). Vabalt tsirkuleerivate nukleiinhapete kontsentratsioon inimese vereplasmas on tavaliselt väike ja erineb oluliselt indiviidide vahel, olles inimeste proovide (1–5) puhul vahemikus 1–100 ng/ml.

QIAamp DSP Circulating NA Kit võimaldab inimese plasmast puhastada tõhusalt tsirkuleerivaid nukleiinhappeid. Proovid võivad olla värsked või külmutatud. Katsutid Extension Tubes ja vaakumtötlus seadmes QIAvac 24 Plus võimaldab kasutada proovi algmahuna kuni 5 ml ja paindlikud elueerimismahud vahemikus 20–150 µl võimaldab kontseentreerida nukleiinhapete liike, mis esinevad väikestes kontsentratsioonides.

Elueeritud vabalt tsirkuleeriv genoomne DNA või RNA on kasutusvalmis allasuunas rakenduste jaoks või sobilik säilitamiseks. QIAamp DSP Circulating NA Kit tagab tõhusa valkude, nukleaaside ja muude lisandite eemaldamise.

---

# Protseduuri põhimõtted

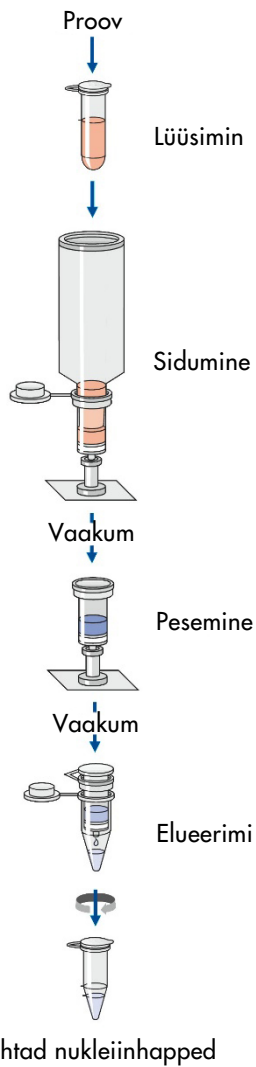
QIAamp DSP Circulating NA protseduur hõlmab 4 etappi (lüüsimine, sidumine, pesemine ja elueerimine) ja seda teostatakse süsteemis QIAvac, kasutades kolonne QIAamp Mini. Robustne protseduur aitab minimeerida proovide vahelist ristasaastumist ja suurendab kasutaja ohutust potentsiaalselt nakkusohlike proovide käitlemisel.

Lihtne protseduur võimaldab töödelda samaaegselt kuni 24 proovi vähem kui 2 tunniga.

## Proovi mahud

QIAamp Mini kolonnid seovad fragmenteeritud nukleiinhapped, mis on nii lühikesed kui 20 nt, kuid saagikus sõltub proovi mahust ja proovi tsirkuleerivate nukleiinhapete kontsentratsioonist (plasmas tavaliselt 1–100 ng/ml). QIAamp DSP Circulating NA protseduuri on optimeeritud kuni 5 ml proovi mahtude jaoks.

## QIAamp DSP Circulating NA Kiti protseduur



Joonis 1. QIAamp DSP Circulating NA Kiti protseduuri ülevaade

## Lüüsimise proovid

Kehavedelike vabalt tsirkuleerivad nukleiinhapped on tavaliselt seondunud valkudega või ümbritsetult vesiikulites, mis nõuab efektiivset lüüsimise etappi, et vabastada nukleiinhapped QIAamp Mini kolonniga selektiivselt seondumiseks. Seega lüüsitakse proove tugevates denatureerivates tingimustes kõrgetel temperatuuridel ja proteinaas K ja Buffer ACL-i juuresolekul, mis tagab DNAaside ja RNAaside inaktiveerimise ja nukleiinhapete vabanemise seondunud valkudelt, lipiididelt ja vesiikutest.

## QIAamp Mini kolonni membraanile adsorbeerimine

Tsirkuleerivate nukleiinhapete optimaalse membraaniga seondumise võimaldamiseks reguleeritakse seondumistingimusi lüsaadile Buffer ACB lisamisega. Seejärel viiakse lüsaadid QIAamp Mini kolonnile ja tsirkuleerivad nukleiinhapped absorbeeritakse suurest mahust silikaatmembraanile samaaegselt lüsaadi läbi viimisega vaakumrõhuga. Sool ja pH-tingimused tagavad, et suurem osa valkudest ja muudest saasteainetest, mis inhibeerivad PCR-i ja muid allasuunas ensümaatilisi reaktsioone, ei jää QIAamp Mini kolonni membraanile.

Protokolli jaoks on vaja vaakumkollektorit (nt QIAvac 24 Plus koos QIAvac Connecting Systemiga) ja vaakumpumpa, mis on võimeline tekitama vaakumi ~800–900 mbar (nt QIAGEN® Vacuum Pump). Vaakumrõhu lihtsaks jälgimiseks ja vaakumi mugavaks kõrvaldamiseks tuleb kasutada Vacuum Regulatorit (osa QIAvac Connecting Systemist).

## Jääksaasteainete eemaldamine

Nukleiinhapped jäävad membraaniga seotuks, kuid saasteained pestakse efektiivselt maha 3 pesemisetapi käigus.

## Puhaste nukleiinhapete elueerimine

Elueeritakse Buffer AVE-ga. Ühe etapina elueeritakse ülipuhtad tsirkuleerivad nukleiinhapped toatemperatuurini stabiliseeritud Buffer AVE-s. Kasutada saab paindlikku elueerimismahtu 50–150 µl. Kui vajalikud on suuremad nukleiinhappe kontsentratsioonid, saab elueerimismahtu vähendada kuni 20 µl-ni. 50 µl väiksemad elueerimismahud annavad rohkem kontsentreeritud nukleiinhappe eluaadid, kuid võivad põhjustada väiksemat kogussaagist.

Taastatud eluaadi maht: võib olla kuni 5 µl väiksem kolonnile rakendatud elueerimispuhvri mahust.

## Saagis ja nukleiinhapete suurus

Bioloogilistest proovidest isoleeritud vabalt tsirkuleerivate nukleiinhapete saagised on tavaliselt alla 1 µg, mistõttu on neid spektrofotomeetriga raske määrata. QIAamp DSP Circulating NA Kitiga proovist saadud tsirkuleeriva DNA ja RNA absoluutne saagis erineb sõltuvalt erinevatest indiviididest ja ka muudest teguritest (nt teatud haigusseisundid). Lisaks sellele domineerib ekstraheeritud nukleiinhapetes esineb kandur-RNA tõenäoliselt UV-neelduvuse näite (vt lk 25). Saagiste määramiseks on soovitatav kasutada kvantitatiivseid amplifitseerimise meetodeid.

QIAamp DSP circulating NA Kitiga puhastatud tsirkuleerivate nukleiinhapete suurusjaotust saab kontrollida agarosgeeli elektroforeesi või sihtmärk-spetsiifiliselt märgistatud sondi<sup>5</sup> hübridiseerimise või mikrovedeliku elektroforeesi lahendusega (nt Agilent Bioanalyzer).



---

## Protokollide kirjeldus

Käsiraamatus on toodud kaks erinevat protokoll.

Protokoll „Protokoll Breeze: Tsirkuleerivate nukleiinhapete puhastamine 1–5 ml inimese vereplasmast“ (lk 27) on ette nähtud kuni 5 ml plasma töötlemiseks 1 ml etappidena ning see on optimeeritud minimaalseks käeliseks tegevuseks ja läbiviimistsükliks.

Protokoll „Protokoll Classic: Tsirkuleerivate nukleiinhapete puhastamine 1–5 ml inimese vereplasmast“ (lk 32) on ette nähtud kuni 5 ml plasma töötlemiseks 1 ml etappidena ning hõlmab QIAamp DSP Circulating NA Kiti käsiraamatu 3. versiooni (R3) muutumata protokoll.

# Kaasasolevad materjalid

## Komplekti sisu

QIAamp DSP Circulating NA Kit			(50).
Katalooginr			61504
Preparaatide arv			50
QIAamp Mini	QIAamp Mini columns with Wash Tubes (QIAamp Mini kolonnid pesukatsutitega) (WT) (2 ml)	<b>COL</b>	50
EXT	Column Extenders (Kolonnid pikendused) (20 ml)	<b>COL</b> <b>EXT</b>	2 × 25
WT	Wash Tubes (Pesukatsutid) (2 ml)	<b>WASH</b> <b>TUBE</b>	50
ET	Elution Tubes (Elueerimiskatsutid) (1,5 ml)	<b>ELU</b> <b>TUBE</b>	50
VC	VacConnectors (Vaakumiliitmikud)	<b>VAC</b> <b>CON</b>	50
ACL*	Lysis Buffer (Lüüsimispuhver)*	<b>LYS</b> <b>BUF</b>	220 ml
ACB*	Binding Buffer (Sidumispuhver)* (konsentraat)	<b>BIND</b> <b>BUF</b> <b>CONC</b>	300 ml
ACW1*	Wash Buffer 1 (Pesupuhver 1)* (konsentraat)	<b>WASH</b> <b>BUF</b> <b>1</b> <b>CONC</b>	19 ml
ACW2†	Wash Buffer 2 (Pesupuhver 2)† (konsentraat)	<b>WASH</b> <b>BUF</b> <b>2</b> <b>CONC</b>	13 ml
AVE†	Elution Buffer (Elueerimispuhver)† (lillad korgid)	<b>ELU</b> <b>BUF</b>	5 × 2 ml
PROTK	QIAGEN Proteinase K (QIAGEN-i proteinaas K)	<b>PROTK</b>	4 × 7 ml
Kandur	Carrier RNA (Kandur-RNA) (punased korgid)	<b>CAR</b> <b>RNA</b>	310 µg
	Käsiraamat	<b>H</b> <b>B</b>	1

\* Sisaldab kaatroopset soola. Vt lk 12 Hoiatused ja ettevaatusabinõud.

