

December 2017

QIAasymphony[®] SP -protokolark

Tissue_LC_200_V7_DSP og Tissue_HC_200_V7_DSP
(brugervalideret til QIAasymphony DSP DNA Mini-kit)

Dette dokument er Tissue_LC_200_V7_DSP og Tissue_HC_200_V7_DSP (brugervalideret til QIAasymphony DSP DNA Mini-kit)
QIAasymphony SP-protokolark, R2, til QIAasymphony DSP DNA Mini-kit, version 1.

Generelle oplysninger

QIAasymphony DSP DNA-kit er beregnet til in vitro-diagnostisk brug.

Disse protokoller er til oprensning af totalt DNA fra dyrkede celler og bakteriekulturer med anvendelse af QIAasymphony SP og QIAasymphony DSP DNA Mini-kittet.

Afhængig af prøvetypen anbefaler vi at anvende enten protokollen for lavt indhold (LC) eller højt indhold (HC). Dyrkede celler og bakteriekulturer vil give højere DNA-udbytte, når de behandles med protokollen for højt indhold, men protokollen for lavt indhold sammen med en lille elueringsmængde (50 µl) kan anvendes, hvis en høj DNA-koncentration er påkrævet.

QIAasymphony DSP DNA Mini-kittet i kombination med Tissue_LC_200_V7_DSP og Tissue_HC_200_V7_DSP (brugervalideret til QIAasymphony DSP DNA Mini-kittet)-protokoller til oprensning af totalt DNA fra dyrkede celler og bakteriekulturer er beregnet til molekylærbiologiske applikationer. Produktet er ikke beregnet til diagnosticering, forebyggelse eller behandling af en sygdom.

Bemærk: Det er brugerens ansvar at validere ydeevnen med denne kombination til alle procedurer, der anvendes på dennes laboratorium.

Protokol for lavt indhold

Kit	QIAasymphony DSP DNA Mini-kit (kat. nr. 937236)
Prøvemateriale	Dyrkede celler og bakteriekulturer Anbefalede maksimale prøvestørrelser: For cellekultur, 5×10^6 celler For bakterier, 1×10^9 celler
Protokolnavn	Tissue_LC_200_V7_DSP
Standardanalysekontrolsæt	ACS_Tissue_LC_200_V7_DSP
Elueringsmængde	50 µl, 100 µl, 200 µl eller 400 µl
Påkrævet softwareversion	Version 4.0 eller højere

Protokol for højt indhold

Kit	QIAsymphony DSP DNA Mini-kit (kat. nr. 937236)
Prøvemateriale	Dyrkede celler og bakteriekulturer Anbefalede maksimale prøvestørrelser: For cellekultur, 1×10^7 celler For bakterier, 4×10^9 celler
Protokolnavn	Tissue_HC_200_V7_DSP
Standardanalysekontrolsæt	ACS_Tissue_HC_200_V7_DSP
Elueringsmængde	100 µl, 200 µl eller 400 µl
Påkrævet softwareversion	Version 4.0 eller højere

Påkrævede materialer, der ikke medfølger

Til alle prøvetyper

- For at minimere RNA-indhold: RNase A (stamopløsning på 100 mg/ml) (katalognr. 19101)

For Gram-negative bakterier

- Buffer ATL (katalognr. 19076)

For Gram-positive bakterier

- Buffer P1 (katalognr. 19051)
- Lysozym (stamopløsning på 100 mg/ml)

For dyrkede celler

- Buffer P1 (katalognr. 19051)

Skuffen "Sample" (Prøve)

Prøvetype	Dyrkede celler og bakteriekulturer
Prøveinputmængde	220 µl (påkrævet pr. prøve, pr. protokol)*
Behandlet prøvemængde	200 µl
Primære prøveglass	i/r
Sekundære prøveglass	Se www.qiagen.com/goto/dsphandbooks for at få flere oplysninger.
Indsatser	Afhænger af den anvendte prøveglastype. Se www.qiagen.com/goto/dsphandbooks for at få flere oplysninger.

* For både protokoller med højt og lavt indhold kan systemet ikke registrere, at prøvemængden er under 220 µl, fordi prøveoverførslen sker uden væskenniveaudetektion. Derfor skal det tilsikres, at prøveinputmængden er 220 µl.
i/r = ikke relevant.

