

2019 m. rugsėjis

# „QIAamp<sup>®</sup> DSP Circulating NA Kit“ Naudojimo instrukcijos (vadovas)

1 versija



50

IVD

CE

REF

61504



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden

R4 MAT

1118364LT

# Turinys

Numatytoji paskirtis .....	4
Santrauka ir paaiškinimas .....	4
Procedūros principai.....	5
Mėginių tūriai.....	5
Mėginių lizė .....	7
Adsorbicija ant „QIAamp Mini“ kolonėlės membranos .....	7
Likusių priemaišų pašalinimas.....	7
Grynų nukleorūgščių eliuavimas .....	8
Išėiga ir nukleorūgščių dydis .....	8
Protokolų aprašas .....	9
Pateikiamos medžiagos.....	10
Rinkinio turinys.....	10
Nepateiktos, bet reikalingos medžiagos .....	11
Įspėjimai ir atsargumo priemonės.....	12
Reagentų laikymas ir naudojimas.....	15
Bandinių laikymas ir naudojimas .....	16
Procedūra.....	17
Buferinių tirpalų ir reagentų ruošimas .....	24
Supaprastintasis protokolas. Cirkuliuojančių nukleorūgščių gryninimas iš 1–5 ml žmogaus kraujo plazmos.....	27
Klasikinis protokolas. Cirkuliuojančių nukleorūgščių gryninimas iš 1–5 ml žmogaus kraujo plazmos .....	32

---

Kokybės kontrolė .....	37
Apribojimai.....	37
Simboliai .....	38
Literatūra .....	40
Kontaktinė informacija .....	40
Trikčių šalinimo vadovas .....	41
A priedas. Kraujo plazmos mėginio atskyrimo ir laikymo rekomendacijos.....	43
B priedas. Bendrosios RNR tvarkymo pastabos.....	45
Užsakymo informacija .....	46
Vadovo peržiūros istorija .....	47

# Numatytoji paskirtis

„QIAamp DSP Circulating NA Kit“ yra sistema, kuri naudodama silicio dioksido membranos technologiją („QIAamp“ technologiją) išskiria ir išgrynina cirkuliuojančią neląstelinę DNR ir RNR iš žmogaus kraujo plazmos mėginių.

Šis gaminytis skirtas naudoti tik specialistams, pavyzdžiui, technikams ir gydytojams, susipažinusiems su molekulinės biologijos metodais.

„QIAamp DSP Circulating NA Kit“ yra skirtas tik in vitro diagnostikai.

## Santrauka ir paaiškinimas

Laisvai cirkuliuojančios nukleorūgštys žmogaus plazmoje yra sutinkamos trumpų fragmentų pavidalu (<1000 bp (DNR), <1000 nt (RNR) arba gali būti netgi 20 nt (miRNR) dydžio. Laisvai cirkuliuojančių nukleorūgščių koncentracija žmogaus kraujo plazmoje įprastai yra nedidelė ir įvairių žmonių mėginiuose gali būti 1–100 ng/ml (1–5).

„QIAamp DSP Circulating NA Kit“ leidžia efektyviai išgryninti cirkuliuojančias nukleorūgštis iš žmogaus plazmos. Mėginiai gali būti švieži arba užšaldyti. Naudojant išplėtimo mėgintuvėlius ir vakuuminį apdorojimą su „QIAvac 24 Plus“, pradiniai mėginių tūriai gali būti iki 5 ml, o kintami 20–150 µl eliuavimo tūriai leidžia koncentruoti nukleorūgščių formas, kurių koncentracija yra nedidelė.

Eliuota laisvai cirkuliuojanti genominė DNR arba RNR yra paruošta naudoti toliau atliekamoms procedūroms arba gali būti laikoma. „QIAamp DSP Circulating NA Kit“ efektyviai pašalina baltymus, nukleazes ir kitas priemaišas.

---

## Procedūros principai

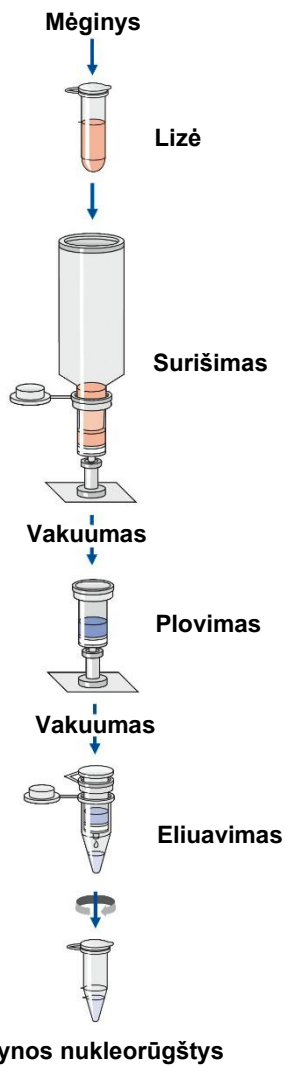
„QIAamp DSP Circulating NA“ procedūrą sudaro 4 veiksmi (lizė, surišimas, plovimas ir eliuavimas) ir ji yra atliekama naudojant „QIAamp Mini“ kolonėles „QIAvac“ sistemoje. Tiksliai atliekama procedūra leidžia sumažinti kryžminę taršą tarp mėginių ir užtikrinti naudotojo saugumą dirbant su galimai užkrėstais mėginiais.

Paprastos procedūros metu mažiau nei per 2 valandas vienu metu galima apdoroti iki 24 mėginių.

### Mėginių tūriai

„QIAamp Mini“ kolonėlės suriša fragmentuotas nukleorūgštis, kurių ilgis gali siekti 20 nt, tačiau išeiga priklauso nuo mėginio tūrio ir cirkuliuojančių nukleorūgščių koncentracijos mėginyje (įprastai 1–100 ng/ml plazmoje). „QIAamp DSP Circulating NA“ procedūra pritaikyta procedūroms, kai mėginio tūris yra iki 5 ml.

**„QIAamp DSP Circulating NA Kit“ procedūra**



1 pav. „QIAamp DSP Circulating NA Kit“ procedūros apžvalga

## Mėginių lizė

Biologiniuose skysčiuose laisvai cirkuliuojančios nukleorūgštys įprastai yra prisijungusios prie baltymų arba yra pūslelių viduje, todėl, siekiant išlaisvinti nukleorūgštis, kad būtų galima atlikti selektyvų surišimą naudojant „QIAamp Mini“ kolonėlę, reikalingas efektyvus lizės etapas. Taigi mėginių lizė vykdoma smarkiai denatūruojančiomis sąlygomis aukštesnėje temperatūroje ir esant proteinazei K bei „Buffer ACL“, o tai užtikrina DNazių ir RNazių inaktyvinimą bei nukleorūgščių atskyrimą nuo rišančių baltymų, lipidų ir pūslelių.

## Adsorbicija ant „QIAamp Mini“ kolonėlės membranos

Siekiant užtikrinti optimalų cirkuliuojančių nukleorūgščių surišimą ant membranos, surišimo sąlygos koreguojamos į lizatą pridendant „Buffer ACB“. Tada lizatai yra perkeliama į „QIAamp Mini“ kolonėlę ir dideliame tūryje cirkuliuojančios nukleorūgštys yra adsorbuojamos silicio dioksido membranoje, kai lizatas yra traukiamas taikant vakuomo slėgį. Druska ir pH sąlygos užtikrina, kad daugelis baltymų ir priemaišų, kurios gali slopinti PGR ir kitas vėliau vykstančias fermentines reakcijas, nebūtų sulaikomos ant „QIAamp Mini“ kolonėlės membranos.

Tam, kad būtų galima atlikti procedūrą, reikalingas vakuomo skirstytuvas (pvz., „QIAvac 24 Plus“ su „QIAvac Connecting System“) ir vakuomo siurblys, galintys sudaryti apie 800–900 mbar vakuumą (pvz., „QIAGEN® Vacuum Pump“). Jei reikia paprastai stebėti vakuomo slėgį ir patogiai išleisti vakuumą, turi būti naudojamas „Vacuum Regulator“ (kuris yra „QIAvac Connecting System“ dalis).

## Likusių priemaišų pašalinimas

Nukleorūgštys lieka prisijungusios prie membranos, o priemaišos yra efektyviai išplaunamos 3 plovimo ciklų metu.

## Grynų nukleorūgščių eliuavimas

Eliuavimas atliekamas naudojant „Buffer AVE“. Vieno veiksmo metu kambario temperatūros „Buffer AVE“ eliuojamos ypač grynos cirkuliuojančios nukleorūgštys. Gali būti naudojamas kintamas 50–150 µl eliuavimo tūris. Jei reikalinga didesnė nukleorūgščių koncentracija, eliuavimo tūrį galima sumažinti iki 20 µl. Kai eliuavimo tūris yra mažesnis nei 50 µl, gaunamo nukleorūgščių eliuato koncentracija yra didesnė, tačiau gali būti mažesnė bendra išeiga.

Atkurtas eliuato tūris gali būti iki 5 µl mažesnis už kolonėlėje naudotą eliuavimo buferinio tirpalo tūrį.

## Išeiga ir nukleorūgščių dydis

Iš biologinių mėginių išskirtų laisvai cirkuliuojančių nukleorūgščių kiekis įprastai yra mažesnis nei 1 µg, todėl jį sunku nustatyti naudojant spektrometrą. Absoliuti cirkuliuojančios DNR ir RNR, gautos iš skirtingų asmenų mėginių, išeiga naudojant „QIAamp DSP Circulating NA Kit“ yra skirtingas, ji taip pat priklauso nuo kitų veiksnių (pvz., tam tikrų ligų). Be to, tikėtina, kad ekstrahuotose nukleorūgštyse esanti nešančioji RNR gali paveikti UV absorbcijos rodmenis (žr. 25 psl.). Išeigai nustatyti rekomenduojama naudoti kiekybinius amplifikacijos metodus.

Naudojant „QIAamp DSP circulating NA Kit“ išgrynintų cirkuliuojančių nukleorūgščių dydžių pasiskirstymą galima patikrinti atliekant elektroforezę agarozės gelyje, hibridizaciją su taikiniui specifiniu žymėtu zonu<sup>5</sup> arba naudojant mikrofluidinį elektroforezės tirpalą (pvz., „Agilent Bioanalyzer“).