† Sisaldab säilitusainena naatriumasiidi.

# Vajalikud, kuid tarnekomplekti mittekuuluvad materjalid

Kemikaalidega töötamise korral kandke alati sobivat laborikilrit, ühekordselt kasutatavaid kindaid ja kaitseprille. Lisateabe saamiseks tutvuge toote tarnija pakutava vastava ohutuskaardiga (safety data sheet, SDS).

Veenduge, et seadmed on kontrollitud ja vastavalt tootja soovitudele kalibreeritud.

## Kõikide protokollide jaoks

- Pipetid (reguleeritavad)
- Steriilsed pipetiotsikud (soovitatud on aerosoolbarjääridega pipetiotsikud, et aidata vältida ristsaastumist)
- Veevann või soojendusplokk, mis mahutab 50 ml tsentrifuugimiskatsuteid temperatuuril 56 °C või 60 °C\*
- Soojendusplokk vms temperatuuril 56 °C, mis mahutab 2 ml pesemiskatsuteid (ainult protokoll Classic Protocol)\*
- Mikrotsentrifuug (2 ml katsute jaoks)\*
- 50 ml tsentrifuugimiskatsutid
- QIAvac 24 Plus vacuum manifold (katalooginr 19413)
- QIAvac Connecting System (katalooginr 19419) või samaväärne
- Vacuum Pump (katalooginr 84010 [USA ja Kanada], 84000 [Jaapan] või 84020 [ülejäädud maailm]) või samaväärne pump, mis on võimeline tekitama vaakumi –800...–900 mbar
- Etanool (96–100%)†
- Isopropanool (100%)
- Purustatud jää (ainult protokoll „Protokoll Classic: Tsirkuleerivate nukleiinhapete puhastamine 1–5 ml inimese vereplasmast“.)
- Mõned proovid tuleb lahjendada fosfaatpuhvriga füsioloogilise lahusega (phosphate-buffered saline, PBS)

\* Veenduge, et seadmed on kontrollitud ja vastavalt tootja soovitudele kalibreeritud.

† Ärge kasutage denatureeritud alkoholi, mis sisaldab muid ühendeid nagu metanool või metüüleetüülketoon.

- Valikuline: VacValves (katalooginr 19408)

## Hoiatused ja ettevaatusabinõud

Kasutamiseks *in vitro* diagnostikas

Kemikaalidega töötamise korral kandke alati sobivat laborikitlit, ühekordselt kasutatavaid kindaid ja kaitseprille. Lisateabe saamiseks tutvuge vastava ohutuskaardiga (safety data sheets, SDS). Need on saadaval mugavas ja kompaktses PDF-vormingus veebiaadressil [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), kus saate vaadata kõiki QIAGENi komplekti ja selle osade ohutuskaarte ning need välja printida.

HOIATUS

Kehavigastuse oht



ÄRGE lisage valgendit või happelahuseid otse proovi valmistamise jätmetele.

Buffer ACL, Buffer ACB ja Buffer ACW1 sisaldavad guanidiinsooli, mis võivad valgendiga ühendamisel moodustada väga reaktiivseid ühendeid.

Kui neid puhvreid sisaldav vedelik maha loksub, puhastage sobiva laboripesuvahendi ja veega. Kui mahaloksunud vedelik sisaldab potentsiaalselt nakkusohutikke aineid, puhastage määrdund pinda kõigepealt laboripesuvahendi ja veega ning seejärel 1% (v/v) naatriumhüpokloritiga.

QIAamp DSP Circulating NA Kiti komponentidele kehtivad järgmised ohu- ja hoiatuslaused.

## Buffer ACB



Sisaldab: guanidiintiotsüanaat. Ohtlik! Ohtlik allaneelamise korral. Võib olla kahjulik, kui satub nahale või hingatakse sisse. Põhjustab rasket nahasöövitust ja silmakahjustusi. Pikaajalise kahjuliku mõjuga veeorganismidele. Kokkupuute korral hapetega eraldub väga mürgine gaas. Kandke kaitsekindaid/kaitserõivastust/kaitseprille/kaitsemaski. SILMA SATTUMISE KORRAL: loputada mitme minuti jooksul ettevaatlikult veega. Eemaldage kontaktläätsed, kui neid kannate ja kui neid on kerge eemaldada. Jätkake loputamist. Võtke kohe ühendust MÜRGIKESKUSE või arstiga.

## Buffer ACL



Sisaldab: guanidiintiotsüanaat. Ohtlik! Ohtlik allaneelamise korral. Võib olla kahjulik, kui satub nahale või hingatakse sisse. Põhjustab rasket nahasöövitust ja silmakahjustusi. Pikaajalise kahjuliku mõjuga veeorganismidele. Kokkupuute korral hapetega eraldub väga mürgine gaas. Kandke kaitsekindaid/kaitserõivastust/kaitseprille/kaitsemaski. SILMA SATTUMISE KORRAL: loputada mitme minuti jooksul ettevaatlikult veega. Eemaldage kontaktläätsed, kui neid kannate ja kui neid on kerge eemaldada. Jätkake loputamist. Võtke kohe ühendust MÜRGIKESKUSE või arstiga.

## Buffer ACW1



Sisaldab: guanidiinhüdrokloriid. Hoiatus! Võib olla kahjulik allaneelamise või sissehingamise korral. Põhjustab nahaärritust. Põhjustab tõsist silmaärritust. Kandke kaitsekindaid/kaitserõivastust/kaitseprille/kaitsemaski.

## Proteinaas K



Sisaldab: proteinaas K. Ohtlik! Põhjustab kerget nahaärritust. Võib põhjustada allergia või astma sümptomeid või hingamisraskusi, kui seda sisse hingata. Vältida tolmu/vingu/gaasi/udu/aurude/pihustatud aine sissehingamist. Kandke kaitsekindaid/kaitserõivastust/kaitseprille/kaitsemaski. Kandke hingamiskaitset. Kokkupuute või kokkupuutekahtluse korral: võtke ühendust MÜRGIKUSKESKUSE või arstiga. Viige kannatanu värskesse õhku ja jätke lamama hingamist kergendavasse asendisse.

# Reaktiivide hoiustamine ja käsitsemine

QIAamp Mini kolonne tuleb hoida kuivas kohas temperatuuril 2–8 °C. Kõiki puhvreid tuleb säilitada toatemperatuuril (15–25 °C). QIAamp Mini kolonne ja puhvreid võib säilitada nendel tingimustel kuni komplekti karbil märgitud aegumiskuupäeva lõpuni, ilma et see põhjustada toimivuse halvenemist.

Lüofiliseeritud kandur-RNAd tuleb säilitada toatemperatuuril (15–25 °C) kuni komponendi etiketil märgitud aegumiskuupäeva lõpuni. Kandur-RNA tuleb lahustada puhvril Buffer AVE; laustatud kandur-RNA tuleb lisada kohe puhvrile Buffer ACL, nagu on toodud lk 28 (protokoll Breeze Protocol) ja lk 33 (protokoll Classic Protocol). See lahus tuleb valmistada värskest ja see on temperatuuril 2–8 °C stabiilne kuni 48 tundi. Puhvril Buffer AVE lahustunud kandur-RNA kasutamata osad tuleb külmutada alikvootidena temperatuuril –30 või –15 °C.

QIAamp DSP Circulating NA Kit sisaldab kasutusvalmis proteinaas K lahust, mis lahustatakse spetsiaalse koostisega säilituspuhvril. Proteinaas K on toatemperatuuril (15–25 °C) säilitamisel stabiilne kuni komponendi etiketil märgitud aegumiskuupäeva lõpuni.

# Proovi säilitamine ja käsitsemine

## Vere säilitamine ja käsitsemine

Rakuvabade nukleiinhapete degradeerumise ja raku nukleiinhapete vabanemise vältimiseks soovitate säilitada täisverd maksimaalselt 6 tundi temperatuuril 2–8 °C (nt EDTA-proovid). Stabiliseeritud verevõtukatsetite kasutamisel lugege tootja esitatud säilitustingimusi. Soovitate need säilitustingimused valideerida kombinatsioonis teie spetsiifilise allasuunas rakenduse ja sihtmärgiga.

## Plasma säilitamine ja käsitsemine

Soovitav on eraldada plasma ja isoleerida nukleiinhape vahetult pärast verevõttu, kui antikoagulandina kasutatakse EDTAd, eriti RNA puhul. Lühiajaliseks säilitamiseks võib plasmat säilitada kuni 24 tundi temperatuuril 2–8 °C.

Pikaajaliseks säilitamiseks võib stabiliseeritud ja stabiliseerimata verevõtukatsetite plasmaalikoote säilitada temperatuuril –20 °C (ainult, kui sihtmärk on DNA) või –80 °C (sihtmärk on DNA ja RNA) vähemalt 4 nädalat.

