

Декабрь 2020 г.

Протокол для СИСТЕМЫ QIAasymphony[®] SP

circDNA_2000_DSP_V2 и
circDNA_4000_DSP_V2

Настоящий документ — «Протокол для QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit, версия 2, R1»

Общая информация

Для диагностики in vitro.

Настоящий протокол описывает порядок выделения циркулирующей внеклеточной ДНК человека из свежей или замороженной плазмы и мочи человека с использованием системы QIASymphony SP и набора QIASymphony DSP Circulating DNA Kit.

Набор	QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (№ по кат. 937556)	
Материал образцов	Плазма человека: защищенная от свертывания ЭДТА или цитратом либо с консервантом для стабилизации ccfDNA Моча человека: нестабилизированная либо стабилизированная	
Имя протокола	circDNA_2000_DSP_V2	circDNA_4000_DSP_V2
Набор контролей тест-системы	ACS_circDNA_2000_DSP_V2	ACS_circDNA_4000_DSP_V2
Элюирующий объем	60 мкл	60 мкл
Необходимая версия программного обеспечения	Версия 4.0 или выше	Версия 5.0 или выше

Ящик Sample (Проба)

Тип пробы	Плазма крови человека (см. «Приготовления материала образцов») и моча человека (стабилизированная либо нестабилизированная)
Объем пробы	Зависит от типа используемой пробирки Подробнее см. в перечне лабораторного оборудования на вкладке ресурсов страницы изделия на веб-сайте по адресу: www.qiagen.com .
Первичные пробирки	н/п
Вторичные пробирки	Подробнее см. в перечне лабораторного оборудования на вкладке ресурсов страницы изделия на веб-сайте по адресу: www.qiagen.com .
Вставки	н/п
Прочее	Протеиназу К необходимо вносить в слот А (позиция 1 и/или 2)

н/п = неприменимо.

Приготовление протеиназы К в ящике Sample (Проба)

В состав набора QIASymphony DSP Circulating DNA Kit входит готовый к использованию раствор протеиназы К, который можно хранить при комнатной температуре (15–25 °С).

Примечание. Пробирки с протеиназой К помещаются в держатель для пробирок. Пробирки с протеиназой К необходимо помещать в позиции 1 и/или 2 слота А ящика Sample (Проба). Необходимый тип пробирок см. в перечне лабораторного оборудования на вкладке ресурсов страницы изделия на веб-сайте по адресу: www.qiagen.com.

Количество проб*	circDNA_2000_DSP	circDNA_4000_DSP
8	1980 мкл	2860 мкл
24	3740 мкл	6380 мкл
48	6380 мкл	11 660 мкл
72	9020 мкл	18 040 мкл†
96	11 660 мкл	23 320 мкл†

* Для каждой пробы необходимо 110 мкл для circDNA_2000_DSP или 220 мкл для circDNA_4000_DSP, а также дополнительный свободный объем 1100 мкл [(n x 110 или 220 мкл) + 1100 мкл].

† Для circDNA_4000_DSP: При обработке более 48 проб используйте вторую пробирку. Максимальный загружаемый объем на одну пробирку составляет 11 660 мкл. Для второй пробирки необходим дополнительный свободный объем 1100 мкл.

Ящик Reagents and Consumables (Реагенты и расходные материалы)

Позиция A1 и/или A2	Картридж с реагентами
Позиция B1	н/п
Держатель штативов с наконечниками 1–18	Одноразовые наконечники с фильтрами, 200 мкл или 1500 мкл
Держатель вставного отсека 1–4	Вставные отсеки с картриджами для приготовления проб или 8-Rod Covers

н/п = неприменимо.

