

Srpen 2018

# Příručka pro sadu QIAamp<sup>®</sup> DSP Virus Kit



50

Sada QIAamp DSP Virus Kit je generický systém, který využívá technologii QIAamp pro izolaci a purifikaci virových nukleových kyselin ze vzorků lidské plazmy nebo séra pro in-vitro diagnostické postupy.

Pro diagnostiku in-vitro

IVD

CE

REF

60704

i

1114514CS



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NĚMECKO

R3 MAT

1114514CS

# Obsah

Obsah sady .....	3
Symboly.....	4
Skladování.....	6
Kontrola kvality .....	6
Účel použití.....	7
Omezení použití produktu .....	7
Upozornění a bezpečnostní opatření .....	8
Úvod .....	11
Princip a popis postupu.....	11
Charakteristika výkonu.....	12
Vybavení a reagentie, které má zajistit uživatel.....	17
Důležité poznámky .....	18
Důležité body, než začnete .....	18
Příprava RNA .....	19
Uchovávání vzorků.....	19
Příprava reagentů a pufrů.....	20
Eluce virových nukleových kyselin .....	23
Výtěžek a kvalita virových nukleových kyselin .....	24
Nastavení vakuového systému QIAvac 24 Plus.....	25
Protokol: Izolace a purifikace virových nukleových kyselin z plazmy a séra.....	28
Historie revizí.....	32

# Obsah sady

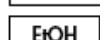
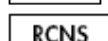
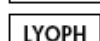
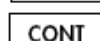
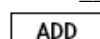
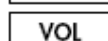
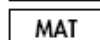
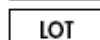
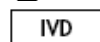
<b>QIAamp DSP Virus Kit</b>			
<b>Katalogové č.</b>			<b>60704</b>
<b>Počet prep.</b>			<b>50</b>
QIAamp MinElute®	QIAamp MinElute Columns with Wash Tubes (Kolonky QIAamp MinElute s promývacími zkumavkami) (WT) (2 ml)	COL	50
EXT	Column Extenders (Nástavce na kolonky) (3 ml)	COL EXT	50
ET	Elution Tubes (Eluční zkumavky) (1,5 ml)	ELU TUBE	50
VC	VacConnectors (Vakuové konektory)	VAC CON	50
LT	Lysis Tubes (Lyzační zkumavky) (2 ml)	LYS TUBE	50
WT	Wash Tubes (Promývací zkumavky) (2 ml)	WASH TUBE	50
AL	Lysis Buffer* (Lyzační pufr)	LYS BUF	33 ml
AW1	Wash Buffer 1* (Promývací pufr 1) (koncentrát)	WASH BUF 1 CON	19 ml
AW2	Wash Buffer 2† (Promývací pufr 2) (koncentrát)	WASH BUF 2 CON	13 ml
AVE	Elution Buffer† (Eluční pufr) (fialové krytky)	ELU BUF	4 x 2 ml
PS	Protease Solvent† (Rozpuštědlo proteázy)	QPROT SOLV	4,4 ml
Carrier	Carrier RNA (Nosičová RNA) (červené krytky)	CAR RNA	310
QP	QIAGEN® Protease (Proteáza QIAGEN®)	QPROT	1 lahvička

\* Obsahuje guanidínhydrochlorid. Není kompatibilní s dezinfekčními přípravky obsahujícími bělicí prostředky. Viz bezpečnostní informace na straně 8.

† Obsahuje azid sodný jako konzervační látku.

‡ Objem resuspenze 4,4 ml.

# Symboly



Sada obsahuje reagentie pro přípravu 50 vzorků

Viz informace v příručce

Použit do (datum expirace)

Diagnostický zdravotnický prostředek in-vitro

Katalogové číslo

Číslo šarže

Číslo materiálu

Součásti

Objem

Teplotní omezení

Při dodání

Zákonný výrobce

Důležitá poznámka

Po provedení daného kroku protokolu s tímto označením si vyměňte rukavice

Otevřít při převzetí; uchovávejte kolonky QIAamp Mini Spin při teplotě 2–8 °C

Globální číslo obchodní položky

Zapište aktuální datum přidání ethanolu do lahvičky

Přidání

Obsahuje

Lyofilizováno

Rekonstituujte v

Ethanol

GuHCl

MALEIC ACID

SUBT



Guanidinhydrochlorid

Kyselina maleinová

Subtilisin

Pokračování

---

# Skladování

Kolonky QIAamp MinElute je zapotřebí po doručení skladovat při teplotě 2–8 °C.

Všechny pufrы mohou být uchovávány při pokojové teplotě (15–25 °C).

Lyofilizovanou nosičovou RNA lze uložit při pokojové teplotě do konce doby použitelnosti. Nosičová RNA se může rozpouštět pouze v elučním pufru (AVE); rozpuštěná nosičová RNA se musí okamžitě přidat do lyzačního pufru (AL), jak je popsáno na straně 20. Tento roztok je potřeba připravit čerstvý a je stabilní při teplotě 2–8 °C až po dobu 48 hodin. Nepoužité podíly nosičové RNA rozpuštěné v elučním pufru (AVE) je zapotřebí zmrazit v alikvotních podílech při -20 °C.

Lyofilizovanou proteázu QIAGEN (QP) lze uchovávat při pokojové teplotě do doby použitelnosti, aniž by došlo ke snížení její účinnosti.

Rekonstituovaná proteáza QIAGEN (QP) je stabilní až 1 rok, pokud se uchovává při teplotě 2–8 °C, ale pouze do doby použitelnosti.

Rekonstituovaný promývací pufr 1 (AW1) a rekonstituovaný promývací pufr 2 (AW2) jsou stabilní po dobu 1 roku, pokud jsou uchovávány při pokojové teplotě, ale pouze do doby použitelnosti.

## Kontrola kvality

V souladu s certifikovaným systémem řízení jakosti společnosti QIAGEN (Total Quality Management System) je každá šarže sady QIAamp DSP Virus Kit testována podle předem stanovených specifikací, aby byla zaručena konzistentní jakost produktu.

---

## Účel použití

Sada QIAamp DSP Virus Kit je generický systém, který využívá technologii QIAamp pro izolaci a purifikaci virových nukleových kyselin ze vzorků lidské plazmy nebo séra pro in-vitro diagnostické účely. Veškeré diagnostické výsledky získané pomocí postupu pro přípravu vzorků v souladu s jakýmkoliv následným diagnostickým testem NAT musí být interpretovány s přihlédnutím k ostatním klinickým nebo laboratorním nálezům.