## Elueeritud nukleiinhapete säilitamine

Elueeritud nukleiinhapped kogutakse 1,5 ml elueerimiskatsutitesse (kaasas). Puhastatud tsirkuleerivaid nukleiinhappeid võib säilitada kuni 24 tundi temperatuuril 2–8 °C. Üle 24-tunniseks säilitamiseks on allasuunas rakendustel DNA puhul soovitatav temperatuuril –30...–15 °C ja RNA puhul –90...–60 °C.



# Protseduur

Enne alustamist pidage silmas järgmist

## QIAvac 24 Plus

QIAvac 24 Plus on loodud kuni 24 QIAGEN-i tsentrifuugitava kolonni kiireks ja tõhusaks paralleelseks vaakumtöötlemiseks. Proovid ja pesulahused viiakse läbi kolonni membraanide vaakumiga mitte tsentrifuugiga, mis võimaldab puhastamisprotseduuride suuremat kiirust ja lühemat käsitsemisaega.

Koos QIAvac Connecting Systemiga saab QIAvac 24 Plusi kasutada läbivoolusüsteemina. Proovi läbivool kogutakse eraldi jäätmepudelis.

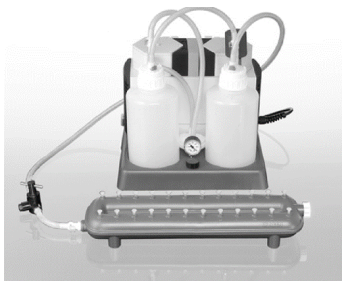
QIAvac 24 Plusi hooldust vt *QIAvac 24 Plusi käsiraamatu* käsitsemise juhistest.

## QIAamp Mini kolonnide töötlemine QIAvac 24 Plusis

QIAamp Mini kolonne töödeldakse QIAvac 24 Plusil ühekordse VacConnectors'i ja korduvalt kasutatava VacValvesiga. VacValves (valikuline) sisestatakse otse QIAvac 24 Plusi korkkraani Luer-pesasse ja need tagavad püsiva voolukiiruse, mis võimaldab erinevate proovimahtude paralleelset töötlemist. Neid tuleks kasutada siis, kui proovi voolukiirused oluliselt erinevad, et tagada püsiv vaakum. VacConnectorsid on ühekordselt konnektorid, mis kinnitatakse QIAamp Mini kolonnide ja VacValvesi vahele või QIAamp Mini kolonnide ja QIAvac 24 Plusi Luer-pesade vahele. Need takistavad tsentrifuugitava kolonni ja VacValves'i vahelist otsest kontakti puhastamise ajal, vältides nii proovide ristsaastumist. VacConnectorsid visatakse peale ühekordset kasutamist ära. Kasutatavate suurte lahusemahtude tõttu on vajalik QIAvac Connecting System (või sarnane jäätmepudelitega seadis) (vt Joonis 2).

## QIAvac 24 Plusi käsitlemise juhised

- Asetage QIAvac 24 Plus alati kindlale tasapinnale või tööalasse. Mahakukkumisel võivad QIAvac 24 Plusi korkkraanid puruneda.
- Hoidke QIAvac 24 Plus alati puhas ja kuiv. Puhastamisprotseduure vt QIAvac 24 Plusi käsiraamatust.
- QIAvac 24 Plusi komponendid ei ole teatud lahustite suhtes vastupidavad (Tabel 1). Kui need lahustid satuvad seadmele, loputage seda hoolikalt veega.
- Püsiva toimivuse tagamiseks ärge kandke QIAvac 24 Plusi korkkraani mistahes osale silikooni või vaakumi määrdeainet.
- Rõhu alla oleva vaakumkollektori lähedal töötamisel olge alati ettevaatlik ja kandke kaitseprille.
- Varu- või asendusosade kohta teabe saamiseks võtke ühendust ettevõtte QIAGEN tehnilise teenindusega.
- Vaakumrõhk on vaakumkollektori ja atmosfääri (tavaline atmosfääri rõhk 1013 mbar või 760 mm Hg) rõhkude erinevus ja seda saab mõõta QIAvac Connecting Systemiga (vt Joonis 2). Protokollid nõuavad vaakumpumpa, mis on võimeline tekitama vaakumi -800...-900 mbar (nt QIAGEN Vacuum Pump). Kõrgemaid vaakumrõhke tuleb vältida. Soovitatust madalamate vaakumrõhkude kasutamine võib vähendada nukleiinhappe saagist ja puhtust ning suurendada ummistunud membraanide riski.



Joonis 2. QIAvac 24 Plus, QIAvac Connecting System ja Vacuum Pump

Tabel 1. QIAvac 24 Plusi keemilise vastupidavuse omadused

Vastupidav		Mittevastupidav
Äädikhape	Kaatroopsed soolad	Benseen
Kroomhape	Kontsentreeritud alkoholid	Fenool
SDS	Naatriumkloriid	Kloroform
Tween® 20	Uurea	Tolueen
Kloriinvalgendi	Hüdrokloriidhape	Eetrid
Naatriumhüdroksiid		

## QIAvac 24 Plus vacuum manifold seadistamine

1. Ühendage QIAvac 24 Plus vaakumi allikaga. QIAvac Connecting Systemit kasutades ühendage süsteem korkkraani ja vaakumi allikaga, nagu on kirjeldatud *QIAvac 24 Plusi käsiraamatu* lisis A.
2. Ühendage kasutatava QIAvac 24 Plusi mõlemasse Luer-pessa VacValve (valikuline) (vt Joonis 3). Sulgege kasutamata Luer-pesad Luer-korkidega või sulgege sisestatud VacValve.  
VacValves'e tuleb kasutada, kui proovide voolukiirused on oluliselt erinevad, et tagada püsiv vaakum.
3. Sisestage mõlemasse VacValve'i VacConnector (vt Joonis 3).  
Teostage see etapp vahetult enne puhastamise alustamist, et vältida VacConnectorsite võimalikku kokkupuudet õhus olevate saasteainetega.
4. Asetage QIAamp Mini kolonnid korkkraani VacConnectorsitesse (vt Joonis 3).  
Märkus. Hoidke blisterpakend pesemiskatsuti puhastamisprotokollis kasutamiseks alles.
5. Sisestage kolonni pikendus (20 ml) mõlemasse QIAamp Mini kolonni (vt Joonis 3).  
Märkus. Veenduge, et kolonni pikendus on kindlalt QIAamp Mini kolonni sisestatud, et vältida proovi lekkimist.
6. Nukleiinhapete puhastamiseks järgige protokollide juhiseid. Visake VacConnectorsid pärast kasutamist nõuetekohaselt ära.

---

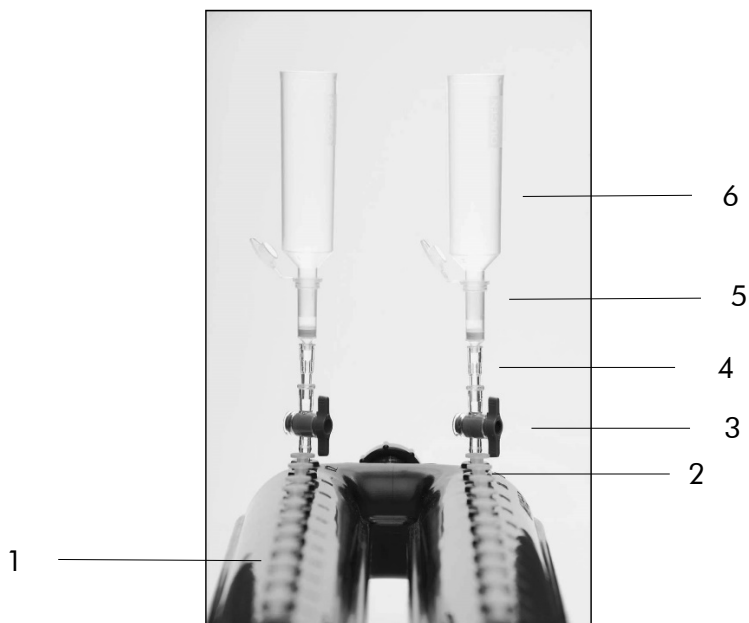
Vaakumi rakendamisel ärge pange QIAamp Mini kolonnile kaant.

Lülitage etappide vahel vaakum välja, et tagada töötlemise ajal püsiva, ühtlase vaakumi rakendamine. Vaakumi kiiremaks eemaldamiseks tuleb kasutada Vacuum Regulatorit (osa QIAvac Connecting Systemist).

Märkus. Igat VacValve'i saab sulgeda eraldi, kui proov on täielikult läbi tsentrifuugitava kolonni viidud, mis võimaldab erinevate mahu või viskoossusega proovide paralleelset töötlemist.

7. Pärast proovide töötlemist puhastage QIAvac 24 Plus (vt *QIAvac 24 Plusi käsiraamatust* jaotist „QIAvac 24 Plusi puhastamine ja dekontamineerimine“).

Märkus. Puhvrid ACL, ACB ja ACW1 ei ühildu valgendit sisaldavate desinfitseerimisainetega. Vt lk 12 Hoiatused ja ettevaatusabinõud.