---

## Protokolų aprašas

Šiame vadove aprašyti du skirtingi protokolai.

Protokolas „Supaprastintasis protokolas. Cirkuliuojančių nukleorūgščių gryninimas iš 1–5 ml žmogaus kraujo plazmos“ (27 psl.) yra skirtas iki 5 ml plazmos apdoroti po 1 ml ir yra sukurtas siekiant, kad naudotojo darbo ir apdorojimo laikas būtų kuo trumpesnis.

Protokolas „Klasikinis protokolas. Cirkuliuojančių nukleorūgščių gryninimas iš 1–5 ml žmogaus kraujo plazmos“ (32 psl.) yra skirtas iki 5 ml plazmos apdoroti po 1 ml ir yra laikomas nemodifikuotu „QIAamp DSP circulating NA Kit“ vadovo 3 pataisyto leidimo (R3) protokolu.

# Pateikiamos medžiagos

## Rinkinio turinys

„QIAamp DSP Circulating NA Kit“			(50)
Katalogo nr.			61504
Paruošimų skaičius			50
QIAamp Mini	QIAamp Mini columns with Wash Tubes („QIAamp Mini“ kolonėlės su plovimo mėgintuvėliais) (WT) (2 ml)	<b>COL</b>	50
EXT	Column Extenders (kolonėlių pėstuvai) (20 ml)	<b>COL EXT</b>	2 x 25
WT	Wash Tubes (plovimo mėgintuvėliai) (2 ml)	<b>WASH TUBE</b>	50
ET	Elution Tubes (eliuavimo mėgintuvėliai) (1,5 ml)	<b>ELU TUBE</b>	50
VC	VacConnectors	<b>VAC CON</b>	50
ACL*	Lysis Buffer* (lizės buferinis tirpalas)	<b>LYS BUF</b>	220 ml
ACB*	Binding Buffer* (rišamasis buferinis tirpalas) (koncentratas)	<b>BIND BUF CONC</b>	300 ml
ACW1*	Wash Buffer 1* (1 plovimo buferinis tirpalas) (koncentratas)	<b>WASH BUF 1 CONC</b>	19 ml
ACW2†	Wash Buffer 2† (2 plovimo buferinis tirpalas) (koncentratas)	<b>WASH BUF 2 CONC</b>	13 ml
AVE†	Elution Buffer† (eliuavimo buferinis tirpalas) (violetiniai dangteliai)	<b>ELU BUF</b>	5 x 2 ml
PROTK	QIAGEN Proteinase K (QIAGEN proteinazė K)	<b>PROTK</b>	4 x 7 ml
Nešiklis	Carrier RNA (nešančioji RNR) (raudoni dangteliai)	<b>CAR RNA</b>	310 µg
	Vadovas	<b>H B</b>	1

\* Sudėtyje yra chaotropinės druskos. Žr. 12 psl., „Įspėjimai ir atsargumo priemonės“.

† Sudėtyje yra konservanto natrio azido.

# Nepateiktos, bet reikalingos medžiagos

Dirbdami su cheminėmis medžiagomis, visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalata, mūvėkite vienkartinės pirštines ir naudokite apsauginius akinius. Daugiau informacijos rasite atitinkamuose saugos duomenų lapuose (Safety Data Sheets, SDS), kuriuos gali pateikti gaminio tiekėjas.

Įsitikinkite, kad visi instrumentai yra patikrinti ir sukalibruoti pagal gamintojo rekomendacijas.

## Visi protokolai

- Pipetės (reguliuojamos)
- Sterilūs pipečių antgaliai (siekiant išvengti kryžminės taršos, rekomenduojama naudoti pipečių antgalius su aerolio barjeriais)
- Vandens vonelė arba kaitinimo blokas, kuriame galima laikyti 50 ml centrifugos mėgintuvėlius 56 °C arba 60 °C temperatūroje\*
- Kaitinimo blokas arba panašus įrenginys, kuriame galima laikyti 2 ml plovimo mėgintuvėlius 56 °C temperatūroje (tik naudojant klasikinį protokolą)\*
- Mikrocentrifuga (su rotoriumi 2 ml mėgintuvėliams)\*
- 50 ml centrifugos mėgintuvėliai
- „QIAvac 24 Plus vacuum manifold“ (kat. nr. 19413)
- „QIAvac Connecting System“ (kat. nr. 19419) arba lygiavertė
- „Vacuum Pump“ (kat. nr. 84010 [JAV ir Kanada], 84000 [Japonija] arba 84020 [likęs pasaulis]) arba lygiavertis siurblys, galintis sudaryti nuo –900 mbar iki –800 mbar vakuumą
- Etanolis (96–100 %)†
- Izopropanolis (100 %)
- Susmulkintas ledas (tik naudojant „Klasikinis protokolai. Cirkuliuojančių nukleorūgščių gryninimas iš 1–5 ml žmogaus kraujo plazmos“).
- Kai kuriuos mėginius gali reikėti atskiesti fosfatinio buferinio tirpalu (phosphate-buffered saline, PBS)
- Pasirinktinai: VacValves (kat. nr. 19408)

\* Užtikrinkite, kad instrumentai būtų patikrinti ir sukalibruoti laikantis gamintojo rekomendacijų.

† Nenaudokite denatūruoto alkoholio, kuriame yra kitų medžiagų, pvz., metanolio ar metiletilketono.

# Įspėjimai ir atsargumo priemonės

Skirta *in vitro* diagnostikai

Dirbdami su cheminėmis medžiagomis, visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalata, mūvėkite vienkartinės pirštines ir naudokite apsauginius akinius. Daugiau informacijos rasite atitinkamuose saugos duomenų lapuose (safety data sheets, SDS). Jie pateikiami patogiu ir kompaktišku PDF formatu internete [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety) – čia galite rasti, peržiūrėti ir išspausdinti kiekvieno QIAGEN rinkinio ir jų komponentų SDS.

## ĮSPĖJIMAS

Pavojus susižeisti



NEPILKITE baliklio ar rūgštinių tirpalų tiesiai į mėginių ruošimo atliekas.

„Buffer ACL“, „Buffer ACB“ ir „Buffer ACW1“ sudėtyje yra guanidino druskų. Joms jungiantis su balikliu, gali sudaryti intensyviai reaguojančių mišinių.

Jei skystis, kuriame yra šių buferinių tirpalų, išliejamas, valykite tinkamu laboratoriniu plovikliu ir vandeniu. Jei išlietame skystyje yra potencialiai užkrečiamų medžiagų, atitinkamą vietą iš pradžių nuvalykite laboratoriniu plovikliu ir vandeniu, o tada 1 % (v/v) natrio hipochloritu.

„QIAamp DSP Circulating NA Kit“ komponentams taikomos toliau nurodytos pavojingumo ir atsargumo frazės.

## „Buffer ACB“



Sudėtyje yra guanidino tiocianato. Pavojinga! Kenksminga prarijus. Gali būti kenksminga susilietus su oda arba įkvėpus. Smarkiai nudegina odą ir pažeidžia akis. Kenksminga vandens organizmams, sukelia ilgalaikius pakitimus. Kontaktuojama su rūgštimis išskiria labai toksiškas dujas. Mūvėti apsaugines pirštines / dėvėti apsauginius drabužius / naudoti akių (veido) apsaugos priemones. PATEKUS Į AKIS: atsargiai plauti vandeniu kelias minutes. Išimti kontaktinius lęšius, jeigu jie yra ir jeigu lengvai galima tai padaryti. Toliau plauti akis. Nedelsiant skambinti į APSINUODIJIMŲ KONTROLĖS IR INFORMACIJOS BIURĄ arba kreiptis į gydytoją.

## „Buffer ACL“



Sudėtyje yra guanidino tiocianato. Pavojinga! Kenksminga prarijus. Gali būti kenksminga susilietus su oda arba įkvėpus. Smarkiai nudegina odą ir pažeidžia akis. Kenksminga vandens organizmams, sukelia ilgalaikius pakitimus. Kontaktuojama su rūgštimis išskiria labai toksiškas dujas. Mūvėti apsaugines pirštines / dėvėti apsauginius drabužius / naudoti akių (veido) apsaugos priemones. PATEKUS Į AKIS: atsargiai plauti vandeniu kelias minutes. Išimti kontaktinius lęšius, jeigu jie yra ir jeigu lengvai galima tai padaryti. Toliau plauti akis. Nedelsiant skambinti į APSINUODIJIMŲ KONTROLĖS IR INFORMACIJOS BIURĄ arba kreiptis į gydytoją.

## „Buffer ACW1“



Sudėtyje yra guanidino hidroklorido. Įspėjimas! Kenksminga prarijus arba įkvėpus. Dirgina odą. Sukelia smarkų akių dirginimą. Mūvėti apsaugines pirštines / dėvėti apsauginius drabužius / naudoti akių (veido) apsaugos priemones.

## Proteinazė K



Sudėtyje yra proteinazės K. Pavojus! Nestipriai dirgina odą. Įkvėpus gali sukelti alerginę reakciją, astmos simptomus arba apsunkinti kvėpavimą. Stengtis neįkvėpti dulkių / dūmų / dujų / rūko / garų / aerozolio. Mūvėti apsaugines pirštines / dėvėti apsauginius drabužius / naudoti akių (veido) apsaugos priemones. Naudoti kvėpavimo takų apsaugos priemones. Esant sąlyčiui arba jeigu numanomas sąlytis: skambinti į APSINUODIJIMŲ KONTROLĖS IR INFORMACIJOS BIURĄ arba kreiptis į gydytoją. Išveskite žmogų į gryną orą ir padėkite jam patogiai kvėpuoti.

## Reagentų laikymas ir naudojimas

„QIAamp Mini“ kolonėlės turi būti laikomos sausai 2–8 °C temperatūroje. Visi buferiniai tirpalai turi būti laikomi kambario temperatūroje (15–25 °C). „QIAamp Mini“ kolonėlės ir buferiniai tirpalai šiomis sąlygomis gali būti laikomi iki ant rinkinio dėžutės nurodyto galiojimo laiko pabaigos be eksploatacinių savybių pablogėjimo.