Produkt je určen k použití profesionálními pracovníky, např. techniky nebo lékaři školenými v technikách molekulární biologie. Je určen k použití s jakoukoliv navazující diagnostickou aplikací využívající enzymatickou amplifikaci nebo jinou enzymatickou modifikaci DNA nebo RNA a následnou detekci nebo amplifikaci signálu. Izolované a purifikované virové nukleové kyseliny mohou být použity jak u kvalitativních (např. screening krve), tak při kvantitativních (např. monitorování množství virových částic) diagnostických testech NAT.

Aby se minimalizovaly nesrovnalosti v diagnostických výsledcích, je produkt určen pro použití s interní kontrolou, stejně tak s pozitivními a negativními kontrolami v průběhu celého procesu přípravy vzorků a amplifikace a detekce vzorků podle použitého navazujícího testu.

Produkt je určen pro použití s vakuovým systémem QIAvac 24 Plus nebo s ekvivalentním vakuovým systémem.

## Omezení použití produktu

Sada není určena k použití s krevními, tkáňovými, kultivovanými buňkami nebo s buňkami kostní dřeně. Sada není rovněž určena k izolaci nebo purifikaci bakteriálních, fungálních nebo parazitárních nukleových kyselin. Účinnost sady při izolaci a purifikaci virových nukleových kyselin z jiných nebuněčných tělních tekutin, jako je moč nebo CSF (mozkomíšni mok), nebyla hodnocena.

# Upozornění a bezpečnostní opatření

Při manipulaci s chemikáliemi noste vždy laboratorní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Bližší informace jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech (safety data sheets, SDS). Jsou k dispozici také online v PDF formátu na stránkách [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), kde můžete najít, přečíst a vytisknout bezpečnostní listy všech sad a součástí sad QIAGEN.

**UPOZORNĚNÍ: Nepřidávejte roztoky bělicích prostředků nebo kyselin do odpadních materiálů z přípravy vzorků.**

Lyzační pufr (AL) a promývací pufr 1 (AW1) obsahují guanidinhydrochlorid, který může v kombinaci s bělicími prostředky vytvářet vysoce reaktivní látky. V případě rozlití tekutin obsahujících tyto pufrы vyčistěte kontaminované místo vhodným laboratorním detergentem a vodou. Pokud rozlitá tekutina obsahuje potenciálně infekční látky, vyčistěte zasaženou oblast nejprve laboratorním detergentem a vodou a poté 1 % (obj.) roztokem chlornanu sodného.

Jestliže jsou lahve s pufrem poškozeny nebo prosakují, použijte při likvidaci těchto lahví rukavice a ochranné brýle, abyste zabránili poškození vlastního zdraví nebo zdraví jiných osob.

Společnost QIAGEN netestovala kapalný odpad vzniklý požitím procedury QIAamp DSP Virus na přítomnost reziduálních infekčních materiálů. Je proto nutné při práci s tímto produktem dodržovat obecná bezpečnostní opatření (rukavice, laboratorní oděv a ochranné brýle) pro manipulaci s potenciálně infekčním materiálem z lidského zdroje a nakládat s tekutým odpadem jako s infekčním a zlikvidovat jej podle místních bezpečnostních předpisů.



Pro jednotlivé komponenty sady QIAamp DSP Virus Kit platí následující pokyny týkající se rizika a bezpečnostních opatření.

#### Pufr AL



Obsahuje: guanidinydrochlorid; kyselinu maleinovou. Varování! Může být škodlivý při požití nebo při vdechnutí. Způsobuje podráždění kůže. Může vyvolat alergickou kožní reakci. Způsobuje vážné podráždění očí. Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranné brýle / obličejový štít.

#### Pufr AW1



Obsahuje: guanidinydrochlorid. Varování! Škodlivý při požití nebo při vdechnutí. Způsobuje podráždění kůže. Způsobuje vážné podráždění očí. Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranné brýle / obličejový štít.

## Proteáza QIAGEN



Obsahuje: subtilisin. Nebezpečí! Zdraví škodlivý při požití. Způsobuje podráždění kůže. Způsobuje vážné poškození očí. Při vdechnutí může vyvolat příznaky alergie nebo astmatu, případně dechové obtíže. Může způsobit podráždění dýchacích cest. Vyvarujte se vdechování prachu/dýmu/plynu/mlhy/výparů/aerosolů. Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranné brýle / obličejový štít. Používejte ochranný respirátor. PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Opatrně oplachujte vodou po dobu několika minut. Pokud zasažená osoba používá kontaktní čočky, vyjměte je (pokud je to možné). Pokračujte v oplachování. POKUD dojde k zasažení nebo důvodné obavě, že došlo k zasažení: Ihned kontaktujte TOXIKOLOGICKÉ CENTRUM nebo lékaře. Přeneste postiženého na čerstvý vzduch a ponechte ho v klidu v poloze usnadňující dýchání.

# Úvod

Sada QIAamp DSP Virus Kit využívá osvědčenou technologii pro simultánní izolaci a purifikaci virové DNA a RNA. Postup sady QIAamp DSP Virus kombinuje selektivní vazebné vlastnosti membrány založené na oxidu křemičitém s minimálními elučními objemy 20 µl nebo 60 µl.

Tento postup je vhodný k použití s plazmou nebo sérem; buď mohou obsahovat citrát, nebo EDTA. Vzorky mohou být buď čerstvé, lyofilizované, nebo zmrazené s tím, že nebyly zmrazeny a neroztály více než jedenkrát. Postup lze použít pro izolaci virové RNA a DNA ze široké řady RNA a DNA virů. Postup je navržen tak, aby se zabránilo křížové kontaminaci mezi vzorky a umožnilo se bezpečné zacházení s potenciálně infekčními vzorky. Tento postup je velmi vhodný pro simultánní zpracování několika vzorků. Virové nukleové kyseliny se eluují v elučním pufru (AVE) a jsou připraveny k použití v amplifikačních reakcích nebo pro skladování při teplotě -20 °C.

## Princip a popis postupu

Každý postup QIAamp DSP Virus zahrnuje 4 kroky:

- Lýzu virových částic ve vzorku
- Vázání virových nukleových kyselin v lyzátu k membráně kolonky QIAamp MinElute
- Promytí membrány
- Eluci virových nukleových kyselin z membrány

Postup se provádí použitím kolonek QIAamp MinElute ve vakuovém potrubí.