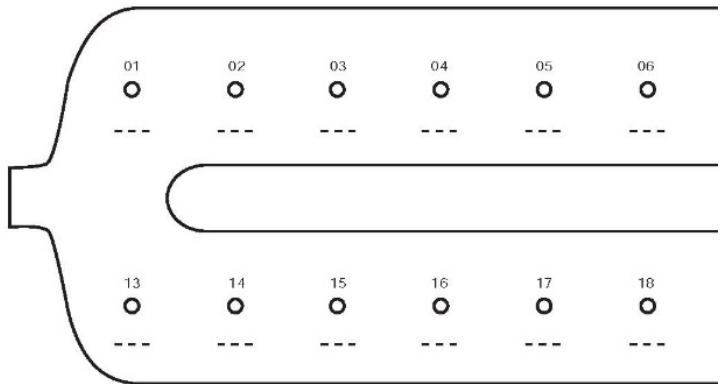


Joonis 3. QIAamp Mini kolonnidega QIAvac 24 Plusi seadistamine, tarvikuid VacValves, VacConnectors ja kolonni pikendid.

- |   |                      |
|---|----------------------|
| 1 QIAvac 24 Plus vaakuum manifold                     | 4 VacConnector       |
| 2 QIAvac 24 Plusi Luer-pesa<br>(suletud Luer-korgiga) | 5 QIAamp Mini kolonn |
| 3 VacValve**  | 6 Kolonni pikendi    |

Soovitame QIAvac 24 Plusi vaakumsüsteemis kasutamiseks katsutid ja QIAamp Mini kolonnid märgistada vastavalt joonisel Joonis 4 esitatud skeemile, et vältida proovide segiajamist. Joonisest võib teha fotokoopia ja märgistada proovide nimedega.

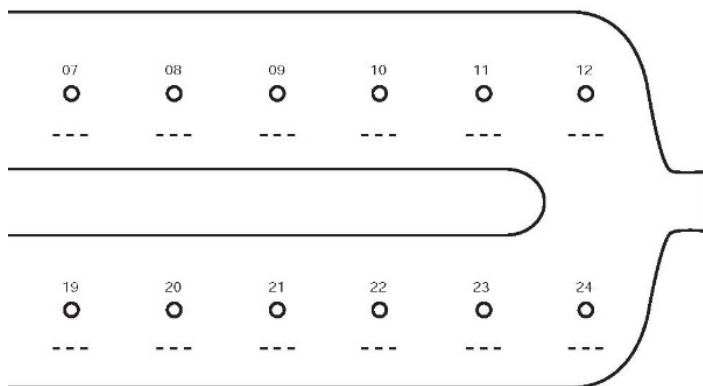
\* Tuleb osta eraldi.



Kuupäev: \_\_\_\_\_

Kasutaja: \_\_\_\_\_

Töotsükli ID: \_\_\_\_\_



Joonis 4. QIAvac 24 Plus vaakumsüsteemis kasutatavate katsutite ja QIAamp Mini kolonnide märgistamisskeem

# Puhvrite ja reaktiivide ettevalmistamine

## Buffer ACB

Lisage enne kasutamist 200 ml isopropanooli (100%) 300 ml Buffer ACB kontsentratsioonile, et saada 500 ml Buffer ACB-d. Segage hoolikalt pärast isopropanooli lisamist.

## Buffer ACW1 \*

Enne kasutamist lisage 25 ml etanooli (96–100%) 19 ml Buffer ACW1 kontsentratsioonile, et saada 44 ml Buffer ACW1. Segage hoolikalt pärast etanooli lisamist.

## Buffer ACW2†

Enne kasutamist lisage 30 ml etanooli (96–100%) 13 ml Buffer ACW2 kontsentratsioonile, et saada 43 ml Buffer ACW2. Segage hoolikalt pärast etanooli lisamist.

## Kandur-RNA lisamine Buffer ACL-ile\*

Kandur-RNA-l on 2 eesmärki: esiteks parandab see nukleiinhapete seondumist QIAamp Mini membraaniga, eriti kui proovid on vähe sihtmärkmolekule. Teiseks vähendab suure koguse kandur-RNA lisamine RNA degradeerumise võimalust harvadel juhtudel, kui RNAasi molekulid pääsevad Buffer ACL-is sisalduvate kaatroopsete soolde ja detergentide põhjustatud denaturatsioonist.

Saadaval lüofiliseeritud kandur-RNA kogus on piisav komplektis sisalduva Buffer ACL-i mahu jaoks. Soovitatakse kandur-RNA kontsentratsiooni on reguleeritud, nii et QIAamp DSP Circulating NA protokollis saab kasutada geneerilise puhastamissteemina, mis ühildub paljude erinevate amplifitseerimissüsteemidega ja sobib paljudele erinevatele RNA- ja DNA-sihtmärkidele.

\* Sisaldab kaatroopset soola. Hoiatusi ja ettevaatusabinõusid vt lk 12.

† Sisaldab säilitusainena naatriumasiidi.



Erinevate amplifitseerimissüsteemide efektiivsus erineb sõltuvalt reaktsiooni nukleiinhapete üldkogusest. Komplekti eluaadid sisaldavad nii tsirkuleerivaid nukleiinhappeid kui ka kandur-RNAd ning kandur-RNA kogus ületab enamikul juhtudel oluliselt tsirkuleerivate nukleiinhapete hulga. Seetõttu ei ole isoleeritud tsirkuleerivate nukleiinhapete kvantifitseerimine UV-neelduvuse määramisega adekvaatne, kuna sellise mõõtmise tulemused määratakse kandur-RNA olemasolu järgi.

Amplifitseerimisreaktsioonide kõrgeima tundlikkuse taseme saavutamiseks võib olla vajalik vähendada Buffer ACL-ile lisatava kandur-RNA hulka.

Oligo-dT primereid kasutavate amplifitseerimissüsteemide puhul ei tohi vabalt tsirkuleerivate nukleiinhapete isoleerimisel lisada kandur-RNAd.

Lisage 310 µg lüofiliseeritud kandur-RNAd sisaldavasse katsutisse 1550 µl Buffer AVE \*-d, et saada 0,2 µg/µl kontsentratsiooniga lahus. Lahustage kandur-RNA põhjalikult, jagage see mugava suurusega alikvootideks ja säilitage seda temperatuuril -30...-15 °C. Ärge külmutage-sulatage kandur-RNA alikvooti üle 3 korra.

Pange tähele, et kandur-RNA ei lahustu Buffer ACL-is. See tuleb esmalt lahustada Buffer AVE-s ja lisada seejärel Buffer ACL-ile.

Arvutage proovide ühe partii jaoks vajalik Buffer ACL-kandur-RNA segu maht vastavalt protokollide tabelitele. Valige samaaegselt töödeldavate proovide arv.

Segage põhjalikult, pöörates katsutit või pudelit 10 korda ümber. Vahu tekkimise vältimiseks ärge kasutage Vortex-segistit.

Märkus. Proovi ettevalmistamise protseduuri on optimeeritud maksimaalselt 1,0 µg kandur-RNA jaoks proovi kohta. Kui on leitud, et vähem kandur-RNAd on teie amplifitseerimissüsteemi

\*Sisaldab säilitusainena naatriumasiidi.

---

jaoks parem, viige Buffer ACL-i sisaldavatesse katsutitesse ainult lahustatud kandur-RNA vajalik hulk. Lisage Buffer ACL-ile iga kandur-RNA mikrogrammi kohta ettevalmistamise kohta 5 µl lahustatud kandur-RNAd. (Vähema kui 1,0 µg kandur-RNA kasutamine proovi kohta võib olla kasulik ja see tuleb valideerida iga konkreetse proovitüübi ja allasuunas analüüsi puhul.)

# Protokoll Breeze: Tsirkuleerivate nukleiinhapete puhastamine 1–5 ml inimese vereplasmast

See protokoll on mõeldud tsirkuleeriva DNA ja RNA puhastamiseks 1–5 ml inimese vereplasmast ja on optimeeritud lühikese käsitlemise ja läbiviimistsükli aja jaoks. QIAamp DSP Circulating Kiti versiooni 1/R3 kasutavate olemasolevate kasutaja poolt valideeritud töövoogude jaoks vt „Protokoll Classic: Tsirkuleerivate nukleiinhapete puhastamine 1–5 ml inimese vereplasmast“ (lk 32).

Enne alustamist pidage silmas järgmist

- Kõik tsentrifuugimisetapid tehakse toatemperatuuril (15–25 °C).
- Lülitage etappide vahel vaakum välja, et tagada protokolliga etappide ajal püsiva, ühtlase vaakumi rakendamine.
- Märkus. Vacuum Pumpi rõhk peab olema vahemikus –800...–900 mbar.
- Laske proovide toatemperatuuril stabiliseeruda.
- Proovi mahu suurendamiseks täpse mahu lähedale kasutage fosfaatpuhvriga füsioloogilist lahust (1–5 ml).
- Seadistage QIAvac 24 Plus, nagu on kirjeldatud lk 19.
- Soojendage veevann või soojendusplakk 3. etapis 50 ml tsentrifuugikatsutitega kasutamiseks temperatuurile 56 °C.
- Laske QIAamp Mini tsentrifuugitavatel kolonnidel enne kasutamist vähemalt 1 tund toatemperatuuril stabiliseeruda.
- Veenduge, et Buffer ACB, Buffer ACW1 ja Buffer ACW2 on ette valmistatud (isopropanooli või etanooli lisamine) vastavalt juhistele lk 24.
- Lisage Buffer AVE-s kasutamiskõlblikuks muudetud kandur-RNA Buffer ACL-ile vastavalt juhistele tabelis Tabel 2.