Liofilizuota nešančioji RNR gali būti laikoma kambario temperatūroje (15–25 °C) iki ant komponento etiketės nurodyto galiojimo laiko pabaigos. Nešančiąją RNR reikia ištirpinti „Buffer AVE“; ištirpintą nešančiąją RNR reikia nedelsiant supilti į „Buffer ACL“, kaip aprašyta 28 psl., jei naudojate supaprastintąjį protokolą, arba 33 psl., jei naudojate klasikinį protokolą. Šis tirpalas kiekvieną kartą turi būti ruošiamas iš naujo ir 2–8 °C temperatūroje išlieka stabilus iki 48 valandų. Nepanaudota nešančioji RNR, ištirpinta „Buffer AVE“, turi būti užšaldyta alikvotinėmis dalimis nuo –30 °C iki –15 °C temperatūroje.

„QIAamp DSP Circulating NA Kit“ sudėtyje yra paruoštas naudoti proteinazės K tirpalas, kuriame kaip skiediklis naudojamas specialiai pritaikytas laikymo buferinis tirpalas. Proteinazė K išlieka stabili iki ant komponento etiketės nurodyto galiojimo laiko pabaigos, jei yra laikoma (15–25 °C) temperatūroje.

# Bandinių laikymas ir naudojimas

## Kraujo laikymas ir naudojimas

Siekiant išvengti neląstelinių nukleorūgščių irimo ir ląstelinių nukleorūgščių atskyrimo, kraują (pvz., EDTA mėginius) rekomenduojame laikyti ne ilgiau nei 6 val. 2–8 °C temperatūroje. Jei naudojate stabilizuotus kraujo surinkimo mėgintuvėlius, atsižvelkite į gamintojo nurodytas laikymo sąlygas. Rekomenduojame įsitikinti, kad šios laikymo sąlygos dera su konkrečiomis jūsų vėliau atliekamomis procedūromis ir taikiniu.

## Plazmos laikymas ir naudojimas

Kai kaip antikoaguliantas yra naudojama EDTA, ypač dirbant su RNR, plazmos atskyrimą ir nukleorūgšties išskyrimą rekomenduojama atlikti iš karto surinkus kraują. Laikant trumpą laiką, plazmą galima laikyti iki 24 valandų 2–8 °C temperatūroje.

Laikant ilgesnį laiką, alikvotinės plazmos dalys iš stabilizuotų ir nestabilizuotų kraujo surinkimo mėgintuvėlių gali būti laikomos –20 °C temperatūroje (taikynys yra tik DNR) arba –80 °C (taikynys yra DNR ir RNR) mažiausiai 4 savaites.

## Eliuotų nukleorūgščių laikymas

Eliuotos nukleorūgštys surenkamos į 1,5 ml eliuavimo mėgintuvėlius (pateikti). Išgrynintos cirkuliuojančios nukleorūgštys gali būti laikomos iki 24 valandų 2–8 °C temperatūroje. Laikant ilgiau nei 24 valandas, rekomenduojama tolesnėms procedūroms naudojamos DNR laikymo temperatūra yra nuo –30 °C iki –15 °C, o RNR – nuo –90 °C iki –60 °C.



# Procedūra

## Svarbi informacija prieš pradėdant

### **„QIAvac 24 Plus“**

„QIAvac 24 Plus“ yra skirtas greitam ir našiam iki 24 „QIAGEN“ sukamųjų kolonėlių apdorėjimu vakuumu vienu metu. Naudojant vakuumą mėginiai ir plovimo tirpalai yra traukiami pro kolonėlės membranas, o ne centrifuguojami, todėl gryninimo procedūros atliekamos greičiau, o naudotojo darbo laikas yra trumpesnis.

Kartu su „QIAvac Connecting System“, „QIAvac 24 Plus“ galima naudoti kaip srautinę sistemą. Pratekėjęs mėginys surenkamas į atskirą atliekų buteliuką.

Informacijos apie „QIAvac 24 Plus“ priežiūrą žr. „QIAvac 24 Plus“ vadove esančiose naudojimo instrukcijose.

### **„QIAamp Mini“ kolonėlių apdorėjimas naudojant „QIAvac 24 Plus“**

„QIAamp Mini“ apdorojamos „QIAvac 24 Plus“ naudojant vienkartinius „VacConnectors“ ir daugkartinio naudojimo „VacValves“. „VacValves“ (pasirinktinai) yra įstatomi tiesiai į „QIAvac 24 Plus“ skirstytuvo Luerio lizdus ir užtikrina pastovų srautą, kad būtų lengviau vienu metu apdoroti skirtingų tūrių mėginius. Juos reikia naudoti, kai labai skiriasi mėginių srautai, kad būtų užtikrintas pastovus vakuumas. „VacConnectors“ yra vienkartinės jungtys, kurios naudojamos tarp „QIAamp Mini“ kolonėlių ir „VacValves“ arba tarp „QIAamp Mini“ kolonėlių ir „QIAvac 24 Plus“ Luerio lizdų. Jos leidžia išvengti tiesioginio sukamosios kolonėlės ir „VacValve“ sąlyčio gryninimo metu ir taip išvengti kryžminės taršos tarp mėginių. Vieną kartą panaudojus, „VacConnectors“ reikia išmesti. Dėl didelių naudojamų tirpalų tūrių reikalingą „QIAvac Connecting System“ (arba panaši sistema su atliekų buteliais) (žr. 2 pav).

## „QIAvac 24 Plus“ naudojimo instrukcijos

- „QIAvac 24 Plus“ visada saugiai pastatykite ant stalviršio arba darbo vietoje. Nukritęs „QIAvac 24 Plus“ skirstytuvą gali įskilti.
- „QIAvac 24 Plus“ visada turi būti švarus ir sausas. Valymo procedūrų aprašymą žr. „QIAvac 24 Plus“ vadove.
- „QIAvac 24 Plus“ komponentai nėra atsparūs kai kuriems tirpikliams (1 lentelė). Šiems tirpikliams išsiliejus ant įrenginio, kruopščiai nuplaukite vandeniu.
- Tam, kad užtikrintumėte pastoviai gerus darbo rezultatus, netepkite silikonu arba vakuominiu tepalu jokios „QIAvac 24 Plus“ skirstytuvo dalies.
- Dirbdami šalia vakuomo skirstytuvo, kuriame yra sudarytas slėgis, visada būkite atsargūs ir užsidėkite apsauginius akinius.
- Norėdami gauti informacijos apie atsargines arba pakaitines dalis, kreipkitės į „QIAGEN“ techninės pagalbos skyrių arba vietinį platintoją.
- Vakuomo slėgis yra slėgio vakuomo skirstytuvo viduje ir atmosferos slėgio (standartinis atmosferos slėgis yra 1013 milibarų arba 760 mm Hg) skirtumas, kurį galima išmatuoti naudojant „QIAvac Connecting System“ (žr. 2 pav). Protokolai reikalauja naudoti vakuomo siurbį, galintį sudaryti nuo –900 iki –800 mbar slėgį (pvz., „QIAGEN Vacuum Pump“). Turi būti vengiama sudaryti didesnį vakuomo slėgį. Naudojant mažesnį, nei rekomenduojama, vakuomo slėgį, gali sumažėti nukleorūgščių išeiga ir grynumas bei padidėti rizika, kad užsikimš membranos.



2 pav. „QIAvac 24 Plus“, „QIAvac Connecting System“ ir „Vacuum Pump“

1 lentelė. „QIAvac 24 Plus“ cheminio atsparumo savybės

Atsparus		Neatsparus
Acto rūgštis	Chaotropinės druskos	Benzenas
Chromato rūgštis	Koncentruoti alkoholiai	Fenolis
Natrio dodecilsulfatas	Natrio chloridas	Chloroformas
„Tween® 20“	Karbamidas	Toluenas
Chloro baliklis	Druskos rūgštis	Eteriai
Natrio hidroksidas		

### „QIAvac 24 Plus vacuum manifold“ įrengimas

1. Prijunkite „QIAvac 24 Plus“ prie vakuumo šaltinio. Jei naudojate „QIAvac Connecting System“, prijunkite sistemą prie skirstytuvo ir vakuumo šaltinio, kaip aprašyta „QIAvac 24 Plus“ vadovo A priede.

2. Įstatykite „VacValve“ (pasirinktinai) į visus „QIAvac 24 Plus“ Luerio lizdus, kuriuos naudosite (žr. 3 pav). Uždarykite nenaudojamus Luerio lizdus naudodami Luerio kaištelius arba uždarykite įstatytą „VacValve“.

Siekiant užtikrinti pastovų vakuumą, jei mėginių srautai labai skiriasi, turi būti naudojami „VacValves“.

3. Į kiekvieną „VacValve“ įstatykite „VacConnector“ (žr. 3 pav).

Šį veiksmą atlikite prieš pat pradėdami gryninimą, kad į „VacConnectors“ nepatektų teršalai, kurių gali būti ore.

4. Įstatykite „QIAamp Mini“ kolonėles į skirstytuve esančias „VacConnectors“ (žr. 3 pav).

**Pastaba.** Neišmeskite lizdinėje pakuotėje esančio plovimo mėgintuvėlio, kurį naudosite atlikdami gryninimo protokolą.

5. Įstatykite kolonėlių plėstuvus (20 ml) į kiekvieną „QIAamp Mini“ kolonėlę (žr. 3 pav).

**Pastaba.** Tam, kad išvengtumėte mėginio nuotėkio, įsitikinkite, kad kolonėlės plėstuvus yra gerai įstatytas į „QIAamp Mini“ kolonėlę.