## Lýza virových částic

Vzorky jsou lyzovány za denaturačních podmínek při zvýšených teplotách. Lýza se provádí za přítomnosti proteázy QIAGEN (QP) a lyzačního pufru (AL), které společně zajišťují inaktivaci RNázy.

## Vázání nukleových kyselin k membráně kolonky QIAamp MinElute

Pro optimalizaci vázání virové DNA a RNA k membráně kolony QIAamp MinElute se nejprve přidá k lyzátům ethanol. Každý lyzát se poté nanese na kolonku QIAamp MinElute a virové nukleové kyseliny se adsorbují na membránu na bázi oxidu křemičitého při průchodu lyzátu indukovaném podtlakem.

## Odstranění reziduálních kontaminant

Zatímco virové nukleové kyseliny zůstávají vázané na membránu kolonky QIAamp MinElute, kontaminanty se účinně vymývají nejprve promývacím pufrům 1 (AW1), poté promývacím pufrům 2 (AW2) a poté ethanolem.

## Eluce čistých nukleových kyselin

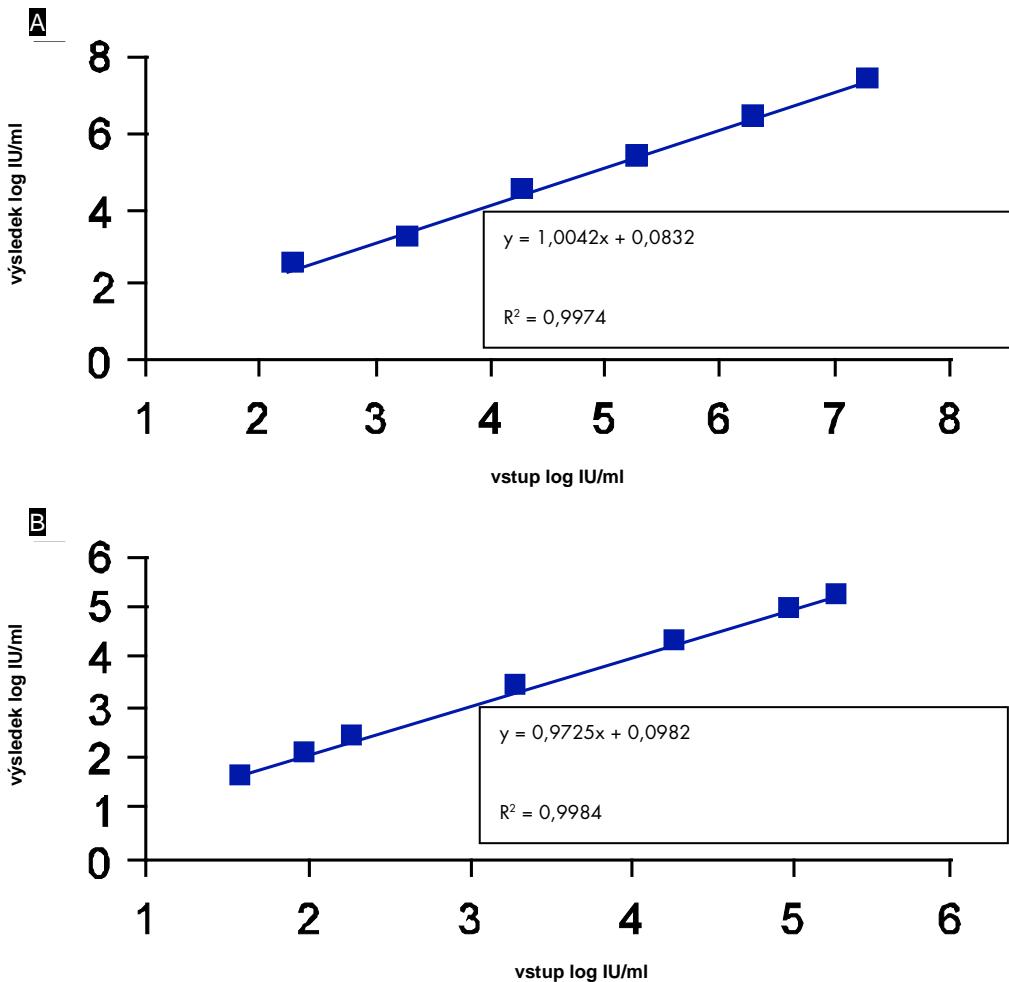
Virové nukleové kyseliny jsou eluovány z membrány kolonky QIAamp MinElute pomocí elučního pufru (AVE). Kolonky QIAamp MinElute umožňují eluční objemy 20 µl nebo 60 µl.

## Charakteristika výkonu

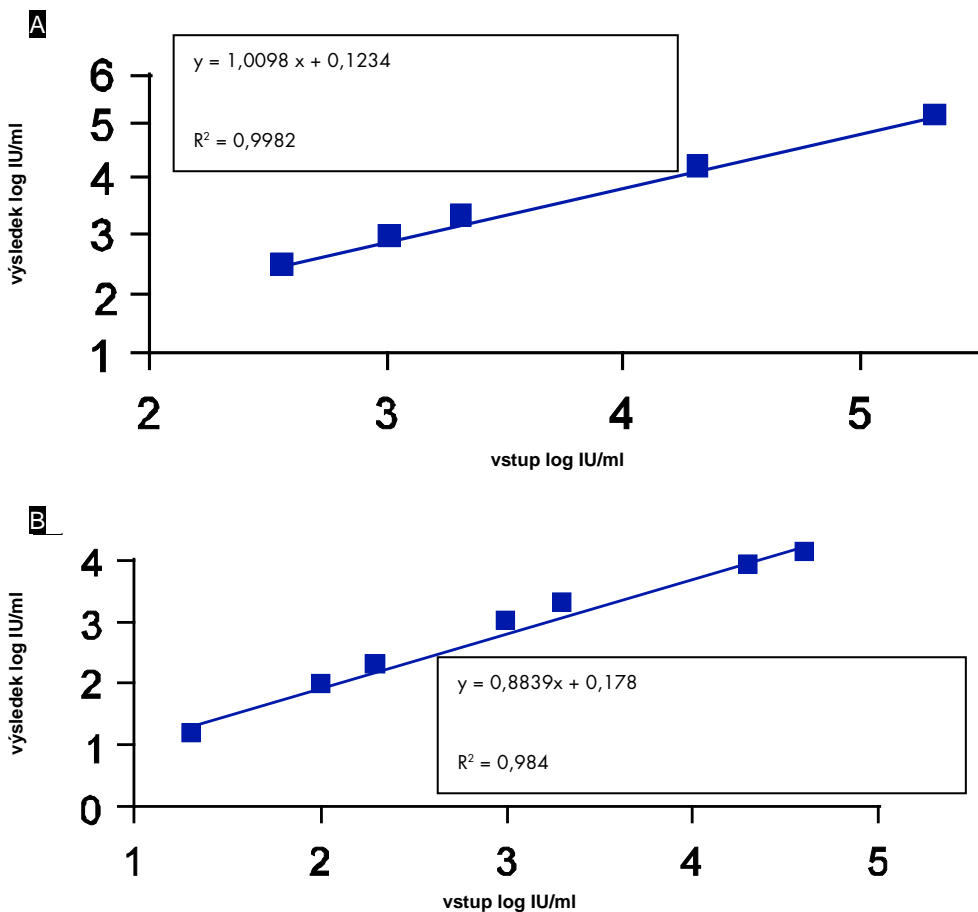
Lineární rozsah postupu QIAamp DSP Virus byl stanoven pro HIV RNA a HBV DNA v několika navazujících diagnostických analýzách (Tabulka 1, Obrázek 1 a Obrázek 2).