Tabel 2. 1–5 ml inimese vereplasmaproovide töötlemiseks vajalik Buffer ACL-i ja kandur-RNA (lahustatud Buffer AVE-s) maht.

Plasma ml seadistamine	A	B	C	D	E	Kandur-RNA Buffer AVE-s (µl)
	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	
Proovide arv	Buffer ACL (ml)					
1	0,9	1,8	2,6	3,5	4,4	5,6
2	1,8	3,5	5,3	7,0	8,8	11,3
3	2,6	5,3	7,9	10,6	13,2	16,9
4	3,5	7,0	10,6	14,1	17,6	22,5
5	4,4	8,8	13,2	17,6	22,0	28,1
6	5,3	10,6	15,8	21,1	26,4	33,8
7	6,2	12,3	18,5	24,6	30,8	39,4
8	7,0	14,1	21,1	28,2	35,2	45,0
9	7,9	15,8	23,8	31,7	39,6	50,6
10	8,8	17,6	26,4	35,2	44,0	56,3
11	9,7	19,4	29,0	38,7	48,4	61,9
12	10,6	21,1	31,7	42,2	52,8	67,5
13	11,4	22,9	34,3	45,8	57,2	73,1
14	12,3	24,6	37,0	49,3	61,6	78,8
15	13,2	26,4	39,6	52,8	66,0	84,4
16	14,1	28,2	42,2	56,3	70,4	90,0
17	15,0	29,9	44,9	59,8	74,8	95,6
18	15,8	31,7	47,5	63,4	79,2	101,3
19	16,7	33,4	50,2	66,9	83,6	106,9
20	17,6	35,2	52,8	70,4	88,0	112,5
21	18,5	37,0	55,4	73,9	92,4	118,1
22	19,4	38,7	58,1	77,4	96,8	123,8
23	20,2	40,5	60,7	81,0	101,2	129,4
24	21,1	42,2	63,4	84,5	105,6	135,0

## Protseduur: Protokoll Breeze

1. Pipeteerige 50 ml tsentrifuugikatsutisse (pole kaasas) QIAGEN-i proteinaas K-d, plasmad ja Buffer ACL-i **selles järjekorras**.

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

2. Sulgege kork ja segage 5 korda 2 sekundit pulseerivas pööriseseguris.

Veenduge, et katsutis tekib nähtav keeris. Efektive lüüsi tagamiseks on oluline, et proovi ja Buffer ACL-i on tõhusalt segatud, et saada homogeenne lahus.

Märkus. Ärge sel ajal protseduuri katkestage. Lüüsi inkubeerimise käivitamiseks jätkake kohe 3. etapiga.

3. Inkubeerige temperatuuril 56 °C (±1 °C) 15 (±1) minutit.
4. Asetage katsuti tagasi laborilauale ja keerake kork maha.
5. Lisage katsuti lüsaadile Buffer ACB-d. Valige maht vastavalt 1. etapi seadistusele.

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

6. Sulgege kork ja segage hoolikalt 5 × 2 sekundit järsult keerates.

Veenduge, et katsutis tekib nähtav keeris. Efektive lüüsimise tagamiseks on oluline, et lüsaati ja Buffer ACB-d segatakse põhjalikult, et saada homogeenne lahus.

7. Inkubeerige lüsaadi-Buffer ACB segu katsutis 5 (±1) minutit toatemperatuuril.

8. Sisestage QIAvac 24 Plusi VacConnectorisse QIAamp Mini kolonn (vt „QIAvac 24 Plus vaakumkollektori seadistamine“ lk 19). Sisestage avatud QIAamp Mini kolonni 20 ml kolonni pikendus.

Veenduge, et kolonni pikendus on kindlalt QIAamp Mini kolonni sisestatud, et vältida proovi lekkimist.

Märkus. Hoidke katsuti alles 13. etapi tsentrifugkuivatamiseks.

9. Viige 7. etapi lüsaat ettevaatlikult QIAamp Mini kolonni pikendusse. Lülitage vaakumpump sisse. Kui kõik lüsaadid on täielikult läbi kolonnide viidud, lülitage vaakumpump välja ja viige rõhk 0 mbar juurde. Eemaldage ettevaatlikult kolonni pikendus ja visake ära.

Pange tähele, et lüsaadi suuremate mahtude (ligikaudu 18 ml, kui alustada 5 ml prooviga) QIAamp Mini membraanist vaakumjõuga läbiliikumiseks kulub 20 minutit.

Vaakumrõhu kiireks ja mugavaks eemaldamiseks tuleb kasutada Vacuum Regulatorit (osa QIAvac Connecting Systemist).

Märkus. Ristsaastumise vältimiseks olge ettevaatlik, et mitte viia QIAamp Mini kolonne üksteise naabrusesse kolonni pikenduste eemaldamise ajal.

10. Viige 600 µl Buffer ACW1 QIAamp Mini kolonni. Jätke kolonni kaas lahti ja lülitage sisse vaakumpump. Kui kogu Buffer ACW1 on läbi QIAamp Mini kolonni liikunud, lülitage vaakumpump välja ja viige rõhk 0 mbar juurde.
11. Viige 750 µl Buffer ACW2 QIAamp Mini kolonni. Jätke kolonni kaas lahti ja lülitage sisse vaakumpump. Kui kogu Buffer ACW2 on läbi QIAamp Mini kolonni liikunud, lülitage vaakumpump välja ja viige rõhk 0 mbar juurde.
12. Viige 750 µl etanooli (96–100%) QIAamp Mini kolonni. Jätke kolonni kaas lahti ja lülitage sisse vaakumpump. Kui kogu etanool on läbi tsentrifugitava kolonni viidud, lülitage vaakumpump välja ja viige rõhk 0 mbar juurde.
13. Sulgege QIAamp Mini kolonni kaas. Eemaldage see vaakumkollektorilt ja visake VacConnector ära. Viige QIAamp Mini kolonn puhtasse 2 ml pesemiskatsutisse (8. etapist) ja tsentrifugige täiskiirusel ( $20\,000 \times g$ ; 14 000 p/min) 3 ( $\pm 0,5$ ) minutit.

14. Viige QIAamp Mini kolonn uude 2 ml pesemiskatsutisse. Avage kaas ja inkubeerige koostu 3 minutit toatemperatuuril ja kuivatage membraan täielikult.

15. Viige QIAamp Mini kolonn puhtasse 1,5 ml elueerimiskatsutisse (kaasas) ja visake 14. etapi 2 ml pesemiskatsuti ära. Viige ettevaatlikult 20–150 µl Buffer AVE-d QIAamp Mini kolonni membraani keskosasse. Sulgege kaas ja inkubeerige 3 (±0,5) minutit toatemperatuuril.

NB! Veenduge, et elueerimise Buffer AVE on toatemperatuuril (15–25 °C) stabiliseerunud. Kui elueeritakse väikseid mahte (< 50 µl), tuleb elueerimispuhver viia membraani keskele, et seondunud nukleiinhapped täielikult elueerida.

Elueerimismahud on paindlikud ja neid saab kohandada vastavalt allasuunas rakenduste nõuetele.

Buffer AVE väiksemate mahtude elueerimine annab nukleiinhappe suuremaid kontsentratsioone, kuid võib põhjustada väiksema kogusaagise.

Taastatud eluaadi maht võib olla kuni 5 µl väiksem QIAamp Mini kolonni membraanile kantud eluaadi mahust.

Märkus. Eeldatava väikese NA saagise puhul on elueerimiseks soovitatav kasutada Low-bind katsutiit (pole kaasas).

16. Tsentrifuugige mikrotsentrifuugis täiskiirusel (20 000 × g; 14 000 p/min) 1 minut, et nukleiinhapped elueerida.

# Protokoll Classic: Tsirkuleerivate nukleiinhapete puhastamine 1–5 ml inimese vereplasmast

See protokoll hõlmab QIAamp DSP Circulating NA Kiti käsiraamatu 3. versiooni (R3) muutumatut protokollit kasutamiseks nt olemasolevate kasutaja poolt valideeritud töövoogudega 1–5 ml inimese plasma jaoks.

Enne alustamist pidage silmas järgmist

- Kõik tsentrifuugimisetapid tehakse toatemperatuuril (15–25 °C).
- Lülitage etappide vahel vaakum välja, et tagada protokollit etappide ajal püsiva, ühtlase vaakumi rakendamine.  
Märkus. Vacuum Pumpi rõhk peab olema vahemikus –800...–900 mbar.
- Laske proovide toatemperatuuril stabiliseeruda.
- Proovi mahu suurendamiseks täpse mahu lähedale kasutage fosfaatpuhvriga füsioloogilist lahust (1–5 ml).
- Seadistage QIAvac 24 Plus, nagu on kirjeldatud lk 19.
- Soojendage veevann või soojendusplakk 3. etapis 50 ml tsentrifuugikatsutitega kasutamiseks temperatuurile 60 °C.
- Soojendage soojendusplakk temperatuurile 56 °C, et kasutada seda 14. etapis 2 ml pesemiskatsutitega.
- Laske QIAamp Mini tsentrifuugitavatel kolonnidel enne kasutamist vähemalt 1 tund toatemperatuuril stabiliseeruda.
- Veenduge, et Buffer ACB, Buffer ACW1 ja Buffer ACW2 on ette valmistatud (isopropanooli või etanooli lisamine) vastavalt juhiste lk 24.
- Lisage Buffer AVE-s kasutamiskõlblikuks muudetud kandur-RNA Buffer ACL-ile vastavalt juhistele tabelis Tabel 3.