Skuffen "Reagents and Consumables" (Reagenser og forbrugsartikler)

Position A1 og/eller A2	Reagenspatron
Position B1	i/r
Spidsræckholder 1-17	Engangsfilterspidser, 200 µl eller 1500 µl
Enhedsboksholder 1-4	Enhedsbokse med prøveklargøringsbeholdere eller 8-stavs dæksler

i/r = ikke relevant.

Skuffen "Waste" (Affald)

Enhedsboksholder 1-4	Tomme enhedsbokse
Affaldsposeholder	Affaldspose
Holder til flaske til flydende affald	Tom flaske til flydende affald

Skuffen "Eluate" (Eluat)

Elueringsrack (vi anbefaler at anvende åbning 1, afkølingsposition)	Se www.qiagen.com/goto/dsphandbooks for at få flere oplysninger.
--	--

Påkrævede plastikprodukter

Plastikprodukter	En batch, 24 prøver*	To batches, 48 prøver*	Tre batches, 72 prøver*	Fire batches, 96 prøver*
Engangs filterspidser, 200 µl ^{††}	26	50	74	98

Plastikprodukter	En batch, 24 prøver*	To batches, 48 prøver*	Tre batches, 72 prøver*	Fire batches, 96 prøver*
Engangs filterspidser, 1500 µl††	72	136	200	264
Prøveklargøringsbeholdere‡	21	42	63	84
8-stavs dæksler†††	3	6	9	12

* Anvendelse af mindre end 24 prøver pr. batch reducerer antallet af engangsfilterspidser påkrævet pr. kørsel.

† Der er 32 filterspidser/spidsrack.

‡ Antal nødvendige filterspidser indeholder filterspidser til 1 indholdsscanning pr. reagensbeholder.

§ Der er 28 prøveklargøringsbeholdere/enhedsboks.

†† Der er tolv 8-stavs dæksler/enhedsboks.

Bemærk: Antallet af angivne filterspidser kan afvige fra det antal, der vises på berøringsskærmen, afhængigt af indstillinger. Vi anbefaler at isætte det størst mulige antal spidser.

Elueringsmængde

Elueringsmængden vælges på berøringsskærmen. Afhængig af prøvetypen og DNA-indholdet kan den endelige eluatmængde variere med op til 15 µl mindre end den valgte mængde. Da eluatmængden kan variere, anbefaler vi at tjekke den faktiske eluatmængde, når der anvendes et automatiseret analyseopsætningssystem, som ikke verificerer eluatmængden før overførslen. Eluering i lavere mængder øger den endelige DNA-koncentration, men reducerer udbyttet en smule. Vi anbefaler at anvende en elueringsmængde, der er passende for den tilsigtede senere anvendelse.

Klargøring af prøvemateriale

Når der arbejdes med kemikalier, skal der altid bæres egnet laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller. Der findes mere information i de tilhørende sikkerhedsdatablade (material safety data sheets, SDS'er), som kan fås hos den pågældende leverandør.

Vigtigt punkt før start

- QIASymphony magnetiske partikler oprenser både RNA og DNA, hvis begge er til stede i prøven. For at minimere indholdet af RNA i prøven tilsættes RNase A til prøven i de trin, som er angivet i den respektive forbehandlingsprotokol.

Ting, der skal gøres før start

- Hvis der anvendes Buffer ATL, skal det kontrolleres, at det ikke indeholder hvidt bundfald. Om nødvendigt inkuberes i 30 minutter ved 37 °C med lejlighedsvis rystning for at opløse bundfaldet.

- Indstil en ThermoMixer® eller rysteinkubator til den påkrævede temperatur til den respektive forbehandling.*

Dyrkede celler

Både friske og frosne dyrkede celler kan anvendes. Vi anbefaler, at der anvendes en protokol for højt indhold for op til 1×10^7 celler. Protokollen for lavt indhold vil resultere i lavere DNA-udbytte og anbefales kun i kombination med en lille elueringsmængde (50 µl), hvis der kræves høj DNA-koncentration. Frosne cellepellet'er skal resuspenderes i Buffer P1 som beskrevet i forbehandlingsprotokollen.