**Tabulka 1. – Navazující diagnostické analýzy, ve kterých byl testován lineární rozsah postupu QIAamp DSP Virus**

Analýza	Sada
Real-time RT-PCR metoda HIV RNA	Analýza TaqMan® a test cobas® AMPLICOR HIV-1 MONITOR®
Real-time PCR test pro HBV DNA	Analýza TaqMan a test cobas AMPLICOR HBV MONITOR®



**Obrázek 1. Lineární rozsah postupu QIAamp DSP Virus použitím analýz TaqMan.** Lineární rozpětí postupu QIAamp DSP Virus bylo stanoveno na elučním objemu 60  $\mu$ l použitím analýz TaqMan pro **A** HIV RNA a **B** HBV DNA.



**Obrázek 2. Lineární rozsah postupu QIAamp DSP Virus použitím testů cobas AMPLICOR MONITOR.** Lineární rozpětí postupu QIAamp DSP Virus bylo stanoveno na elučním objemu 60 µl použitím testů cobas AMPLICOR MONITOR pro **A** HIV RNA a **B** HBV DNA.

Detekční limit (DL) a kvantifikační limit (quantification limit, QL), podle směrnic ICH 2QA a 2QB, byly stanoveny pro postup QIAamp DSP Virus (s počátečním objemem vzorku 500 µl a elučními objemy 20 µl a 60 µl) použitím různých navazujících diagnostických analýz (Tabulka 2 a Tabulka 3).

**Tabulka 2. – Detekční limit postupu QIAamp DSP Virus**

<b>Analýza</b>	<b>Eluční objem</b>	<b>95 % mezní hodnota</b>
<i>artus</i> <sup>®</sup> RealArt™ HBV DNA	20 µl	2,31 IU/ml (n=240)
<i>artus</i> RealArt HCV RNA	20 µl	24,31 IU/ml (n=192)
AMPLICOR manual HIV RNA	60 µl	90,92 IU/ml (n=209)
TaqMan HBV DNA	60 µl	4,73 IU/ml (n=192)

**Tabulka 3. – Kvantifikační limit postupu QIAamp DSP Virus**

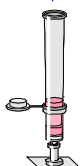
<b>Analýza</b>	<b>QL</b>	<b>CV</b>
TaqMan HBV DNA	5,7 IU/ml	< 70 % (n=88)
TaqMan HIV RNA	52 IU/ml	< 60% (n=88)
cobas AMPLICOR HIV RNA	100 IU/ml	< 60% (n=88)
cobas AMPLICOR HBV DNA	30 IU/ml	< 60% (n=88)
cobas AMPLICOR HCV RNA <sup>®</sup>	700 IU/ml	< 60% (n=66)

## Postup QIAamp DSP Virus

**Vzorek**



**Lýza**



**Vázání**

**Podtlak**



**Promývejte  
(AW1)**

**Odstraňte EXT  
před tím, než je  
použit podtlak**

**Podtlak**



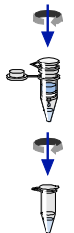
**Promývejte  
(AW2)**

**Podtlak**



**Promývejte  
(ethanolem)**

**Podtlak**



**Odstředte pro  
vysušení**

**Eluujte**

**Čisté nukleové kyseliny**

Před zahájením si pečlivě přečtěte protokol (strana 28).

Do LT přidejte 75 µl QP, 500 µl vzorku a 500 µl AL.

Vortexujte po dobu 15 sekund.

Inkubujte po dobu 15 minut ( $\pm 1$  min) při teplotě 56 °C ( $\pm 1$  °C).

Přidejte 600 µl ethanolu.

Vortexujte po dobu 15 sekund.

Inkubujte 5 min ( $\pm 1$  minuta) při pokojové teplotě (15–25 °C).

Přeneste lyzát do kolonky QIAamp MinElute s připojeným nástavcem kolonek (EXT).

Přidejte 600 µl rekonstituované AW1.

Odstraňte EXT.

Přidejte 700 µl rekonstituované AW2.

Přidejte 750 µl ethanolu.

Vložte kolonku QIAamp MinElute do zkumavky WT.  
Centrifugujte 1 minutu při 14 000 ot./min.

Vložte kolonku QIAamp MinElute do zkumavky WT.  
Inkubujte 3 minuty při 56 °C.

Vložte kolonku QIAamp MinElute do zkumavky ET.  
Přidejte 20 µl nebo 60 µl AVE.

Inkubujte po dobu 3 minut při pokojové teplotě.  
Centrifugujte 1 minutu při 14 000 ot./min.



# Vybavení a reagentie, které má zajistit uživatel

Při manipulaci s chemikáliemi noste vždy laboratorní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Další informace jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech, které lze získat od dodavatele produktu.

- Ethanol (96–100 %)
- Pipety\* a pipetovací špičky (pro zamezení křížové kontaminace doporučujeme používat pipetovací špičky s aerosolovými bariérami)
- Rukavice na jedno použití
- Termoblok\* pro lýzu vzorků při teplotě 56 °C (doporučujeme Eppendorf® Thermomixer comfort s termoblokem pro 2,0 ml mikrozkušavky□†)
- Mikrocentrifuga\*
- Odměrný válec (50 ml)
- Třepačka vortex
- Vakuový systém QIAvac 24 Plus (QIAvac 24 Plus, kat. č. 19413, QIAvac Connecting System, kat. č. 19419, a Vacuum Pump kat. č. 84020‡) nebo ekvivalentní standardní laboratorní vakuový systém


\* K zajištění správného zpracování vzorků během postupu se sadou QIAamp DSP Virus důrazně doporučujeme, aby byly nástroje (např. pipety a termobloky) kalibrovány podle doporučení výrobce.