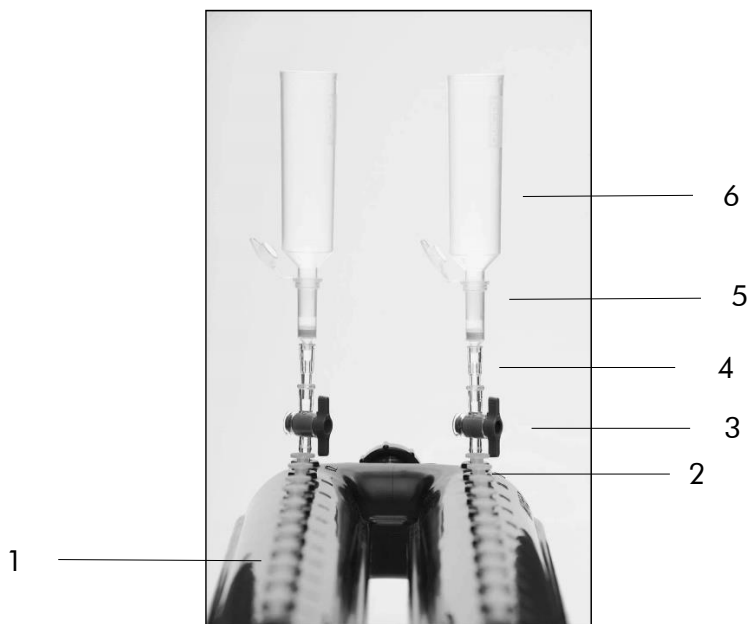
- 
6. Informacijos apie nukleorūgščių gryninimą žr. protokoluose pateiktas instrukcijas. Panaudoję, tinkamai išmeskite „VacConnectors“.

Kol sudaromas vakuumas, palikite „QIAamp Mini“ kolonėlės dangtelį atidarytą. Išjunkite vakuumą tarp vykdomų veiksmų, kad apdorojimo metu būtų taikomas pastovus vienodas vakuumas. Norint greičiau išleisti vakuumą turi būti naudojamas „Vacuum Regulator“ („QIAvac Connecting System“ dalis).

**Pastaba.** Kai mėginys yra visiškai ištrauktas pro sukamąją kolonėlę, kiekvieną „VacValve“ galima uždaryti atskirai, tokiu būdu vienu metu galima apdoroti skirtingo tūrio arba klampumo mėginius.

7. Apdorojus mėginius, išvalykite „QIAvac 24 Plus“ (žr. „*QIAvac 24 Plus*“ vadovo skirsni „QIAvac 24 Plus“ valymas ir dekontaminacija“).

**Pastaba.** „Buffer ACL“, „Buffer ACB“ ir „Buffer ACW1“ nėra suderinami su dezinfekuojančiomis medžiagomis, kurių sudėtyje yra baliklio. Žr. 12 psl., „Įspėjimai ir atsargumo priemonės“.

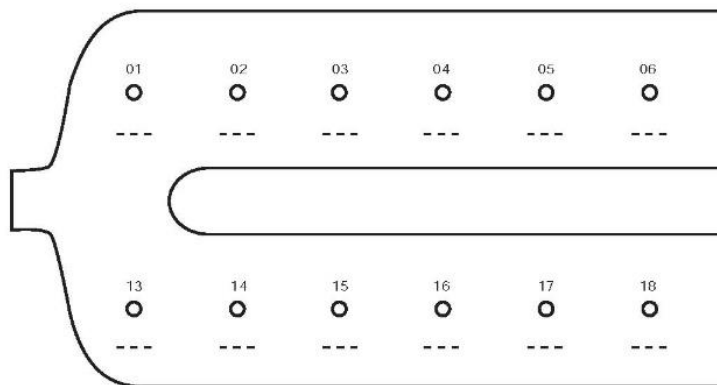


3 pav. „QIAvac 24 Plus“ su „QIAamp Mini“ kolonėlėmis įrengimas naudojant „VacValves“, „VacConnectors“ ir kolonėlių plėstuvus.

- |   |                          |
|---|--------------------------|
| 1 „QIAvac 24 Plus vacuum manifold“                            | 4 „VacConnector“         |
| 2 „QIAvac 24 Plus“ Luerio lizdas (uždarytas Luerio kaišteliu) | 5 „QIAamp Mini“ kolonėlė |
| 3 „VacValve“**  | 6 Kolonėlės plėstuvus    |

Tam, kad nesumaišytumėte mėginių, rekomenduojame pažymėti mėgintuvėlius ir „QIAamp Mini“ kolonėles, naudojamas su „QIAvac 24 Plus“ vakuumo sistema, laikantis schemos, pavaizduotos 4 pav. Šį paveikslėlį galima nukopijuoti ir ant jo užrašyti mėginių pavadinimus.

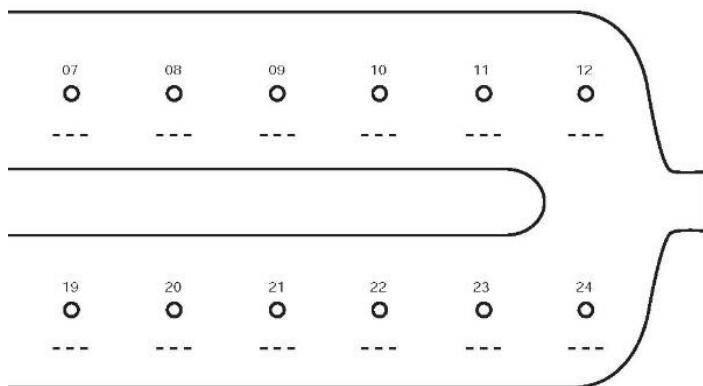
\* Įsigyjama atskirai.



Data: \_\_\_\_\_

Naudotojas: \_\_\_\_\_

Procedūros ID: \_\_\_\_\_



**4 pav. Mėgintuvėlių ir „QIAamp Mini“ kolonėlių, naudojamų „QIAvac 24 Plus“ vakuumo sistemoje, ženklavimo schema**

# Buferinių tirpalų ir reagentų ruošimas

## „Buffer ACB“

Prieš naudodami, pridėkite 200 ml izopropanolio (100 %) į 300 ml „Buffer ACB“ koncentratą, kad gautumėte 500 ml „Buffer ACB“. Pridėję izopropanolio, gerai sumaišykite.

## „Buffer ACW1“\*\*

Prieš naudodami, pridėkite 25 ml etanolio (96–100 %) į 19 ml „Buffer ACW1“ koncentrato, kad gautumėte 44 ml „Buffer ACW1“. Įleidę etanolį, gerai sumaišykite.

## „Buffer ACW2“†

Prieš naudodami, pridėkite 30 ml etanolio (96–100 %) į 13 ml „Buffer ACW2“ koncentrato, kad gautumėte 43 ml „Buffer ACW2“. Įleidę etanolį, gerai sumaišykite.

## Nešančiosios RNR įleidimas į „Buffer ACL“\*\*

Nešančiosios RNR paskirtis yra dvejopa. Pirma, ji pagerina nukleorūgščių prijungimą prie „QIAamp Mini“ membranos, ypač tada, kad mėginyje yra labai mažai taikinių molekulių. Antra, pridėjus didelį nešančiosios RNR kiekį, sumažinama RNR irimo rizika tais retais atvejais, kai neįvyksta RNazės molekulių denatūracija, vykstanti dėl „Buffer ACL“ esančių chaotropinių druskų ir ploviklių.

Pateikto liofilizuotos nešančiosios RNR kiekio pakanka su rinkiniu pateiktam „Buffer ACL“ tūriui. Rekomenduojama nešančiosios RNR koncentracija buvo pakoreguota taip, kad „QIAamp DSP Circulating NA“ protokolą būtų galima naudoti kaip bendrąją gryninimo sistemą, suderinamą su daugeliu skirtingų amplifikacijos sistemų, ir kuri būtų tinkama daugeliui RNR ir DNR taikinių.

\* Sudėtyje yra chaotropinės druskos. Įspėjimus ir atsargumo priemones žr. 12 psl.

† Sudėtyje yra konservanto natrio azido.



Įvairių amplifikacijos sistemų našumas gali skirtis, atsižvelgiant į bendrą reakcijoje esančių nukleorūgščių kiekį. Naudojant rinkinį gautų eliatų sudėtyje yra cirkuliuojančių nukleorūgščių ir nešančiosios RNR kiekis daugeliu atvejų bus daug didesnis už cirkuliuojančių nukleorūgščių kiekį. Todėl kiekybinis išskirtų cirkuliuojančių nukleorūgščių įvertinimas pagal UV absorbcijos rodmenis nebus tinkamas, nes tokių matavimų rezultatus lemia esama nešančioji RNR.

Siekiant aukščiausio lygio jautrumo amplifikacijos reakcijų metu, gali reikėti sumažinti į „Buffer ACL“ pridėtos nešančiosios RNR kiekį.

Dirbant su amplifikacijos sistemomis, kuriose naudojami oligo dT pradmenys, laisvai cirkuliuojančių nukleorūgščių išskyrimo metu nešančiosios RNR pridėti nereikia.

Įlašinkite 1550 µl „Buffer AVE“\* į mėgintuvėlį su 310 µg liofilizuotos nešančiosios RNR, kad gautumėte 0,2 µg/µl koncentracijos tirpalą. Gerai ištirpinkite nešančiąją RNR, padalykite į patogaus dydžio alikvotines dalis ir laikykite temperatūroje nuo –30 °C iki –15 °C. Nekartokite nešančiosios RNR alikvotinių dalių užšaldymo ir atšildymo ciklų daugiau nei 3 kartus.

Atkreipkite dėmesį, kad nešančioji RNR netirpsta „Buffer ACL“. Pirmiausia ją reikia ištirpinti „Buffer AVE“, o tada įleisti į „Buffer ACL“.

Vadovaudamiesi protokoluose pateiktomis lentelėmis, apskaičiuokite „Buffer ACL“ ir nešančiosios RNR tūrį, reikalingą mėginių partijai. Pasirinkite, kiek mėginių bus apdorojama vienu metu.

Švelniai sumaišykite apversdami mėgintuvėlį arba buteliuką 10 kartų. Nemaišykite sūkurinėje maišyklėje, kad nesuputotų.

\* Sudėtyje yra konservanto natrio azido.

---

**Pastaba.** Mėginio ruošimo procedūra pritaikyta mėginiams, kuriuose yra ne daugiau nei 1,0 µg nešančiosios RNR. Jei jūsų amplifikacijos sistemoje rekomenduojama naudoti mažesnį RNR kiekį, į mėgintuvėlius su „Buffer ACL“ perkelkite tik reikiamą ištirpusios nešančiosios RNR kiekį. Kiekvienam ruošiant reikalingam nešančiosios RNR mikrogramui į „Buffer ACL“ įlašinkite 5 µl ištirpusios nešančiosios RNR. (Gali būti naudinga naudoti mažesnį nei 1,0 µg nešančiosios RNR kiekį viename mėginyje, tačiau šią galimybę reikia įvertinti kiekvienam konkrečiam mėginio tipui ir vėliau atliekamam tyrimui.)