Tabel 3. 1–5 ml inimese vereplasmaproovide töötlemiseks vajalik Buffer ACL-i ja kandur-RNA (lahustatud Buffer AVE-s) maht.

Plasma ml seadistamine	A	B	C	D	E	Kandur-RNA Buffer AVE-s (µl)
	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	
Proovide arv	Buffer ACL (ml)					
1	0,9	1,8	2,6	3,5	4,4	5,6
2	1,8	3,5	5,3	7,0	8,8	11,3
3	2,6	5,3	7,9	10,6	13,2	16,9
4	3,5	7,0	10,6	14,1	17,6	22,5
5	4,4	8,8	13,2	17,6	22,0	28,1
6	5,3	10,6	15,8	21,1	26,4	33,8
7	6,2	12,3	18,5	24,6	30,8	39,4
8	7,0	14,1	21,1	28,2	35,2	45,0
9	7,9	15,8	23,8	31,7	39,6	50,6
10	8,8	17,6	26,4	35,2	44,0	56,3
11	9,7	19,4	29,0	38,7	48,4	61,9
12	10,6	21,1	31,7	42,2	52,8	67,5
13	11,4	22,9	34,3	45,8	57,2	73,1
14	12,3	24,6	37,0	49,3	61,6	78,8
15	13,2	26,4	39,6	52,8	66,0	84,4
16	14,1	28,2	42,2	56,3	70,4	90,0
17	15,0	29,9	44,9	59,8	74,8	95,6
18	15,8	31,7	47,5	63,4	79,2	101,3
19	16,7	33,4	50,2	66,9	83,6	106,9
20	17,6	35,2	52,8	70,4	88,0	112,5
21	18,5	37,0	55,4	73,9	92,4	118,1
22	19,4	38,7	58,1	77,4	96,8	123,8
23	20,2	40,5	60,7	81,0	101,2	129,4
24	21,1	42,2	63,4	84,5	105,6	135,0

## Protseduur: Protokoll Classic

1. Pipeteerige 50 ml tsentrifuugikatsutisse (pole kaasas) QIAGEN-i proteinaas K-d, plasmad ja Buffer ACL-i selles järjekorras.

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

2. Sulgege kork ja segage 30 sekundit pulseerivas pööriseseguris.

Veenduge, et katsutis tekib nähtav keeris. Efektive lüüsi tagamiseks on oluline, et proovi ja Buffer ACL-i on tõhusalt segatud, et saada homogeenne lahus.

Märkus. Ärge sel ajal protseduuri katkestage. Lüüsi inkubeerimise käivitamiseks jätkake kohe 3. etapiga.

3. Inkubeerige temperatuuril 60 °C ( $\pm 1$  °C) 30 ( $\pm 2$ ) minutit.
4. Asetage katsuti tagasi laborilauale ja keerake kork maha.
5. Lisage katsuti lüsaadile Buffer ACB-d. Valige maht vastavalt 1. etapi seadistusele.

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

6. Sulgege kork ja segage hoolikalt järsult keerates 30 sekundit.

Veenduge, et katsutis tekib nähtav keeris. Efektive lüüsimise tagamiseks on oluline, et lüsaati ja Buffer ACB-d segatakse põhjalikult, et saada homogeenne lahus.

7. Inkubeerige lüsaadi-Buffer ACB segu katsutis jääl 5 ( $\pm 1$ ) minutit.

8. Sisestage QIAvac 24 Plusi VacConnectorisse QIAamp Mini kolonn (vt „QIAvac 24 Plus vaakumkollektori seadistamine“ lk 19). Sisestage avatud QIAamp Mini kolonni 20 ml kolonni pikendus.

Veenduge, et kolonni pikendus on kindlalt QIAamp Mini kolonni sisestatud, et vältida proovi lekkimist.

Märkus. Hoidke katsuti alles 13. etapi tsentrifuugkuivatamiseks.

9. Viige 7. etapi lüsaat ettevaatlikult QIAamp Mini kolonni pikendusse. Lülitage vaakumpump sisse ja rakendage rõhku  $-800\dots-900$  mbar. Kui kõik lüsaadid on täielikult läbi kolonnide viidud, lülitage vaakumpump välja ja viige rõhk 0 mbar juurde. Eemaldage ettevaatlikult kolonni pikendus ja visake ära.

Pange tähele, et lüsaadi suuremate mahtude (ligikaudu 18 ml, kui alustada 5 ml prooviga) QIAamp Mini membraanist vaakumjõuga läbiliikumiseks kulub 20 minutit.

Vaakumrõhu kiireks ja mugavaks eemaldamiseks tuleb kasutada Vacuum Regulatorit (osa QIAvac Connecting Systemist).

Märkus. Ristsaastumise vältimiseks olge ettevaatlik, et mitte viia QIAamp Mini kolonne üksteise naabrusesse kolonni pikenduste eemaldamise ajal.

10. Viige 600 µl Buffer ACW1 QIAamp Mini kolonni. Jätke kolonni kaas lahti ja lülitage sisse vaakumpump. Kui kogu Buffer ACW1 on läbi QIAamp Mini kolonni liikunud, lülitage vaakumpump välja ja viige rõhk 0 mbar juurde.
11. Viige 750 µl Buffer ACW2 QIAamp Mini kolonni. Jätke kolonni kaas lahti ja lülitage sisse vaakumpump. Kui kogu Buffer ACW2 on läbi QIAamp Mini kolonni liikunud, lülitage vaakumpump välja ja viige rõhk 0 mbar juurde.
12. Viige 750 µl etanooli (96–100%) QIAamp Mini kolonni. Jätke kolonni kaas lahti ja lülitage sisse vaakumpump. Kui kogu etanool on läbi tsentrifuugitava kolonni viidud, lülitage vaakumpump välja ja viige rõhk 0 mbar juurde.
13. Sulgege QIAamp Mini kolonni kaas. Eemaldage see vaakumkollektorilt ja visake VacConnector ära. Viige QIAamp Mini kolonn puhtasse 2 ml pesemiskatsutisse (8. etapist) ja tsentrifuugige täiskiirusel ( $20\,000 \times g$ ;  $14\,000$  p/min)  $3 (\pm 0,5)$  minutit.

14. Viige QIAamp Mini kolonn uude 2 ml pesemiskatsutisse. Avage kaas ja inkubeerige koostu temperatuuril 56 °C ( $\pm 1$  °C) 10 ( $\pm 1$ ) minutit, et membraan täielikult kuivatada.
15. Viige QIAamp Mini kolonn puhtasse 1,5 ml elueerimiskatsutisse (kaasas) ja visake 13. etapi 2 ml pesemiskatsuti ära. Viige ettevaatlikult 20–150  $\mu$ l Buffer AVE-d QIAamp Mini kolonni membraani keskosasse. Sulgege kaas ja inkubeerige 3 ( $\pm 0,5$ ) minutit toatemperatuuril.

**NBI** Veenduge, et elueerimise Buffer AVE on toatemperatuuril (15–25 °C) stabiliseerunud. Kui elueeritakse väikseid mahte (< 50  $\mu$ l), tuleb elueerimispuhver viia membraani keskele, et seondunud nukleiinhapped täielikult elueerida.

Elueerimismahud on paindlikud ja neid saab kohandada vastavalt allasuunas rakenduste nõuetele.

Buffer AVE väiksemate mahtude elueerimine annab nukleiinhappe suuremaid kontsentratsioone, kuid võib põhjustada väiksema kogusaagise.

Taastatud eluaadi maht võib olla kuni 5  $\mu$ l väiksem QIAamp Mini kolonni elueerimismahust.

Märkus. Eeldatava väikese NA saagise puhul on elueerimiseks soovitatav kasutada Low-bind katsutit (pole kaasas).

16. Tsentrifugige mikrotsentrifuugis täiskiirusel (20 000  $\times g$ ; 14 000 p/min) 1 minut, et nukleiinhapped elueerida.

# Kvaliteedikontroll

QIAGEN-i ISO sertifikaadiga kvaliteedihalduse süsteemi kohaselt on iga komplekti QIAamp DSP Circulating NA Kit partiid testitud eelnevalt määratud nõuete kohaselt, et tagada toote ühtlane kvaliteet.

## Piirangud

Tsirkuleerivate rakuvabade nukleiinhapete isoleerimise süsteemi toimivusnäitajad on kindlaks määratud järgmiste verevõtukatsutite inimese plasmaproovidega:

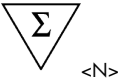












- K2-EDTA (Beckton Dickinson, kataloogi nr 367525)
- PAXgene Blood ccfDNA Tube (PreAnalytiX, kataloogi nr 768115)
- Cell-Free DNA BCT (Streck, kataloogi nr 218962)

Kasutaja vastutab oma laboris QIAGEN-i toimivusnäitajate uuringutes käsitlemata protseduurideks kasutatava süsteemi toimivuse valideerimise eest.

Negatiivse mõju vähendamiseks diagnostilistele tulemustele tuleks kasutada järelrakenduste sobivaid kontrolle. Täiendavaks hindamiseks soovitatakse tehniliste nõuete ühtlustamise rahvusvahelise konverentsi (*International Conference on Harmonisation of Technical Requirements*) (ICH) juhiseid dokumendis ICH Q2 (R1) *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology* (Analüütiliste protseduuride hindamine: test ja meetodika).