† Uvedený výčet není úplný a nezahrnuje řadu důležitých materiálů a pomůcek používaných v biologické laboratoři.

‡ Kat. č. 84020 označuje pumpu vhodnou pro evropské země (např. Německo). V případě zemí s jinými požadavky na napětí nebo přípojky kontaktujte technickou službu QIAGEN.

# Důležité poznámky

## Důležité body, než začnete

- Po obdržení sady zkontrolujte, zda nejsou její komponenty poškozeny. V případě poškození blistrových obalů nebo láhví s pufrem kontaktujte oddělení technických služeb QIAGEN nebo místního distributora. V případě rozlité tekutiny postupujte podle pokynů uvedených v části „Upozornění a bezpečnostní opatření“ (str. 8).
- Nepoužívejte poškozené komponenty sady, protože použití poškozených komponent by mohlo negativně ovlivnit účinnost sady.
- Vždy používejte zařízení bez RNázy.
- Během postupu uchovávejte ethanol (96–100 %) na ledu.
- Před každým přenosem kapalných materiálů vždy vyměňte pipetovací špičky. Pro zamezení křížové kontaminace doporučujeme použít pipetovací špičky s aerosolovou bariérou.
- Všechny kroky centrifugace se provádějí při pokojové teplotě (15–25 °C).
- Používejte vždy rukavice na jedno použití a pravidelně kontrolujte, zda nedošlo k jejich kontaminaci testovaným vzorkem.
- Vyhodťte rukavice, pokud byly kontaminovány, a také minimálně ve všech krocích označených symbolem rukavic. 
- Pro zamezení křížové kontaminace neotevírejte více zkumavek současně.
- Při práci se sadou nepoužívejte komponenty jiných souprav, pokud nemají stejné číslo šarže.
- Zamezte mikrobiální kontaminaci reagentů sady.
- Pro zajištění ochrany před potenciálně infekčními materiály doporučujeme pracovat za podmínek laminárního proudění až do lýzy vzorků.
- Tuto sadu smí používat pouze personál školený v laboratorních metodách in-vitro.

- Tento postup obsahuje pokyny pro zpracování jednoho vzorku plazmy nebo séra. Pomocí vakuového systému QIAvac 24 Plus je však možné zpracovat až 24 vzorků současně.

## Příprava RNA

Když připravujete virovou RNA, během manuálních kroků postupu pracujte rychle.

Eluční pufr (AVE) obsahuje azid sodný\*, antimikrobiální činidlo, které zabraňuje růstu organismů produkujících RNÁzu. Ale protože tento pufr neobsahuje žádné chemikálie rozkládající RNÁzu, nebude aktivně inhibovat RNÁzy vnesené nesprávným zacházením. Je nutné věnovat mimořádnou péči, aby se při manipulaci s elučním pufrem (AVE) zabránilo kontaminaci RNázou.

## Uchovávání vzorků

Po odběru a centrifugaci mohou být plazma nebo sérum uchovávány při teplotě 2–8 °C až po dobu 6 hodin. Pro dlouhodobé uchovávání se doporučuje zmrazení při -20 °C nebo -80 °C v alikvotních množstvích. Zmrazené vzorky plazmy nebo séra nesmí roztát více než jednou. Opakované zmrazování a roztátí vede k denaturaci a precipitaci proteinů, což má za následek snížené virové titry, a proto dává snížené výtěžky virových nukleových kyselin. Kromě toho kryoprecipitáty vzniklé během zmrazení a roztátí budou ucпávat membránu kolonek QIAamp MinElute. Pokud budou kryoprecipitáty viditelné, peletujte je centrifugací při přibližně 6800 x g po dobu 3 minut. Vyčištěný supernatant je zapotřebí aspirovat a zpracovat okamžitě bez narušení pelety.

\* Při manipulaci s chemikáliemi noste vždy laboratorní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle.

## Příprava reagensí a pufrů

### Příprava proteázy QIAGEN

Přidejte celý obsah lahvičky obsahující 4,4 ml rozpouštědla proteázy (PS) do lahvičky s lyofilizovanou proteázou QIAGEN (QP) a pečlivě promíchejte. Aby obsah nezpěnil, míchání proveďte několikanásobným obrácením lahvičky. Ujistěte se, že je proteáza QIAGEN (QP) zcela rozpuštěná.



Nepřidávejte proteázu QIAGEN (QP) přímo do lyzačního pufru (AL).

### Přidání nosičové RNA do lyzačního pufru a interní kontrola

Nosičová RNA slouží ke dvěma účelům. Za prvé, podporuje vázání virových nukleových kyselin na membránu kolonek QIAamp MinElute, zvláště pokud je ve vzorku velmi málo cílových molekul. Za druhé, přidavek velkého množství nosičové RNA snižuje možnost degradace virové RNA ve vzácném případě, kdy molekuly RNázy nejsou denaturovány chaotropními solemi a detergentem v lyzačním pufru (AL). Pokud se nosičová RNA do lyzačního pufru (AL) nepřidá, může to vést ke snížení výtěžku virové RNA nebo DNA.

Nosičová RNA může být také zahrnuta do některých interních kontrolních činidel komerčních navazujících analýz. V těchto případech se podívejte na příslušné návody k použití od výrobce navazující analýzy.

Interní kontrola se velmi doporučuje v případě, že se sada QIAamp DSP Virus Kit používá v kombinaci s diagnostickými amplifikačními systémy. Interně zkontrolovaná RNA nebo DNA a rekonstituovaná nosičová RNA je potřeba přidat do lyzačního pufru (AL) a důkladně promíchat převrácením zkumavky 10krát. Aby nedošlo ke tvorbě pěny, nevortexujte.

Viz pokyny výrobce pro stanovení optimální koncentrace interní kontroly. Použití jiné než doporučené koncentrace může vést k chybným výsledkům. Při vypočítávání správného

množství interní kontroly, která bude použita, vezměte v úvahu počáteční objem vzorku a eluční objem. Pamatujte, že sada QIAamp DSP Virus Kit používá počáteční objem vzorku 500 µl.