# Supaprastintasis protokolas. Cirkuliuojančių nukleorūgščių gryninimas iš 1–5 ml žmogaus kraujo plazmos

Šis protokolas skirtas cirkuliuojančiai DNR ir RNR gryninti iš 1–5 ml žmogaus kraujo plazmos ir yra sukurtas siekiant, kad naudotojo darbo ir apdorojimo laikas būtų kuo trumpesnis. Informacijos apie esamas naudotojo patvirtintas darbų eigas naudojant „QIAamp DSP circulating Kit“ 1/R3 versiją žr. „Klasikinis protokolas. Cirkuliuojančių nukleorūgščių gryninimas iš 1–5 ml žmogaus kraujo plazmos“ (32 psl.).

## Svarbi informacija prieš pradėdant

- Visi centrifugavimo veiksmai atliekami kambario temperatūroje (15–25 °C).
- Išjunkite vakuumą tarp veiksmų, kad protokolo veiksmų metu būtų taikomas pastovus vienodas vakuumas.
- **Pastaba.** „Vacuum Pump“ slėgis turi būti nuo –900 mbar iki –800 mbar.
- Palaukite, kol mėginiai pasieks kambario temperatūrą.
- Naudokite fosfatinį buferinį tirpalą, kad mėginio tūris būtų kuo artimesnis tiksliam tūriui (nuo 1 ml iki 5 ml).
- Paruoškite „QIAvac 24 Plus“, kaip aprašyta 19 psl.
- Pakaitinkite vandens vonelę arba kaitinimo bloką, kurie skirti 3 veiksmuose naudojamiems 50 ml centrifugos mėgintuvėliams, iki 56 °C temperatūros.
- Prieš naudodami, bent 1 valandą palaikykite „QIAamp Mini“ sukamąsias kolonėles kambario temperatūroje.
- Įsitikinkite, kad „Buffer ACB“, „Buffer ACW1“ ir „Buffer ACW2“ buvo paruošti ( pridėtas izopropanolis arba etanolis) vadovaujantis 24 psl. pateiktais nurodymais.
- Vadovaudamiesi 2 lentelė pateiktais nurodymais, į „Buffer ACL“ pridėkite nešančiosios RNR, atskiestos „Buffer AVE“.

2 lentelė. „Buffer ACL“ ir nešančiosios RNR (ištirpintos „Buffer AVE“) tūris, reikalingas 1–5 ml žmogaus kraujo plazmos mėginių apdoroti

Konfigūracija, plazmos ml	A	B	C	D	E	Nešančioji RNR, esanti „Buffer AVE“ (μl)
	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	
Mėginių skaičius	„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

## Procedūra. Supaprastintasis protokolas

1. Šia nurodyta tvarka pipete perkelkite „QIAGEN Proteinase K“, plazmą ir „Buffer ACL“ į 50 ml centrifugos mėgintuvėlį (nepateiktas).

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

2. Uždarykite dangtelį ir sumaišykite sūkurinėje maišyklėje 5 x 2 sekundes.

Įsitikinkite, kad mėgintuvėlyje susidaro matomas sūkurys. Tam, kad būtų užtikrina efektyvi lizė, būtina kruopščiai sumaišyti mėginį ir „Buffer ACL“, tokiu būdu gaunant vienalytį tirpalą.

**Pastaba.** Nenutraukite procedūros šiuo metu. Nedelsdami pereikite prie 3 veiksmo, kad pradėtumėte lizės inkubavimą.

3. Inkubuokite 56 °C (±1 °C) temperatūroje 15 (±1) minučių.
4. Padėkite mėgintuvėlį atgal ant laboratorinio stalo ir atsukite dangtelį.
5. Pridėkite „Buffer ACB“ į mėgintuvėlyje esantį lizatą. Pasirinkite tūrį, atsižvelgdami į 1 veiksmo metu naudotą konfigūraciją.

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

6. Uždarykite dangtelį ir gerai sumaišykite sūkurinėje maišyklėje 5 x 2 sekundes.

Įsitikinkite, kad mėgintuvėlyje susidaro matomas sūkurys. Tam, kad būtų užtikrina efektyvi lizė, būtina kruopščiai sumaišyti lizatą ir „Buffer ACB“, tokiu būdu gaunant vienalytį tirpalą.

7. 5 ( $\pm 1$ ) minutes inkubuokite mėgintuvėlyje esantį lizato ir „Buffer ACB“ mišinį kambario temperatūroje.

8. Įstatykite „QIAamp Mini“ kolonėlę į „VacConnector“, esančią „QIAvac 24 Plus“ (žr. „QIAvac 24 Plus vacuum manifold“ įrengimas“, 19 psl.). Įstatykite 20 ml kolonėlės plėstuvą į atvirą „QIAamp Mini“ kolonėlę.

Įsitikinkite, kad kolonėlės plėstuvas yra gerai įstatytas į „QIAamp Mini“ kolonėlę, kad išvengtumėte mėginio nuotėkio.

**Pastaba.** Saugokite plovimo mėgintuvėlį sausam sukimui 13 veiksmo metu.

9. Atsargiai pridėkite 7 veiksmo metu gautą lizatą į „QIAamp Mini“ kolonėlės plėstuvą. Ijunkite vakuomo siurbį. Kai visi lizatai bus visiškai ištraukti pro kolonėles, išjunkite vakuomo siurbį ir sulyinkite slėgį iki 0 mbar. Atsargiai išimkite ir išmeskite kolonėlės plėstuvą.

Atkreipkite dėmesį, kad gali užtrukti iki 20 minučių, kol dideli mėginio lizato tūriai (apie 18 ml pradant nuo 5 ml mėginio) praeis pro „QIAamp Mini“ membraną veikiami vakuomo jėgos.

Norint greičiau ir patogiau išleisti vakuumą turi būti naudojamas „Vacuum Regulator“ („QIAvac Connecting System“ dalis).

**Pastaba.** Siekdami apsisaugoti nuo kryžminės taršos, venkite „QIAamp Mini“ kolonėlių sąlyčio, kol yra nuimti kolonėlių plėstuvai.

10. Pridėkite 600  $\mu$ l „Buffer ACW1“ į „QIAamp Mini“ kolonėlę. Palikite kolonėlės dangtelį atidarytą ir įjunkite vakuomo siurbį. Po to, kad visas „Buffer ACW1“ buvo ištrauktas pro „QIAamp Mini“ kolonėlę, išjunkite vakuomo siurbį ir sulyinkite slėgį iki 0 mbar.

11. Pridėkite 750  $\mu$ l „Buffer ACW2“ į „QIAamp Mini“ kolonėlę. Palikite kolonėlės dangtelį atidarytą ir įjunkite vakuomo siurbį. Po to, kad visas „Buffer ACW2“ buvo ištrauktas pro „QIAamp Mini“ kolonėlę, išjunkite vakuomo siurbį ir sulyinkite slėgį iki 0 mbar.

12. Pridėkite 750  $\mu$ l etanolio (96–100 %) į „QIAamp Mini“ kolonėlę. Palikite kolonėlės dangtelį atidarytą ir įjunkite vakuomo siurbį. Po to, kai visas etanolis buvo ištrauktas pro sukamąją kolonėlę, išjunkite vakuomo siurbį ir sulyinkite slėgį iki 0 mbar.

13. Uždarykite „QIAamp Mini“ kolonėlės dangtelį. Išimkite ją iš vakuumo skirstytuvo ir išmeskite „VacConnector“. Įstatykite „QIAamp Mini“ kolonėlę į švarų 2 ml plovimo mėgintuvėlį (kurį naudojote atlikdami 8 veiksmą) ir centrifuguokite visu greičiu (20 000 x g; 14 000 aps./min.) 3 (±0,5) minutes.
14. Įstatykite „QIAamp Mini“ kolonėlę į naują 2 ml plovimo mėgintuvėlį. Atidarykite dangtelį ir inkubuokite 3 minutes kambario temperatūroje, kad membrana visiškai išdžiūtų.
15. Įstatykite „QIAamp Mini“ kolonėlę į švarų 1,5 ml eliuavimo mėgintuvėlį (pateiktas) ir išmeskite 2 ml plovimo mėgintuvėlį, kurį naudojote atlikdami 14 veiksmą. Atsargiai pridėkite 20–150 µl „Buffer AVE“ į „QIAamp Mini“ kolonėlės centrą. Uždarykite dangtelį ir inkubuokite kambario temperatūroje 3 (±0,5) minutes.

**Svarbu.** Įsitinkinkite, kad eliuavimo „Buffer AVE“ temperatūra pasiekė kambario temperatūrą (15–25 °C). Jei eliuavimas atliekamas naudojant mažus tūrius (<50 µl), eliuavimo buferinį tirpalą reikia leisti membranos centre, kad būtų eliuuoti visos surištos nukleorūgštys.

Eliuavimo tūris yra kintamas ir gali būti pritaikomas pagal vėliau atliekamų procedūrų reikalavimus.

Kai eliuavimui naudojamas mažesnis „Buffer AVE“ tūris, gaunama didesnė nukleorūgščių koncentracija, tačiau bendra išeiga gali būti mažesnė.

Atkurtas eliuato tūris gali būti iki 5 µl mažesnis už ant „QIAamp Mini“ kolonėlės membranos naudotą eliuavimo tūrį.

**Pastaba.** Kai laukiama NR išeiga yra maža, eliuavimui rekomenduojama naudoti mažai surišantį mėgintuvėlį (nepateiktas).

16. Norėdami eliuuoti nukleorūgštis, centrifuguokite mikrocentrifugoje visu greičiu (20000 x g; 14 000 aps./min.) 1 minutę.

# Klasikinis protokolas. Cirkuliuojančių nukleorūgščių gryninimas iš 1–5 ml žmogaus kraujo plazmos

Šis protokolas yra laikomas nemodifikuotu „QIAamp DSP circulating NA Kit“ vadovo 3 pataisyto leidimo (R3) protokolu ir yra skirtas naudotojo patvirtintoms darbų eigoms, pavyzdžiui, dirbant su 1–5 ml žmogaus plazmos.