Mis tahes saadud diagnostilisi tulemusi tuleb tõlgendada koos muude kliiniliste või laboratoorsete leitudedega.

# Sümbolid

Sümbol	Sümboli selgitus
	Sisaldab reaktiive, millest piisab <N> testide jaoks
	Kõlblik kuni
	<i>In vitro</i> diagnostikaks ettenähtud meditsiiniseade
	Saabumisel
	Avage pärast kättesaamist; säilitage QIAamp Mini tsentrifugeitavaid kolonne temperatuuril 2–8 °C
	Katalooginumber
	Number
	Partii number
	Materjali number
	Komponendid
	Maht
	Lisamine
	Temperatuuripiirangud



Tootja



Kasutamiseks tutvuge kasutusjuhendiga



Pärast etanooli lisamist pudelisse märkige üles praegune kuupäev



Etanool



Pärast isopropanooli lisamist pudelisse märkige üles praegune kuupäev



Isopropanool



Sisaldab



Põhjustab



Guanidiin-tiotsüanaat



Guanidiinhüdrokloriid



BRIJ 58



Globalne kaubaartikli number

---

## Viited

1. Levy, B. (2019) *Prenatal Diagnosis*. Methods in Molecular Biology. 2nd ed. New York: Humana Press.
2. Hahn, S. and Zimmermann, B.G. (2010) Cell-free DNA in maternal plasma: has the size-distribution puzzle been solved? *Clin Chem*. 56, 1210-1211.
3. Anfossi, S., Babayan, A., Pantel, K., and Calin, G. (2018) Clinical utility of circulating non-coding RNAs - an update. *Nat Rev Clin Oncol* 15, 541-563.
4. Babayan, A. and Pantel, K. (2018) Advances in liquid biopsy approaches for early detection and monitoring of cancer. *Genome Med* 10, 21.
5. Terrinoni, A., et al (2019) The circulating miRNAs as diagnostic and prognostic markers. *Clin Chem Lab Med*. 57, 932-953.

## Kontaktteave

Tehnilise toe ja lisateabe saamiseks külastage meie tehnilise toe keskust veebiaadressil [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) või võtke ühendust mõne QIAGEN-i tehnilise toe osakonnaga või kohaliku müügiesindajaga (vt tagakaant või külastage veebilehte [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).



# Tõrkeotsingujuhend

Tõrkeotsingujuhend võib aidata lahendada tekkivaid probleeme. Kontaktteabe leiate tagakaanelt või veebisaidilt [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

## Kommentaariid ja ettepanekud

Eluaadis on vähe nukleiinhapet või see puudub

- |    |  |   |
|----|--|---|
| a) | Stabiliseerimata plasma kasutamine                         | Stabiliseerimata plasmaproovid võivad põhjustada DNA kiiremat degradatsiooni. Soovitame järgida dokumenti CEN/TS 16835-3:2015. Korrake puhastamise protseduuri uute proovidega.   |
| b) | Pikem aeg verevõtu ja plasma ettevalmistamise vahel        | Tuumaga vererakud võivad laguneda ja vabastada plasmasse genoomset DNAd, mis lahjendab sihtmärk-nukleiinhapet.  |
| c) | Üle ühe korra külmutatud ja sulatatud proovid              | Korduvat külmutamist ja sulatamist tuleb vältida, kuna see võib põhjustada DNA degradeerumist. Kasutage alati ainult värsked proove või ühe korra sulatatud proove.   |
| d) | Sihtmärk-DNA väike kontsentratsioon proovides.             | Plasmaproovid jäeti liiga kauaks toatemperatuurile seisma. Korrake puhastamise protseduuri uute proovidega<br><b>Märkus.</b> Mõne inimese plasma rakuvaba NA kontsentratsioon võib olla väike. Sel juhul tuleb kasutada suuremat proovi mahtu ja väikest eluaadi mahtu. |
| e) | Ebapiisav proovi lüüs Buffer ACL-is                        | Kui QIAGEN-i proteinaas K puutus pikema aja jooksul kokku kõrgema temperatuuriga, võib selle aktiivsus väheneda. Korrake protseduuri uute proovide ja värsket QIAGEN-i proteinaas K-ga.   |
| f) | Buffer ACL-kandur-RNA segu ei ole piisavalt segatud        | Segage Buffer ACL-i kandur-RNaga Buffer ACL-kandur-RNA katsutit ettevaatlikult vähemalt 10 korda ümber pöörates.  |
| g) | 96–100% asemel on kasutatud lahjemat etanooli.             | Korrake puhastamise protseduuri uute proovide ja 96–100% etanooliga. Ärge kasutage denatureeritud alkoholi, mis sisaldab muid ühendeid nagu metanool või metüületüülketoon.   |
| h) | Buffer ACB on valesti ettevalmistatud                      | Kontrollige, et Buffer ACB kontsentraat muudeti kasutuskõlblikuks isopropanooli õige mahuga (mitte etanooliga, vt lk 24).   |
| i) | Buffer ACW1 või Buffer ACW2 on valesti ettevalmistatud     | Kontrollige, et Buffer ACW1 ja Buffer ACW2 kontsentraadid lahjendati etanooli õige mahuga (vt lk 24). Korrake puhastamise protseduuri uute proovidega.  |
| j) | Buffer ACW1 või Buffer ACW2 valmistati ette 70% etanooliga | Kontrollige, et Buffer ACW1 ja Buffer ACW2 kontsentraate lahjendati 96–100% etanooliga (vt lk 24). Korrake puhastamise protseduuri uute proovidega.   |

DNA või RNA ei toimi hästi allasuunas ensümaatiliste reaktsioonides

- |    |                                      |  |
|----|--------------------------------------|--|
| a) | Eluaadis on vähe DNAd või see puudub | Võimalikke põhjuseid vt eespool jootisest „Eluaadis on vähe DNAd või see puudub“. Võimalusel suurendage reaktsiooni lisatava eluaadi kogust. |
|----|--------------------------------------|--|

## Kommentaariid ja ettepanekud

- b) Kasutatakse valet elueerimismahtu
- Määrake allasuunas rakenduse jaoks sobiv maksimaalne maht. Vähendage või suurendage vastavalt allasuunas rakendusse lisatud eluaadi mahtu. Elueerimismaht saab proportsionaalselt kohandada.
- Märkus. Buffer AVE väiksemate mahtudega elueerimine annab suuremad nukleiinhappe kontsentratsioonid, kuid võib anda väiksema kogusaagise.
- c) Puhvreid ei ole korralikult segatud
- Pesupuhvri Buffer ACW2 sool ja etanool võivad olla eraldunud, kui see on tsüklite vahel liiga kauaks seisma jätetud. Segage puhvreid alati enne igat tsüklit põhjalikult.
- d) Kandur-RNA põhjustatud häire
- Kui eluaadis sisalduv kandur-RNA häirib allasuunas ensümaatilist reaktsiooni, võib olla vajalik vähendada kandur-RNA kogust või see üldse välja jätta.
- Üldine käsitlemine
- a) Ummistunud QIAamp Mini kolonn
- Vaakumi aega saab pikendada, kui voolukiirust vähendatakse.
- Alternatiivina sulgege VacValve, kui seda kasutatakse, ja eemaldage ettevaatlikult QIAamp Mini kolonnilt kolonni pikenduse, VacConnectori ja VacValve'i koost ilma, et kolonni pikendusse lüsaati satuks.
- Eemaldage QIAamp Mini kolonn vaakumkolektorilt, asetage see 2 ml pesemiskatsutisse ja tsentrifuugige täiskiirusel, kuni proov on täielikult läbi membraani liikunud. Asendage ülejäänud lüsaati sisaldav kolonni pikenduse, VacConnectori ja VacValve'i koost. Lülitage sisse vaakumpump, avage VacValve ja jätkake ülejäänud lüsaadi laadimist.
- Korra ke eespool kirjeldatud protseduuri, kui QIAamp Mini kolonn endiselt ummistub.
- Plasmas võivad olla korduva külmutamise ja sulatamise tõttu tekkinud krüopretsipitaadid. Need võivad QIAamp Mini kolonni ummistada. Ärge kasutage plasmata, mida on külmutatud ja sulatatud üle ühe korra.
- Kui krüopretsipitaadid on nähtavad, muutke proov läbipaistavaks, tsentrifuugides seda 5 minutit 16 000 × g juures.
- b) Varieeruvad elueerimismahud
- Erinevad proovid võivad mõjutada lõppeluaadi mahtu. Taastatud eluaadi maht võib olla kuni 5 µl väiksem QIAamp Mini kolonni elueerimismahust.
- c) Vaakumrõhku –800...–900 mbar ei ole saavutatud
- Vaakumkolektor ei ole tihedalt suletud. Vajutage vaakumkolektori kaanele, kui vaakum on sisse lülitatud. Kontrollige, kas vaakumrõhk saavutatakse.
- QIAvaci kaane tihend on kulunud. Kontrollige visuaalselt korkkraani tihendit ja vajadusel asendage see.
- VacValves on kulunud. Eemaldage kõik VacValvesid ja sisestage VacConnectors otse Lueri pikendustesse. Sisestage QIAamp Mini kolonnid VacConnectors, sulgege kolonnide kaas ja lülitage sisse vaakum. Kontrollige, kas vaakumrõhk saavutatakse. Vajadusel asendage VacValves.
- Vaakumpumba ühendus lekib. Sulgege kõik Lueri pikendused Luer-korkidega ja lülitage sisse vaakumpump. Kontrollige, kas vaakumrõhk on pärast pumba sisselülitamist stabiilne (ja Vacuum Regulatori ventiil on suletud). Vajadusel vahetage välja pumba ja vaakumkolektori vahelised ühendused.
- Kui vaakumrõhku ei saavutata endiselt, vahetage vaakumpump võimsama vastu välja.