Pro přípravu roztoku nosičové RNA přidejte 310 µl elučního pufru (AVE) do zkumavky obsahující 310 µg lyofilizované nosičové RNA, abyste získali roztok 1 µg/µl. Nosičovou RNA důkladně rozpustíte, rozdělíte na alikvotní podíly vhodné velikosti a uchovávejte při teplotě -20 °C. Alikvotní podíly nosičové RNA nezmrazujte a nerozmrazujte více než 2krát.

Všimněte si, že se nosičová RNA v lyzačním pufru (AL) nerozpouští. Musí se nejprve rozpustit v elučním pufru (AVE) a poté přidat do lyzačního pufru (AL). Zajistěte, aby se nosičová RNA před smícháním s lyzačním pufrem (AL) zcela rozpustila ve správném objemu elučního pufru (AVE).



Vždy používejte správnou interní kontrolu pro navazující analýzu. Pro další informace viz pokyny od výrobce.

Podle údajů, které uvádí Tabulka 4, vypočítejte objem směsi lyzačního pufru (AL) a nosičové RNA potřebného na šarži vzorků podle volby počtu vzorků, které budou zpracovávány současně. Objemy jsou vypočítány pomocí následujícího výpočtu vzorků:

$$n \times 0,55 \text{ ml} = y \text{ ml}$$

$$y \text{ ml} \times 11,2 \text{ µl/ml} = z \text{ µl}$$

kde: n = počet vzorků, které mají být zpracovány současně

y = vypočítaný objem lyzačního pufru (AL)

z = objem nosičové RNA/elučního pufru (AVE), který má být přidán do lyzačního pufru (AL)

**Tabulka 4. – Objemy lyzačního pufru (AL) a směsi nosičové RNA/elučního pufru (AVE) požadované pro postup QIAamp DSP Virus**

Počet vzorků	Objem AL (ml)	Objem nosičové RNA/AVE (μl)	Počet vzorků	Objem AL (ml)	Objem nosičové RNA/AVE (μl)
1	0,55	6,2	13	7,15	80,0
2	1,10	12,3	14	7,70	86,0
3	1,65	18,5	15	8,25	92,4
4	2,20	24,6	16	8,80	98,6
5	2,75	30,8	17	9,35	104,7
6	3,30	37,0	18	9,90	110,9
7	3,85	43,1	19	10,45	117,0
8	4,40	49,3	20	11,00	123,2
9	4,95	55,0	21	11,55	129,4
10	5,50	61,6	22	12,10	135,5
11	6,05	67,8	23	12,65	141,7
12	6,60	73,9	24	13,20	147,8

### Příprava promývacího pufru 1 (AW1)

Pomocí odměrného válce přidejte 25 ml etanolu (96–100 %) do láhve obsahující 19 ml koncentráту promývacího pufru 1 (AW1). Rozpuštěný promývací pufr 1 (AW1) uchovávejte při pokojové teplotě (15–25 °C).



Před zahájením postupu vždy promíchejte rekonstituovaný promývací pufr 1 (AW1) několikanásobným převrácením lahve.

## Příprava promývacího pufru 2 (AW2)

Pomocí odměrného válce přidejte 30 ml etanolu (96–100 %) do láhve obsahující 13 ml koncentrátu promývacího pufru 2 (AW2). Rozpuštěný promývací pufr 2 (AW2) uchovávejte při pokojové teplotě (15–25 °C).



Před zahájením postupu vždy promíchejte rekonstituovaný promývací pufr 2 (AW2) několikanásobným převrácením lahve.

## Příprava elučního pufru (AVE)

Čtyři zkumavky elučního pufru (AVE) jsou součástí sady. Dbejte na to, abyste nekontaminovali pufr s RNázami. Při provádění 4 nebo méně postupů purifikace za použití jedné sady doporučujeme na konci každého postupu zlikvidovat zkumavku elučního pufru (AVE).

## Eluce virových nukleových kyselin

Pro navazující aplikace, které vyžadují malé počáteční objemy (např. některé analýzy PCR a RT-PCR), při použití virových nukleových kyselin eluovaných ve 20 µl elučního pufru (AVE), se může zvyšovat citlivost analýzy.

Objem virových nukleových kyselin z kolonky QIAamp MinElute může být až o 5 µl nižší než objem elučního pufru (AVE) naneseného na kolonku. Například eluce virových nukleových kyselin s 60 µl elučního pufru (AVE) vede k eluátu o objemu přibližně 55 µl, zatímco výsledkem eluce s 20 µl je přibližně 15 µl eluátu.

Objem získaného eluátu závisí na povaze vzorku. Pokud je objem získaného eluátu pro navazující analýzu příliš nízký, zvýšte objem přidáním většího množství elučního pufru (AVE).

---

Eluované virové nukleové kyseliny se odebírají do elučních zkumavek (ET). Pro skladování delší než 24 hodin doporučujeme skladování při 2–8 °C.

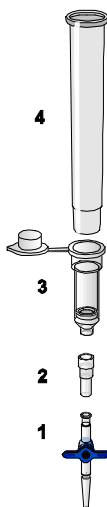
## Výtěžek a kvalita virových nukleových kyselin

Výtěžkem a kvalitou jsou izolované nukleové kyseliny vhodné pro všechny typy navazujících detekčních postupů v molekulární diagnostice. Diagnostické testy musejí být prováděny podle pokynů výrobce.



## Nastavení vakuového systému QIAvac 24 Plus

Dbejte na správné instalování nástavce (EXT) kolonky QIAamp MinElute, vakuového konektoru (VC) a vakuového ventilku (viz Obrázek 3).



**Obrázek 3. Sestavení komponent sady QIAamp DSP Virus Kit pro vakuové zpracování vzorků:**

- |   |                              |
|---|------------------------------|
| 1: Vakuový ventilek (dodává se s vakuovým systémem) | 3: Kolonka QIAamp MinElute   |
| 2: Vakuový konektor (VC)                            | 4: Nástavec na kolonky (EXT) |

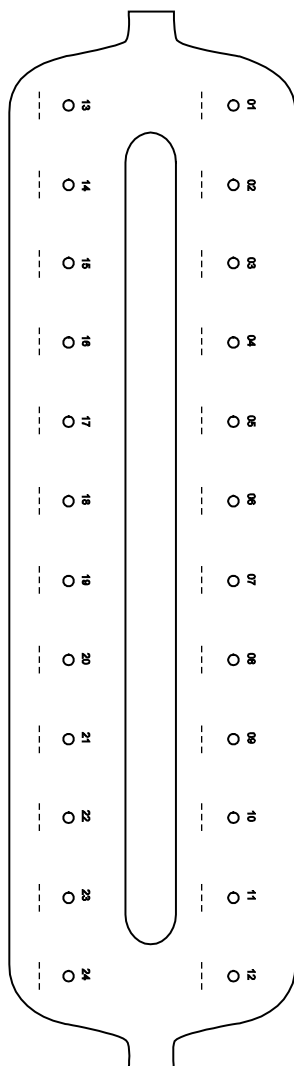
Doporučujeme označení lyzačních zkumavek (LT), elučních zkumavek (ET) a kolonek QIAamp MinElute pro použití s vakuovým systémem QIAvac 24 Plus podle schématu, které uvádí Obrázek 4, aby se zabránilo pomíchání vzorků. Je možné udělat fotokopii obrázku a označit na něm názvy vzorků.