## Svarbi informacija prieš pradėdant

- Visi centrifugavimo veiksmai atliekami kambario temperatūroje (15–25 °C).
- Išjunkite vakuumą tarp veiksmų, kad protokolo veiksmų metų būtų taikomas pastovus vienodas vakuumas.

**Pastaba.** „Vacuum Pump“ slėgis turi būti nuo –900 mbar iki –800 mbar.

- Palaukite, kol mėginiai pasieks kambario temperatūrą.
- Naudokite fosfatinį buferinį tirpalą, kad mėginio tūris būtų kuo artimesnis tiksliam tūriui (nuo 1 ml iki 5 ml).
- Paruoškite „QIAvac 24 Plus“, kaip aprašyta 19 psl.
- Pakaitinkite vandens vonelę arba kaitinimo bloką, kurie skirti 3 veiksmuose naudojamiems 50 ml centrifugos mėgintuvėliams, iki 60 °C temperatūros.
- Pakaitinkite kaitinimo bloką, kuris skirtas 14 veiksmuose naudojamiems 2 ml plovimo mėgintuvėliams, iki 56 °C temperatūros.
- Prieš naudodami, mažiausiai 1 valandą palaikykite „QIAamp Mini“ sukamąsias kolonėles kambario temperatūroje.
- Įsitinkinkite, kad „Buffer ACB“, „Buffer ACW1“ ir „Buffer ACW2“ buvo paruošti ( pridėtas izopropanolis arba etanolis) vadovaujantis 24 psl. pateiktais nurodymais.
- Vadovaudamiesi 3 lentelė pateiktais nurodymais, į „Buffer ACL“ pridėkite nešančiosios RNR, atskiestos „Buffer AVE“.



3 lentelė. „Buffer ACL“ ir nešančiosios RNR (ištirpintos „Buffer AVE“) tūris, reikalingas 1–5 ml žmogaus kraujo plazmos mėginių apdoroti

Konfigūracija, plazmos ml	A	B	C	D	E	Nešančioji RNR, esanti „Buffer AVE“ (μl)
	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	
<b>Mėginių skaičius</b>	<b>„Buffer ACL“ (ml)</b>					
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

## Procedūra. Klasikinis protokolai

- Šia nurodyta tvarka pipete perkelkite „QIAGEN Proteinase K“, plazmą ir „Buffer ACL“ į 50 ml centrifugos mėgintuvėlį (nepateiktas).

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

- Uždarykite dangtelį ir 30 sekundžių maišykite sūkurinėje maišyklėje.

Įsitikinkite, kad mėgintuvėlyje susidaro matomas sūkurys. Tam, kad būtų užtikrina efektyvi lizė, būtina kruopščiai sumaišyti mėginį ir „Buffer ACL“, tokiu būdu gaunant vienalytį tirpalą.

**Pastaba.** Nenutraukite procedūros šiuo metu. Nedelsdami pereikite prie 3 veiksmo, kad pradėtumėte lizės inkubavimą.

- Inkubuokite 60 °C (±1 °C) temperatūroje 30 (±2) minučių.
- Padėkite mėgintuvėlį atgal ant laboratorinio stalo ir atsukite dangtelį.
- Pridėkite „Buffer ACB“ į mėgintuvėlyje esantį lizatą. Pasirinkite tūrį, atsižvelgdami į 1 veiksmo metu naudotą konfigūraciją.

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

- Uždarykite dangtelį ir gerai maišykite sūkurinėje maišyklėje 30 sekundžių.

Įsitikinkite, kad mėgintuvėlyje susidaro matomas sūkurys. Tam, kad būtų užtikrina efektyvi lizė, būtina kruopščiai sumaišyti lizatą ir „Buffer ACB“, tokiu būdu gaunant vienalytį tirpalą.

- Inkubuokite mėgintuvėlyje esantį lizato ir „Buffer ACB“ mišinį 5 (±1) minutes ant ledo.

- Įstatykite „QIAamp Mini“ kolonėlę į „VacConnector“, esančią „QIAvac 24 Plus“ (žr. „QIAvac 24 Plus vacuum manifold“ įrengimas“, 19 psl.). Įstatykite 20 ml kolonėlės plėstuvą į atvirą „QIAamp Mini“ kolonėlę.

Įsitikinkite, kad kolonėlės plėstuvai yra gerai įstatyti į „QIAamp Mini“ kolonėlę, kad išvengtumėte mėginio nuotėkio.

**Pastaba.** Saugokite plovimo mėgintuvėlių sausam sukimui 13 veiksmo metu.

- Atsargiai pridėkite 7 veiksmo metu gautą lizatą į „QIAamp Mini“ kolonėlės plėstuvą. Įjunkite vakuomo siurbį naudodami nuo –900 mbar iki –800 mbar slėgį. Kai visi lizatai bus visiškai ištraukti pro kolonėles, išjunkite vakuomo siurbį ir sulyginkite slėgį iki 0 mbar. Atsargiai išimkite ir išmeskite kolonėlės plėstuvą.

Atkreipkite dėmesį, kad gali užtrukti iki 20 minučių, kol dideli mėginio lizato tūriai (apie 18 ml pradant nuo 5 ml mėginio) praeis pro „QIAamp Mini“ membraną veikiami vakuomo jėgos.

Norint greičiau ir patogiau išleisti vakuumą turi būti naudojamas „Vacuum Regulator“ („QIAvac Connecting System“ dalis).

**Pastaba.** Siekdami apsisaugoti nuo kryžminės taršos, venkite „QIAamp Mini“ kolonėlių sąlyčio, kol yra nuimti kolonėlių plėstuvai.

- Pridėkite 600 µl „Buffer ACW1“ į „QIAamp Mini“ kolonėlę. Palikite kolonėlės dangtelį atidarytą ir įjunkite vakuomo siurbį. Po to, kad visas „Buffer ACW1“ buvo ištrauktas pro „QIAamp Mini“ kolonėlę, išjunkite vakuomo siurbį ir sulyginkite slėgį iki 0 mbar.
- Pridėkite 750 µl „Buffer ACW2“ į „QIAamp Mini“ kolonėlę. Palikite kolonėlės dangtelį atidarytą ir įjunkite vakuomo siurbį. Po to, kad visas „Buffer ACW2“ buvo ištrauktas pro „QIAamp Mini“ kolonėlę, išjunkite vakuomo siurbį ir sulyginkite slėgį iki 0 mbar.

12. Pridėkite 750 µl etanolio (96–100 %) į „QIAamp Mini“ kolonėlę. Palikite kolonėlės dangtelį atidarytą ir įjunkite vakuumo siurbį. Po to, kai visas etanolis buvo ištrauktas pro sukamąją kolonėlę, išjunkite vakuumo siurbį ir sulyginkite slėgį iki 0 mbar.
13. Uždarykite „QIAamp Mini“ kolonėlės dangtelį. Išimkite ją iš vakuumo skirstytuvo ir išmeskite „VacConnector“. Įstatykite „QIAamp Mini“ kolonėlę į švarų 2 ml plovimo mėgintuvėlį (kurį naudojote atlikdami 8 veiksmą) ir centrifuguokite visu greičiu (20 000 x g; 14 000 aps./min.) 3 (±0,5) minutes.
14. Įstatykite „QIAamp Mini“ kolonėlę į naują 2 ml plovimo mėgintuvėlį. Atidarykite dangtelį ir inkubuokite 56 °C (±1 °C) temperatūroje 10 (±1) minučių, kad membrana visiškai išdžiūtų.
15. Įstatykite „QIAamp Mini“ kolonėlę į švarų 1,5 ml eliuavimo mėgintuvėlį (pateiktas) ir išmeskite 2 ml plovimo mėgintuvėlį, kurį naudojote atlikdami 13 veiksmą. Atsargiai pridėkite 20–150 µl „Buffer AVE“ į „QIAamp Mini“ kolonėlės centrą. Uždarykite dangtelį ir inkubuokite kambario temperatūroje 3 (±0,5) minutes.

**Svarbu.** Įsitikinkite, kad eliuavimo „Buffer AVE“ temperatūra pasiekė kambario temperatūrą (15–25 °C). Jei eliuavimas atliekamas naudojant mažus tūrius (<50 µl), eliuavimo buferinį tirpalą reikia leisti membranos centre, kad būtų eliuuotos visos surištos nukleorūgštys.

Eliuavimo tūris yra kintamas ir gali būti pritaikomas pagal vėliau atliekamų procedūrų reikalavimus.

Kai eliuavimui naudojamas mažesnis „Buffer AVE“ tūris, gaunama didesnė nukleorūgščių koncentracija, tačiau bendra išeiga gali būti mažesnė.

Atkurtas eliuato tūris gali būti iki 5 µl mažesnis už „QIAamp Mini“ kolonėlėje naudotą eliuavimo tūrį.

**Pastaba.** Kai laukiama NR išeiga yra maža, eliuavimui rekomenduojama naudoti mažai surišantį mėgintuvėlį (nepateiktas).

16. Norėdami eliuuoti nukleorūgštis, centrifuguokite mikrocentrifugoje visu greičiu (20000 x g; 14 000 aps./min.) 1 minutę.

# Kokybės kontrolė

Taikant „QIAGEN“ ISO sertifikuotą kokybės vadybos sistemą, kiekviena „QIAamp DSP Circulating NA Kit“ partija tikrinama pagal nustatytas specifikacijas, kad būtų užtikrinta nuosekli gaminių kokybė.

## Apribojimai

Sistemos eksploatacinės savybės išskiriant cirkuliuojančias neląstelines nukleorūgštis buvo įvertintos naudojant žmogaus kraujo mėginius, gautus iš šių kraujo surinkimo mėgintuvėlių:

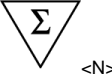












- K2-EDTA („Beckton Dickinson“, kat. nr. 367525)
- PAXgene Blood ccfDNA Tube („PreAnalytiX“, kat. nr. 768115)
- Cell-Free DNA BCT („Streck“, kat. nr. 218962)

Naudotojas atsako už sistemos eksploatacines savybes, jei laboratorijoje atliekamos procedūros, kurių neapima „QIAGEN“ eksploatacinių savybių tyrimai.