# Lisa A: Soovitused vereplasma eraldamiseks ja säilitamiseks

Verevõtukatsutite (nt PAXgene ccfDNA või Streck Cell-Free DNA katsuti) stabiliseerimiseks järgige tootja esitatud plasma eraldamise ja säilitamise juhiseid. Soovitame need säilitustingimused valideerida kombinatsioonis teie spetsiifilise allasuunas rakenduse ja sihtmärgiga.

Stabiliseerimata BCT puhul soovitame järgida dokumenti CEN/TS 16835-3:2015.

Vereproovist tsirkuleerivate, rakuwabade nukleiinhapete isoleerimiseks soovitame järgida seda protokollit, mis hõlmab suure g- jõuga tsentrifuugimist, et eemaldada raku jäägid, vähendades seega proovi genoomse DNA ja RNA hulka.

1. Viige EDTA-ga täisveri BD Vacutainer® katsutites (või muu primaarne verekatsuti, mis sisaldab antikoagulandina EDTA) tsentrifuugi, mis on jahutatud temperatuurini 4 °C väljapööratud rootori ja vastavate anumatega.
2. Tsentrifugeerige vereproove 10 minutit 1900 × g (3000 p/min) juures temperatuuril 4 °C.
3. Aspiriirige ettevaatlikult plasma supernatant ilma plasma-raku vahekihti segamata. Ühest 10 ml primaarsest verekatsutist on võimalik saada ligikaudu 4–5 ml plasmat.  
Märkus. Plasmat saab selles etapis kasutada tsirkuleerivate nukleiinhapete ekstraheerimiseks. Järgnev ülikiiire tsentrifuugimine eemaldage täiendavad raku jäägid ja tsirkuleerivate nukleiinhapete saaste, mis on põhjustatud kahjustatud tuumadega vererakkude genoomse DNA ja RNA poolt.
4. Aspiriiritud plasma viiakse värskesse tsentrifuugimiskatsutisse.
5. Tsentrifugeerige plasmaproove 10 minutit 16 000 × g (püsiva nurgaga rootor) juures temperatuuril 4 °C.  
See eemaldab raku jääkidele kinnitatud täiendavad nukleiinhapet.
6. Eemaldage ettevaatlikult supernatant ja viige uude katsutisse, pelletit häirimata.

- 
7. Kui plasmata kasutatakse samal päeval nukleiinhappe ekstraheerimiseks, säilitage seda täiendavaks töötlemiseks temperatuuril 2–8 °C. Pikemaks säilitamiseks võib stabiliseeritud ja stabiliseerimata verevõtukatsutite plasmaalikoote säilitada temperatuuril –20 °C (sihtmärk on DNA) või –80 °C (sihtmärk on RNA) vähemalt 4 nädalat. Enne plasma kasutamist nukleiinhappe ekstraheerimiseks, sulatage plasmakatsuteid toatemperatuuril.
8. Valikuline Krüopretsipitaatide eemaldamiseks tsentrifuugige plasmaproove 5 minutit 16 000 × g juures (püsiva nurgaga rootor).
- Valikuline Viige supernatant uude katsutisse ja alustage seejärel tsirkuleerivate nukleiinhapete ekstraheerimise protokoll.

---

# Lisa B: RNA käsitlemise üldised märkused

## RNA käsitlemine

Ribonukleasid (Rnaasid) on väga stabiilsed ja aktiivsed ensüümid, mis üldiselt ei vaja toimimiseks kaastegureid. Kuna Rnaase on keeruline inaktiveerida ja isegi minutist piisab, et hävitada RNA, ärge kasutage plast- ega klaasnõusid, eemaldamata kõigepealt võimaliku Rnaasi saastet. Väga hoolikas tuleb olla, et vältida Rnaaside kogemata sisestamist RNA proovi puhastusprotseduuri ajal või järel. RNAasi-vaba keskkonna loomiseks ja säilitamiseks tuleb RNAga töötades eeltöötuse ajal rakendada järgimisi ettevaatusabinõusid ja kasutada ühekordseid ja korduvalt kasutatavaid anumaid ja lahuseid.

## Üldine käsitlemine

RNAga töötades tuleb alati rakendada nõuetekohast mikrobioloogilist aseptilist tehnikat. Kätel ja tolmuosakestel võivad olla bakterid ja hallitus, mis on RNAasi saastumise tavalisim põhjus. Kandke alati lateks- või vinüülkindaid, kui käsitate reaktiive ja RNA-proove, et vältida RNAasi saastumist nahapinnalt või tolmusest laborikeskkonnast. Vahetage sageli kindaid ja hoidke katsutid suletuna, kui see on võimalik. Hoidke puhastatud RNAd jääl, kui alikvoote pipeteeritakse allasuunas rakendusteks.

## Ühekordsed plastnõud

Kogu protseduuri ajal on soovitatav kasutada steriilseid, RNAasi vabasid, ühekordseid polüpropüleenist katsuteid.

# Tellimisteave

Toode	Sisukord	Katalooginr
QIAamp DSP Circulating NA Kit (50)	50 ettevalmistuseks: QIAamp Mini kolonnid, kolonni pikendid, VacConnectors, QIAGEN Proteinase K, reaktiivid, puhvrid ja verevõtukatsutid	61504
Tarvikud		
QIAvac 24 Plus vacuum manifold*	Vaakumkollektor 1–24 tsentrifugeitava kolonni töötlemiseks: QIAvac 24 Plus vacuum manifold, Luer-korgid ja kiirühendused	19413
Vacuum Pump*	Universaalne vaakumpump	84010 [USA ja Kanada] 84000 [Jaapan] 84020 [muu maailm]
QIAvac Connecting System*	Süsteem vaakumkollektori ühendamiseks vaakumpumbaga: sh kandik, jäätmepudelid, voolikud, ühendused, ventiil, möödik ja 24 VacValvesi	19419

\* Kasutamiseks vaakumi protokollidega.

Ajakohase litsentsiteabe ja tootepõhised lahtiütlemised leiате vastavast QIAGEN-i komplekti käsiraamatust või kasutusjuhendist. QIAGEN-i komplekti käsiraamatud ja kasutusjuhendid on saadaval veebilehel [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) või tellimisel QIAGEN-i tehniliselt toelt või kohalikul müügiesindajalt.

# Käsiraamatu redaktsiooniajalugu

Kuupäev	Muudatused
R4 09/2019	Sihotstarbe muutus rakuvabadest nukleiinhapetest ainult inimese plasmaks. Protokoll „Breeze“ lisamine. Ei sisalda uriini ja miRNA protokolle. Ohutusteabe uuendus.

Komplekti QIAamp DSP Circulating NA Kit piiratud litsentsileping

Selle toote kasutamine tähendab, et toote ostja või kasutaja nõustub järgmistega tingimustega.

1. Toodeid tohib kasutada ainult vastavalt tootega kaasas olevatele protokollidele ja sellele käsiraamatule ning ainult koos komplektis sisalduvate komponentidega. QIAGEN ei anna oma intellektuaalse omandi all litsentse komplekti komponentide kasutamiseks või ühendamiseks sellesse komplekti mittekuuluvate komponentidega, välja arvatud toote protokollides, selles käsiraamatus ja veebisaidil [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) kirjeldatud juhtudel. Mõne neist lisaprotokollidest on lisanud QIAGEN-i kasutajate jaoks teised QIAGEN-i kasutajad. QIAGEN pole neid protokolle põhjalikult testinud ega optimeerinud. QIAGEN ei garanteeri, et need ei riku kolmandate osapoolte õigusi.
2. QIAGEN ei anna garantiid, et komplekt ja/või selle kasutus ei riku kolmandate osapoolte õigusi, v.a selgesõnalised litsentsid.
3. Komplekt ja selle osad on litsentsitud ühekordseks kasutuseks ning neid ei tohi korduskasutada, parandada ega edasi müüa.
4. QIAGEN ütleb lahti muudest otsestest või kaudsetest litsentsidest, v.a selgesõnalistest litsentsidest.
5. Komplekti ostja ja kasutaja nõustuvad, et ei tee ise ega luba kellelgi teisel teha midagi, mis võiks kaasa aidata või viia ülaltoodud keelatud toiminguteni. QIAGEN võib selle piiratud litsentsilepingu keelde jõustada mis tahes kohtus ning taotlema tagasi kõik piiratud litsentsilepingu või komplekti ja/või selle komponentidega seotud mis tahes intellektuaalse omandi õiguste jõustamiseks kulunud juurdlus- ja kohtukulud, sh advokaaditasud.

Uuendatud litsentsitingimused leiate veebilehelt [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Kaubamärgid: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp® (QIAGEN Group); BD Vacutainer® (Becton, Dickinson and Company); Tween® (ICI Americas Inc.). Käesolevas dokumendis kasutatud registreeritud nimetused, kaubamärgid jne loetakse seadusega kaitstuks ka juhul, kui need pole eraldi kaubamärkidena tähistatud.

1118364 10/2019 HB-0466-005 © 2019 QIAGEN. Kõik õigused on kaitstud.