---

Datum: \_\_\_\_\_

Uživatel: \_\_\_\_\_

Pracovní ID číslo: \_\_\_\_\_



**Obrázek 4. Schéma značení pro lyzační zkumavky (LT), eluční zkumavky (ET) a kolonky QIAamp MinElute pro použití s vakuovým systémem QIAvac 24 Plus.**

# Protokol: Izolace a purifikace virových nukleových kyselin z plazmy a séra

Pro izolaci a purifikaci virových nukleových kyselin z 500 µl plazmy nebo séra ošetřeného EDTA nebo citrátem.

## Co je třeba udělat, než začnete

- Vytemperujte vzorky na pokojovou teplotu (15–25 °C) a důkladně je promíchejte.
- Přidejte nosičovou RNA rekonstituovanou v elučním pufru (AVE) nebo interní kontrolu do lyzačního pufru (AL) podle pokynů na straně 20.
- Promývací roztok 1 (AW1), promývací roztok 2 (AW2) a proteáza QIAGEN (QP) musejí být připraveny podle pokynů v „důležitých poznámkách“ na straně 18.
- Pro použití v kroku 18 vytemperujte eluční pufr (AVE) na pokojovou teplotu (15–25 °C). Pokud je to možné, použijte eluční pufr (AVE) pro každý postup (k dispozici jsou 4 zkumavky).
- Nastavte termoblok na teplotu 56 °C pro použití v kroku 4 a 17.
- Pro zamezení křížové kontaminace vložte vakuový konektor (VC) do každého luer adaptéru vakuového systému.
- Zkontrolujte, zda je nádoba na odpadní materiály vakuového systému prázdná a zda jsou všechny spoje řádně propojeny.
- Podrobné informace o provozu vakuového systému, zejména informace o údržbě, jsou uvedeny v příručce přiložené k tomuto systému.

## Postup

1. Do lyzační zkumavky (LT) napipetujte 75 µl proteázy QIAGEN (QP).



Před použitím zkontrolujte datum použitelnosti rekonstituované proteázy.

2. Pipetujte 500 µl plazmy nebo séra do lyzační zkumavky (LT).
3. Přidejte 500 µl lyzačního pufru (AL) (obsahujícího 11,2 µg/ml nosičové RNA) do lyzační zkumavky (LT), uzavřete víčko a míchejte po dobu 15 sekund na pulsní třepače vortex.

Pro zajištění účinné lýzy je nezbytné důkladně promíchat vzorek a lyzační pufr (AL) do homogenního roztoku.



Lyzační pufr (AL) obsahuje interní kontrolu. Vzhledem k vysoké viskozitě lyzačního pufru (AL) dbejte na přidání správného množství lyzačního pufru (AL) pečlivým odpipetováním nebo použitím vhodné pipety, například vícekrokové pipety Eppendorf nebo ekvivalentní zařízení.



Nepřidávejte proteázu QIAGEN (QP) přímo do lyzačního pufru (AL).

4. Inkubujte při 56 °C ( $\pm 1$  °C) po dobu 15 minut ( $\pm 1$  min).
5. Centrifugujte lyzační zkumavku (LT) po dobu  $\geq 5$  sekund při plné rychlosti. Tímto krokem se odstraní kapky z vnitřní strany uzávěru.



6. Vyměňte si rukavice a opatrně otevřete lyzační zkumavku (LT).

7. Do lyzační zkumavky (LT) přidejte 600 µl ethanolu (96–100 %), uzavřete víčko a promíchejte důkladně po dobu  $\geq 15$  sekund na pulsní třepače vortex. Inkubujte po dobu 5 minut ( $\pm 1$  minuta) při pokojové teplotě (15–25 °C).

8. Centrifugujte lyzační zkumavku (LT) po dobu  $\geq 5$  sekund při plné rychlosti. Tímto krokem se odstraní kapky z vnitřní strany uzávěru.




9. Vložte kolonku QIAamp MinElute do vakuového konektoru (VC) vakuového systému (viz Obrázek 3, strana 25). Vložte nástavec kolonky (EXT) do otevřené kolonky QIAamp MinElute.



V kroku 16 udržujte promývací zkumavku (WT) pro vysušení odstředěním.



10. Vyměňte si rukavice a otevřete vždy pouze jednu zkumavku najednou.

11. Opatrně naneste celý lyzát z kroku 7 na nástavec (EXT) kolonky QIAamp MinElute, aniž by došlo k navlhčení jejího okraje. Nedotýkejte se membrány kolonky QIAamp MinElute pipetovou špičkou.
12. Zapněte vakuovou pumpu. Po průchodu lyzátu přes kolonku QIAamp MinElute otevřete ventil vakuového systému a uvolněte podtlak.
- Při souběžném zpracování několika kolonek QIAamp MinElute doporučujeme po průchodu lyzátu uzavřít vakuový ventil každé kolonky. Tímto postupem se sníží doba potřebná k uskutečnění tohoto kroku.
-  Pokud lyzát po 15 minutách zcela neprošel membránou, odstraňte kolonku QIAamp MinElute a opakujte postup s novým vzorkem.
-  Pro rychlé uvolnění podtlaku použijte ventil vakuového systému.
13. Na kolonu QIAamp MinElute naneste 600 µl promývacího pufru 1 (AW1). Opatrně odstraňte a zlikvidujte nástavec kolonek (EXT) a uzavřete ventil vakuového systému. Po průtoku promývacího pufru 1 (AW1) přes kolonku QIAamp MinElute otevřete ventil a uvolněte podtlak.
-  Abyste zabránili křížové kontaminaci, zajistěte, aby odstraněný nástavec kolonky (EXT) nepřešel přes sousední kolonky QIAamp MinElute.
14. Na kolonku QIAamp MinElute naneste 750 µl promývacího pufru 2 (AW2), aniž by došlo k navlhčení okraje kolony. Nedotýkejte se membrány kolonky QIAamp MinElute pipetovou špičkou. Nechte víčko kolonky otevřené a uzavřete ventil vakuového systému. Po průtoku promývacího pufru 2 (AW2) přes kolonku QIAamp MinElute otevřete ventil a uvolněte podtlak.