Siekiant sumažinti neigiamo poveikio diagnostiniams rezultatams riziką, atliekant tolesnius tyrimus reikia naudoti tinkamas kontrolės priemones. Papildomam patvirtinimui rekomenduojama vadovautis Techninių reikalavimų derinimo tarptautinės konferencijos (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements, ICH) nuostatomis, pateiktomis dokumente „ICH Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text And Methodology“.

Visi gauti diagnostikos rezultatai turi būti vertinami kartu su kitais klinikiniais ar laboratoriniais rezultatais.

# Simboliai

Simbolis	Simbolio apibrėžimas
	Sudėtyje yra pakankamas reagentų kiekis <N> tyrimams (-ų) atlikti
	Tinka naudoti iki
	In vitro diagnostikos medicinos prietaisas
	Gavus
	Atidaryti pristačius; laikyti „QIAamp Mini“ sukamąsias kolonėles 2–8 °C temperatūroje
	Katalogo numeris
	Numeris
	Partijos numeris
	Medžiagos numeris
	Komponentai
	Tūris
	Papildymas
	Temperatūros apribojimai



Gamintojas



Žr. naudojimo instrukcijas



Įpylę į buteliuką etanolio, pažymėkite dabartinę datą



Etanolis



Įpylę į buteliuką izopropanolio, pažymėkite dabartinę datą



Izopropanolis



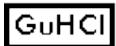
Sudėtyje yra



Veda į



Guanidino tiocianatas



Guanidino hidrochloridas



BRIJ 58



Visuotinis prekės numeris

---

## Literatūra

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.

## Kontaktinė informacija

Prireikus techninės pagalbos ir išsamesnės informacijos, apsilankykite mūsų techninės pagalbos centre adresu **support.qiagen.com** arba skambinkite vienam iš QIAGEN techninės priežiūros skyrių ar vietinių platintojų (žr. galinį viršelį arba apsilankykite adresu **www.qiagen.com**).



# Trikčių šalinimo vadovas

Šis trikčių šalinimo vadovas gali padėti šalinant atsiradusias triktis. Kontaktinę informaciją rasite ant galinio viršelio arba apsilankę [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

## Pastabos ir pasiūlymai

### Eliuate yra mažai arba visai nėra nukleorūgštys

- |    |  |   |
|----|--|---|
| a) | Naudojama nestabilizuota plazma  | Naudojant nestabilizuotos plazmos mėginius gali paspartėti DNR irimas. Rekomenduojame vadovautis CEN/TS 16835-3:2015. Pakartokite gryninimo procedūrą su naujais mėginiais.   |
| b) | Ilgas laiko tarpas tarp kraujo paėmimo ir plazmos ruošimo              | Branduolėtos kraujo ląstelės gali suirti ir išleisti genominę DNR į plazmą, atskiesdamos taikinio nukleorūgštį.   |
| c) | Mėginiai buvo užšaldyti ir atšildyti daugiau nei vieną kartą           | Turi būti vengiama pakartotinai užšaldyti ir atšildyti, nes tai gali lemti DNR irimą. Visada naudokite šviežius arba tik vieną kartą atšildytus mėginius.   |
| d) | Žema taikinio DNR koncentracija mėginiuose                             | Plazmos mėginiai per ilgai buvo kambario temperatūroje. Pakartokite gryninimo procedūrą su naujais mėginiais.<br><b>Pastaba.</b> Kai kurių asmenų neląstelinės NR koncentracija plazmoje gali būti labai maža. Tokiu atveju reikia naudoti didesnį mėginio tūrį ir mažą eliuato tūrį. |
| e) | Nepakankama mėginio lizė „Buffer ACL“                                  | Jei „QIAGEN Proteinase K“ ilgą laiką buvo laikoma aukštesnėje temperatūroje, jos aktyvumas gali sumažėti. Pakartokite procedūrą naudodami naujus mėginius ir šviežią „QIAGEN Proteinase K“.   |
| f) | „Buffer ACL“ ir nešančiosios RNR mišinys nepakankamai išmaišytas       | Sumaišykite „Buffer ACL“ su nešančiąja RNR mažiausiai 10 kartų švelniai apversdami „Buffer ACL“ ir nešančiosios RNR mišinio mėgintuvėlį.  |
| g) | Naudojamas silpnesnis nei 96–100 % etanolis                            | Pakartokite gryninimo procedūrą naudodami naujus mėginius ir 96–100% etanolį. Nenaudokite denatūruoto alkoholio, kuriame yra kitų medžiagų, pvz., metanolio ar metiletilketono.   |
| h) | „Buffer ACB“ paruoštas netinkamai                                      | Patikrinkite, ar „Buffer ACB“ koncentratas buvo atskiestas tinkamu izopropanolio tūriu (ne etanolio, žr. 24 psl.).  |
| i) | „Buffer ACW1“ arba „Buffer ACW2“ buvo paruoštas netinkamai             | Patikrinkite, ar „Buffer ACW1“ ir „Buffer ACW2“ koncentratai buvo atskiesti tinkamu etanolio tūriu (žr. 24 psl.). Kartokite gryninimo procedūrą su naujais mėginiais.   |
| j) | „Buffer ACW1“ arba „Buffer ACW2“ buvo paruoštas naudojant 70 % etanolį | Patikrinkite, ar „Buffer ACW1“ ir „Buffer ACW2“ koncentratai buvo atskiesti 96–100 % etanolio (žr. 24 psl.). Kartokite gryninimo procedūrą su naujais mėginiais.  |

### Toliau vykdomų fermentinių reakcijų metu DNR arba RNR yra nepakankamai veiksminga

- |    |                                       |   |
|----|---------------------------------------|---|
| a) | Eliuate yra mažai arba visai nėra DNR | Galimas priežastis žr. „Eliuate yra mažai arba visai nėra nukleorūgštys“ prieš tai. Jei įmanoma, padidinkite reakcijoje naudojamo eliuato kiekį.  |
| b) | Netinkamas eliuavimo tūris            | Įvertinkite didžiausią eliuato tūrį, kurį galima naudoti toliau atliekamoms procedūroms. Atitinkamai sumažinkite arba padidinkite eliuato, pridedamo toliau atliekamai procedūrai, tūrį. Eliuavimo tūrį galima atitinkamai pakoreguoti. |

**Pastaba.** Kai eliuavimui naudojamas mažesnis „Buffer AVE“ tūris, gaunama didesnė nukleorūgščių koncentracija, bet bendra išeiga gali būti mažesnė.

## Pastabos ir pasiūlymai

- c) Netinkamai išmaišyti buferiniai tirpalai Palikus ilgesnį laiką tarp procedūrų, galėjo atsiskirti plovimo „Buffer ACW2“ druskos ir etanolio komponentai. Prieš kiekvieną procedūrą visada gerai išmaišykite buferinius tirpalus.
- d) Nešančiosios RNR interferencija Jei eliuote esanti nešančioji RNR daro poveikį toliau vykstančiai fermentinei reakcijai, gali reikėti sumažinti nešančiosios RNR kiekį arba ją iš viso pašalinti.

### Bendrasis naudojimas

- a) Užsikimšusi „QIAamp Mini“ kolonėlė Sumažėjus srautus, galima pailginti apdorojimo vakuumu laiką.
- Arba, jei naudojate, uždarykite „VacValve“ ir atsargiai nuimkite plėstuvo, „VacConnector“ ir „VacValve“ įtaisą nuo „QIAamp Mini“ kolonėlės taip, kad iš kolonėlės plėstuvo neištekėtų lizatas.
- Išimkite „QIAamp Mini“ kolonėlę iš vakuumo skirstytuvo, įstatykite į 2 ml plovimo mėgintuvėlį ir sukite visu greičiu, kol visas mėginys išbėgs pro membraną. Pakeiskite kolonėlės plėstuvo, „VacConnector“ ir „VacValve“ įtaisą, kuris lietési su likusiu lizatu. Įjunkite vakuumo siurbį, atidarykite „VacValve“ ir toliau leiskite likusį lizatą.
- Pakartokite prieš tai aprašytus veiksmus, jei „QIAamp Mini“ kolonėlė toliau kemšasi.
- Dėl pakartotinio užšaldymo ir atšildymo plazmoje galėjo susidaryti krioprecipitatai. Jie gali užkimšti „QIAamp Mini“ kolonėlę. Nenaudokite plazmos, kuri buvo užšaldyta ir atšildyta daugiau nei vieną kartą.
- Jei matote krioprecipitatus, išvalykite mėginį centrifuguodami 5 minutes 16 000 x g greičiu.
- b) Kintami eliuavimo tūriai Skirtingi mėginiai gali turėti įtakos galutinio eliuato tūriui. Atkurtas eliuato tūris gali būti iki 5 µl mažesnis už „QIAamp Mini“ kolonėlėje naudotą eliuavimo tūrį.
- c) Nepasiekiamas vakuumo slėgis nuo –900 iki –800 mbar Vakuumo skirstytuvas nesandariai uždarytas. Įjungę vakuumą, paspauskite vakuumo skirstytuvo dangtelį. Patikrinkite, ar pasiekiamas vakuumo slėgis.
- Nusidėvėjo „QIAvac“ dangtelio tarpiklis. Apžiūrėkite, ar skirstytuvas yra sandarus, ir, jei reikia, pakeiskite.
- Nusidėvėjo „VacValves“. Išimkite visus „VacValves“ ir įstatykite „VacConnectors“ tiesiai į Luerio jungtis. Įstatykite „QIAamp Mini“ kolonėlės į „VacConnectors“, uždarykite kolonėlių dangtelius ir įjunkite vakuumą. Patikrinkite, ar pasiekiamas vakuumo slėgis. Jei reikia, pakeiskite „VacValves“.
- Vakuomo siurblio jungtis yra nesandari. Uždarykite visas Luerio jungtis Luerio dangteliais ir įjunkite vakuomo siurbį. Įjungę siurbį (kai „Vacuum Regulator“ vožtuvas yra uždarytas), patikrinkite, ar vakuomo slėgis yra stabilus. Jei reikia, pakeiskite jungtis tarp siurblio ir vakuomo skirstytuvo.
- Jei vakuomo slėgio vis tiek nepavyksta pasiekti, pakeiskite vakuomo siurbį galingesniu.