Forbehandlingsprotokol for dyrkede celler

- Centrifuger maksimalt 1×10^7 celler ved 300 x g i 5 minutter ved stuetemperatur (15–25 °C). Fjern og kassér supernatanten, og pas på ikke at forstyrre cellepellet'en.

Bemærk: Cellepellet'en kan opbevares ved –20 °C eller –70 °C til fremtidig brug eller kan anvendes med det samme.

- Resuspender pellet'en i 220 µl Buffer P1, og overfør prøven til et 2 ml mikrocentrifugeglas (ikke leveret).
- Tilsæt 20 µl proteinase K, og bland ved at banke let på glasset.

Bemærk: Anvend proteinase K fra enzymracket i QIASymphony DSP DNA Mini-kittet.

- Anbring glasset i en ThermoMixer eller rysteinkubator, og inkuber ved 56 °C med rystning ved 900 o/min i 30 minutter til 2 timer.

Bemærk: Lyseringstiden afhænger af celletype og celleantal. Hvis lyseringen er ufuldstændig efter 2 timer som angivet af tilstedeværelse af uopløseligt materiale eller meget viskøse lysater, kan lyseringstiden forlænges eller uopløseligt materiale fjernes ved centrifugering som beskrevet i trin 6. Lysering i løbet af natten er mulig og påvirker ikke klargøringen.

- For at minimere RNA-indholdet i prøven tilsættes 4 µl RNase A (100 mg/ml) og inkuberes i 2 minutter ved stuetemperatur (15–25 °C), før der fortsættes med trin 6.
- Overfør forsigtigt 220 µl af lysatet til prøveglas, der er kompatible med QIASymphony SP's prøveholder.

Bemærk: Hvis lysater indeholder uopløst materiale, centrifugeres de for fuld hastighed i 2 minutter ved stuetemperatur, før supernatanten overføres til prøveglas. Du kan se en oversigt over kompatible prøveglas på www.qiagen.com/goto/dsphandbooks. Vi anbefaler, at der anvendes 2 ml glas (f.eks. Sarstedt® katalognr. 72.693 eller 72.608).

* Sørg for, at instrumenterne regelmæssigt kontrolleres, vedligeholdes og kalibreres efter producentens anvisninger.

Bakterier

Både friske og frosne bakteriekulturer kan anvendes. Vi anbefaler, at der anvendes en protokol for højt indhold med op til 4×10^9 celler. Protokollen for lavt indhold vil resultere i lavere DNA-udbytte og anbefales kun i kombination med en lille elueringsmængde (50 μ l), hvis der kræves høj DNA-koncentration. Bakterievækst måles sædvanligvis som optisk tæthed (OD) af bakteriekulturen ved hjælp af et spektrofotometer. OD-aflæsningerne er dog stærkt afhængige af, hvilken type spektrofotometer der anvendes, og af den målte bakterieart. Vi anbefaler derfor at kalibrere spektrofotometeret ved at korrelere målte OD'er til bakteriecelleantal. Frosne pellet'er skal resuspenderes i Buffer P1 (Gram-positive bakterier) eller Buffer ATL (Gram-negative bakterier) som beskrevet i forbehandlingsprotokollerne.

Forbehandlingsprotokol for Gram-negative bakterier

- Høst maksimalt 4×10^9 celler ved centrifugering i 10 minutter ved 5000 x g ved stuetemperatur (15–25 °C). Fjern og kassér supernatanten, og pas på ikke at forstyrre bakteriepellet'en.

Bemærk: Cellepellet'en kan opbevares ved –20 °C eller –70 °C til fremtidig brug eller kan anvendes med det samme.

- Resuspender bakteriepellet'en i 220 μ l Buffer ATL, og overfør prøven til et 2 ml mikrocentrifugeglas (ikke leveret).
- Tilsæt 20 μ l proteinase K, og bland ved at banke let på glasset.

Bemærk: Anvend proteinase K fra enzymracket i QIAasympy DSP DNA Mini-kittet.