15. Na kolonku QIAamp MinElute naneste 750 µl ethanolu (96–100 %), aniž by došlo k navlhčení okraje kolonky. Nedotýkejte se membrány kolonky QIAamp MinElute pipetovou špičkou. Nechte víčko kolonky otevřené a uzavřete ventilek vakuového systému. Po průtoku ethanolu přes kolonku QIAamp MinElute otevřete ventilek a uvolněte podtlak.



Pro aplikaci ethanolu na kolonku QIAamp MinElute používejte pipetové špičky s aerosolovou membránou.

16. Zavřete víčko kolonky QIAamp MinElute, odpojte ji od vakuového systému a vyhodte vakuový konektor (VC) do odpadu. Vložte kolonku QIAamp MinElute do promývací zkumavky (WT) z kroku 9 a centrifugujte při maximální rychlosti (přibližně 20 000 × g, nebo 14 000 ot./min) po dobu 1 min, aby došlo k úplnému vysušení membrány. Zlikvidujte promývací zkumavku (WT) obsahující filtrát.



Vynechání této centrifugace, při níž dochází k vysušení kolonky, může vést k inhibici navazující analýzy.

17. Umístěte kolonku QIAamp MinElute do nové promývací zkumavky (WT) a inkubujte s otevřeným víčkem při 56 °C po dobu 3 minut, aby se odpařila zbývající tekutina.

18. Vložte kolonku QIAamp MinElute do čisté eluční zkumavky (ET) a zlikvidujte promývací zkumavku (WT). Opatrně otevřete víko kolonky QIAamp MinElute a přidejte 20 µl nebo 60 µl elučního pufru (AVE) (v závislosti na navazující analýze) do středu membrány. Zavřete víčko a inkubujte při pokojové teplotě (15–25 °C) po dobu ≥3 minut. Centrifugujte při plné rychlosti (přibližně 20 000 × g, nebo 14 000 ot./min) po dobu 1 minuty, aby došlo k eluci virových nukleových kyselin.



Po provedení tohoto protokolu proveďte údržbu vakuového systému (pro bližší informace viz příručka dodávaná s vakuovým systémem).

Aktuální licenční informace a odmítnutí odpovědnosti specifická pro výrobek jsou uvedeny v příručce pro sadu QIAGEN nebo příručce uživatele. Příručky a uživatelské návody sady QIAGEN jsou k dispozici na stránkách [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com), nebo si je lze vyžádat u Technických služeb QIAGEN nebo lokálního distributora.

## Historie revizí

### Historie revizí dokumentu

R3 08/2018	Přidána vysvětlující poznámka ke kat. č. vakuové pumpy, viz str. 17. Aktualizována varování a bezpečnostní opatření. Aktualizovaný formát příručky.
---------------	---



---

**Tato stránka je úmyslně ponechána prázdná**

---

**Tato stránka je úmyslně ponechána prázdná**

---

**Tato stránka je úmyslně ponechána prázdná**

### Omezené licenční ujednání pro sadu QIAamp DSP Virus Kit

Používáním tohoto produktu vyjadřuje kterýkoliv kupující nebo uživatel produktu svůj souhlas s následujícími podmínkami:

1. Tento výrobek se může používat výhradně v souladu s protokoly poskytnutými s tímto výrobkem a touto příručkou a pro použití pouze s komponenty dodanými v soupravě. Společnost QIAGEN neposkytuje žádnou licenci svých duševních práv k používání nebo začlenění součástí, které jsou obsaženy v této soupravě, společně s kterýmikoliv součástmi, které nejsou v této soupravě obsaženy, s výjimkou případů popsaných v této příručce a dalších protokolech dostupných na stránkách [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Některé z těchto doplňujících protokolů byly poskytnuty uživatelům výrobků společnosti QIAGEN pro jiné uživatele výrobků QIAGEN. Tyto protokoly nebyly důkladně testovány ani optimalizovány společností QIAGEN. Společnost QIAGEN nezaručuje ani neposkytuje záruku na to, že neporušují práva třetích stran.
2. Společnost QIAGEN neposkytuje žádnou jinou záruku než výslovně stanovené licence v tom smyslu, že tato sada a/Nebo její použití nenarušuje práva třetích stran.
3. Tato sada a její komponenty jsou licencovány k jednorázovému použití a nesmí se používat opakovaně, přepřelobávat ani opakovaně prodávat.
4. Společnost QIAGEN specificky odmítá jakékoli další výslovné nebo nepřímé licence s výjimkou těch, které jsou uvedeny výslovně.
5. Kupující a uživatel této sady souhlasí s tím, že nepodnikne ani nikomu jinému neumožní podniknout žádné kroky, které by mohly vést k jakémukoli shora zakázané činnosti nebo ji usnadnily. Společnost QIAGEN může prosazovat zákazy tohoto ujednání o omezené licenci u kteréhokoliv soudu, a bude vyžadovat kompenzaci za veškeré náklady vynaložené na vyšetřování a soudní výlohy včetně poplatků za právní zástupce v případě jakéhokoliv soudního sporu s cílem prosadit toto ujednání o omezené licenci nebo kteréhokoliv ze svých práv k duševnímu vlastnictví v souvislosti se soupravou nebo jejími součástmi.

Pro aktualizovanou licenční ustanovení viz [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Ochranné známky: QIAGEN®, QIAamp®, artus®, MinElute® (QIAGEN Group); AMPLICOR HBV MONITOR®, AMPLICOR HCV MONITOR®, AMPLICOR HIV-1 MONITOR®, cobas®, TaqMan® (Roche Group); RealArt™ (artus GmbH); Eppendorf® (Eppendorf AG). Registrované názvy, ochranné známky atd. použité v tomto dokumentu, a to i v případě, že takto nejsou výslovně označeny, nejsou považovány za zákonem nechráněné.

1114514 08/2018 HB-0109-003 © 2018 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.

---

Objednávky [www.qiagen.com/shop](http://www.qiagen.com/shop) | Technická podpora [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) | Webová stránka [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)