# A priedas. Kraujo plazmos mėginio atskyrimo ir laikymo rekomendacijos

Jei naudojate stabilizuotus kraujo surinkimo mėgintuvėlius (pvz., „PAXgene ccfDNA“ mėgintuvėlį arba „Streck Cell-Free DNA“ mėgintuvėlį), vadovaukitės gamintojo plazmos atskyrimo ir laikymo nurodymais. Rekomenduojame įsitikinti, kad šios laikymo sąlygos deria su konkrečiomis jūsų vėliau atliekamomis procedūromis ir taikiniu.

Jei naudojate nestabilizuotus kraujo surinkimo mėgintuvėlius, rekomenduojame vadovautis CEN/TS 16835-3:2015.

Tam, kad išskirtumėte cirkuliuojančias neląstelines nukleorūgštis iš kraujo mėginių, rekomenduojame vadovautis šiuo protokolu, kuris apima centrifugavimo taikant didelę g jėgą veiksmą siekiant pašalinti ląstelių nuolaužas ir tokiu būdu sumažinant ląstelinės arba genominės DNR ir RNR kiekį mėginyje.

1. Įkelkite EDTA kraują, esantį „BD Vacutainer®“ mėgintuvėliuose (arba kituose pirminiuose kraujo mėgintuvėliuose, kuriuose kaip antikoaguliantas naudojama EDTA), į centrifugą, atvėsintą iki 4 °C ir turinčią kintamo kampo rotorių bei atitinkamus kaušelius.
2. Centrifuguokite kraujo mėginius 10 minučių 1900 x g (3000 aps./min.) greičiu 4 °C temperatūroje.
3. Atsargiai aspiruokite plazmos supernatantą nesujudindami plazmos ir ląstelių sandūros sluoksnio. Iš vieno 10 ml pirminio kraujo mėgintuvėlio galima gauti apie 4–5 ml plazmos.

**Pastaba.** Šiuo metu turimą plazmą galima naudoti cirkuliuojančioms nukleorūgštims ekstrahuoti. Tačiau atlikus centrifugavimą dideliu greičiu, bus pašalintos papildomos ląstelių nuolaužos ir cirkuliuojančių nukleorūgščių priemašos, atsiradusios dėl genominės DNR ir RNR, gautos iš pažeistų branduolėtų kraujo ląstelių.

4. Aspiruota plazma perkeliama į naują centrifugos mėgintuvėlį.
5. Centrifuguokite plazmos mėginius 10 minučių 16 000 x g greičiu (fiksauto kampo rotorijoje) 4 °C temperatūroje.

Tokiu būdu bus pašalintos papildomos ląstelinės nukleorūgštys, prisijungusios prie ląstelių nuolaužų.

6. Atsargiai pašalinkite supernatantą ir perkelkite į naują mėgintuvėlį taip, kad nesujudintumėte granulių.
7. Jei plazma nukleorūgštims ekstrahuoti bus naudojama tą pačią dieną, laikykite 2–8 °C temperatūroje, kol atliksite kitus veiksmus. Laikant ilgesnį laiką, plazmos dalys iš stabilizuotų ir nestabilizuotų kraujo surinkimo mėgintuvėlių gali būti laikomos –20 °C temperatūroje (kaip taikinyš naudojama DNR) arba –80 °C temperatūroje (kaip taikinyš naudojama RNR) mažiausiai 4 savaites. Prieš naudodami plazmą cirkuliuojančioms nukleorūgštims ekstrahuoti, atšildykite plazmos mėgintuvėlius kambario temperatūroje.
8. **Pasirinktina**i. Tam, kad sumažintumėte krioprecipitātų kiekį, centrifuguokite plazmos mėginius 5 minutes 16 000 x g greičiu (fiksauto kampo rotorijoje).

**Pasirinktina**i. Perkelkite supernatantą į naują mėgintuvėlį ir pradėkite cirkuliuojančių nukleorūgščių ekstrahavimo protokolą.

---

## B priedas. Bendrosios RNR tvarkymo pastabos

### RNR naudojimas

Ribonukleazės (RNazės) – tai labai stabilūs ir aktyvūs fermentai, paprastai veikiantys ir be kofaktorių. RNazes labai sunku inaktyvinti, o sunaikinti RNR pakanka labai mažo jų kiekio, todėl nenaudokite jokių plastikinių ar stiklinių indų prieš tai nepašalinę galimos jų taršos RNaze. Būtina atidžiai saugotis, kad RNazių nenumatyta nepatektų į RNR mėginį atliekant gryninimo procedūrą ar po jos. Siekiant sukurti ir išlaikyti aplinką be RNazės, dirbant su RNR, vienkartinį ir daugkartinio naudojimo indų bei tirpalų pirminio apdorojimo metu ir juos naudojant reikia imtis toliau nurodytų atsargumo priemonių.

### Bendrasis naudojimas

Dirbant su RNR, visada reikia taikyti tinkamus mikrobiologinius, aseptinius metodus. Ant rankų ir dulkių dalelėse gali būti pernešamos bakterijos ir pelėsiai, kurie yra dažniausi taršos RNaze šaltiniai. Tvarkydami reagentus ir RNR mėginius, visuomet mūvėkite latekso arba vinilo pirštines, kad išvengtumėte užteršimo RNaze nuo odos paviršiaus arba dulkėtos laboratorinės įrangos. Dažnai keiskite pirštines ir, kai tik įmanoma, laikykite mėgintuvėlius uždengtus. Pipete perkeldami alikvotines dalis paskesniai naudojimui, išgrynintą RNR laikykite ant ledo.

### Vienkartiniai plastikiniai indai

Procedūros metu rekomenduojama naudoti sterilius vienkartinius polipropileno mėgintuvėlius be RNazės.

# Užsakymo informacija

Gaminys	Turinys	Kat. nr.
QIAamp DSP Circulating NA Kit (50)	50 paruošimų: „QIAamp Mini“ kolonėlės, kolonėlių plėstuvai, „VacConnectors“, „QIAGEN Proteinase K“, reagentai, buferiniai tirpalai ir surinkimo mėgintuvėliai	61504
<b>Priedai</b>		
QIAvac 24 Plus vacuum manifold*	Vakuuminis skirstytuvas 1–24 sukamosioms kolonėlėms apdoroti: „QIAvac 24 Plus Vacuum manifold“, Luerio kaišteliai ir sparčiojo sujungimo jungtys	19413
Vacuum Pump*	Universalus vakuumo siurblys	84010 [JAV ir Kanada] 84000 [Japonija] 84020 [likęs pasaulis]
QIAvac Connecting System*	Sistema vakuumo skirstytuvui prijungti prie vakuumo siurblio: sudėtyje yra dėklas, atliekų buteliukai, vamzdeliai, jungtys, vožtuvas, matuoklis ir 24 „VacValves“	19419

\* Skirta naudoti su vakuumo protokolais.

Naujausia informacija apie licencijavimą ir tam tikrų gaminių garantinių įsipareigojimų ribojimą pateikta atitinkamame „QIAGEN“ rinkinio vadove arba naudotojo vadove. „QIAGEN“ rinkinio vadovai arba naudotojo vadovai pasiekiami svetainėje [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) arba galite jų paprašyti „QIAGEN“ techninės pagalbos skyriaus ar vietinio platintojo.

# Vadovo peržiūros istorija

Data	Keitimai
R4 2019-09	Paskirtis iš vien tik žmogaus plazmos pakeista į neląstelines nukleorūgštis. Įtrauktas „supaprastintasis“ protokolai. Nėra šlapimo ir miRNR protokolų. Atnaujinta saugos informacija.

## „QIAamp DSP Circulating NA Kit“ ribotosios licencijos sutartis

Naudodamas šį gaminį pirkėjas ar naudotojas sutinka su šiomis sąlygomis.

1. Gaminį galima naudoti tik vadovaujantis protokolais, pateiktai su šiuo gaminį, šiuo vadovu ir tik su rinkinyje esančiais komponentais. „QIAGEN“ nesuteikia jokios intelektinės nuosavybės licencijos naudoti ar įtraukti pridėtus šio rinkinio komponentus su į šį rinkinį neįeinančiais komponentais, išskyrus aprašytus protokoluose, pateiktuose su šiuo produktu, šiame vadove ir papildomuose protokoluose, kuriuos galima rasti [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). „QIAGEN“ naudotojams pateikiami keičiami papildomi protokolai. Šiuos protokolus „QIAGEN“ kruopščiai patikrino ir optimizavo. „QIAGEN“ neteikia garantijų, kad šie protokoliai nepažeidžia trečiųjų šalių teisių.
2. Išskyrus licencijose nurodytus atvejus, „QIAGEN“ nesuteikia garantijos, kad šis rinkinys ir (arba) jo naudojimas nepažeis trečiųjų šalių teisių.
3. Rinkiniui ir jo komponentams suteikta licencija naudoti vieną kartą; pakartotinai naudoti, atnaujinti ar perparduoti negalima.
4. „QIAGEN“ aiškiai atsisako bet kokių kitų išreikštų ar numanomų licencijų, išskyrus aiškiai nurodytas licencijas.
5. Rinkinio pirkėjas ir naudotojas sutinka nesimti ir neleisti niekam kitam imtis veiksmų, kurie galėtų paskatinti arba palengvinti čia nurodytus draudžiamus veiksmus. „QIAGEN“ gali priversti vykdyti šios Ribotosios licencijos sutarties draudimus bet kuriame teisme ir atgauti visas tyrimo ir teismo išlaidas, įskaitant išlaidas advokatams, pateikusi ieškinį dėl šios Ribotosios licencijos sutarties vykdymo arba su šiuo rinkiniu ir (arba) jo komponentais susijusių teisių į savo intelektinę nuosavybę.

Atnaujintas licencijos sąlygas rasite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Prekių ženklai: „QIAGEN“®, „Sample to Insight“®, „QIAamp“® („QIAGEN Group“); „BD Vacutainer“® („Becton, Dickinson and Company“); „Tween“® („JCI Americas Inc.“). Šiame dokumente vartojami registruotieji pavadinimai, prekių ženklai ir kt., net jei jie specialiai nepažymėti, negali būti laikomi nesaugomais įstatymų.

1118364 10/2019 HB-0466-005 © 2019 QIAGEN, visos teisės saugomos.