- Anbring glasset i en ThermoMixer eller rysteinkubator, og inkuber ved 56 °C med rystning ved 900 o/min i 30 minutter til 2 timer.

Bemærk: Lyseringstiden afhænger af celletype og celleantal. Hvis lyseringen er ufuldstændig efter 2 timer som angivet af tilstedeværelse af uopløseligt materiale eller meget viskøse lysater, kan lyseringstiden forlænges eller uopløseligt materiale fjernes ved centrifugering som beskrevet i trin 6.

- For at minimere RNA-indholdet i prøven tilsættes 4 μ l RNase A (100 mg/ml) og inkuberes i 2 minutter ved stuetemperatur, før der fortsættes med trin 6.
- Overfør forsigtigt 220 μ l af lysatet til prøveglas, der er kompatible med QIAasympy SP's prøveholder.

Bemærk: Hvis lysater indeholder uopløst materiale, centrifugeres de for fuld hastighed i 2 minutter ved stuetemperatur, før supernatanten overføres til prøveglas. Du kan se en oversigt over kompatible prøveglas på www.qiagen.com/goto/dsphandbooks. Vi anbefaler, at der anvendes 2 ml glas (f.eks. Sarstedt katalognr. 72.693 eller 72.608).

Forbehandlingsprotokol for Gram-positive bakterier

- Høst maksimalt 4×10^9 celler ved centrifugering i 10 minutter ved 5000 x g ved stuetemperatur (15–25 °C). Fjern og kassér supernatanten, og pas på ikke at forstyrre bakteriepellet'en.

Bemærk: Cellepellet'en kan opbevares ved –20 °C eller –70 °C til fremtidig brug eller kan anvendes med det samme.

- Resuspender bakteriepellet'en i 200 µl Buffer P1, og overfør prøven til et 2 ml mikrocentrifugeglas (ikke leveret).
- Tilføj 20 µl lysozym (100 mg/ml), og bland ved at banke let på glasset.
- Anbring glasset i en ThermoMixer eller rysteinkubator, og inkuber ved 37 °C med rystning ved 900 o/min i 30 minutter til 2 timer.

Bemærk: Lyseringstiden afhænger af cellestype og celleantal.

- Tilsæt 20 µl proteinase K, og bland ved at banke let på glasset.

Bemærk: Anvend proteinase K fra enzymracket i QIASymphony DSP DNA Mini-kittet.

- Inkuber ved 56 °C med rystning ved 900 o/min i 30 minutter.
- For at minimere RNA-indholdet i prøven tilsættes 4 µl RNase A (100 mg/ml) og inkuberes i 2 minutter ved stuetemperatur, før der fortsættes med trin 8.
- Overfør forsigtigt 220 µl af lysatet til prøveglas, der er kompatible med QIASymphony SP's prøveholder.

Bemærk: Hvis lysater indeholder uopløst materiale, centrifugeres de for fuld hastighed i 2 minutter ved stuetemperatur, før supernatanten overføres til prøveglas. Du kan se en oversigt over kompatible prøveglas på www.qiagen.com/goto/dsphandbooks. Vi anbefaler, at der anvendes 2 ml glas (f.eks. Sarstedt katalognr. 72.693 eller 72.608).

Revisionshistorik

Revisionshistorik for dokumentet	
R2 12/2017	Opdatering til QIASymphony softwareversion 5.0

For opdateret licensinformation og produktspecifikke ansvarsfraskrivelser henvises til den aktuelle QIAGEN® kit-håndbog eller brugervejledning. QIAGEN-kithåndbøger og brugervejledninger kan findes på www.qiagen.com eller kan rekvireres fra QIAGENS tekniske serviceafdeling eller den lokale leverandør.

Varemærker: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony® (QIAGEN Group); Sarstedt® (Sarstedt AG and Co.); ThermoMixer® (Eppendorf AG). Registrerede navne, varemærker osv., som er anvendt i dette dokument, selv når de ikke specifikt er markeret som sådan, skal ikke betragtes som værende juridisk ubeskyttede.
12/2017 HB-0977-S09-002 © 2017 QIAGEN, alle rettigheder forbeholdes.

Bestilling www.qiagen.com/shop | Teknisk support support.qiagen.com | Websted www.qiagen.com