Ящик Waste (Отходы)

Держатель вставного отсека 1–4	Опорожните вставные отсеки
Держатель мешка для отходов	Мешок для отходов
Держатель бутылки для жидких отходов	Пустой флакон для жидких отходов

Ящик Eluate (Элюат)

Штатив для элюирования (рекомендуется использовать слот 1, позицию для охлаждения)	Подробнее см. в перечне лабораторного оборудования на вкладке ресурсов страницы изделия на веб-сайте по адресу: www.qiagen.com .
--	--

Необходимая пластиковая посуда

Protocol circDNA_2000_DSP

Пластиковая посуда	Одна партия 24 пробы*	Две партии 48 проб*	Три партии 72 пробы*	Четыре партии 96 проб*
Одноразовые наконечники с фильтрами, 200 мкл ^{†‡}	28	56	84	112
Одноразовые наконечники с фильтрами, 1500 мкл ^{†‡}	56	112	168	224
Картриджи для подготовки проб [§]	15	30	45	60
8-Rod Covers [¶]	3	6	9	12

* При использовании менее 24 проб на партию сокращается количество необходимых для одного цикла одноразовых наконечников с фильтрами.

† 32 наконечника с фильтрами/штатив с наконечниками с фильтрами.

‡ Количество необходимых наконечников с фильтрами включает наконечники с фильтрами для 1 инвентарного сканирования на каждый картридж для реагентов.

§ Содержит 28 картриджей для подготовки проб / вставных отсеков.

¶ Содержит двенадцать 8-Rod Covers / вставных отсеков.

Protocol circDNA_4000_DSP

Пластиковая посуда	Одна партия 24 пробы*	Две партии 48 проб*	Три партии 72 пробы*	Четыре партии 96 проб*
Одноразовые наконечники с фильтрами, 200 мкл ^{†‡}	28	56	84	112
Одноразовые наконечники с фильтрами, 1500 мкл ^{†‡}	96	192	288	384
Картриджи для подготовки проб [§]	18	36	54	72
8-Rod Covers [¶]	3	6	9	12

* При использовании менее 24 проб на партию сокращается количество необходимых для одного цикла одноразовых наконечников с фильтрами.

[†] 32 наконечника с фильтрами/штатив с наконечниками с фильтрами.

[‡] Количество необходимых наконечников с фильтрами включает наконечники с фильтрами для 1 инвентарного сканирования на каждый картридж для реагентов.

[§] Содержит 28 картриджей для подготовки проб / вставных отсеков.

[¶] Содержит двенадцать 8-Rod Covers / вставных отсеков.

Примечание. Указанные количества наконечников с фильтрами могут отличаться от числовых значений, отображаемых на сенсорном экране (зависит от настроек). Рекомендуется загружать максимально возможное количество наконечников.

Элюирующий объем

Выбранный элюирующий объем	Исходный элюирующий объем
60 мкл	75 мкл

Элюирующий объем выбирается на сенсорном экране. Средний доступный элюирующий объем ≥ 60 мкл. В отдельных случаях конечный объем элюата для определенных проб может быть меньше выбранного значения объема на величину до 5 мкл (например, 55 мкл). Рекомендуется проверять фактический объем элюата при использовании автоматизированной тест-системы постановки анализа, которая не проверяет объем элюата перед переносом.

Хранение элюатов

Рекомендуется извлекать планшет с элюатами из ящика Eluate (Элюат) сразу после завершения цикла. Планшеты с элюатами можно оставлять в системе QIASymphony SP после завершения цикла на ночь (не более чем на 16 часов, включая время выполнения цикла; рекомендуемые условия окружающей среды: 18–26 °C и относительная влажность 20–75 %). В зависимости от температуры и влажности элюат может конденсироваться или испаряться.

После приготовления проб элюаты можно хранить при температуре 2–8 °C не более 1 месяца. Возможно длительное хранение элюатов при температуре от –30 °C до –15 °C или от –90 °C до –65 °C. Нельзя допускать оттаивания замороженных элюатов более 3 раз.

Приготовления материала образцов

При работе с химическими веществами обязательно надевайте соответствующие халат, одноразовые перчатки и защитные очки. Подробнее см. в соответствующих паспортах безопасности (ПБ), предоставляемых поставщиком продукции.

Важные замечания перед началом работы

- Не допускайте образования пены внутри проб или на их поверхности.
- Перед началом цикла необходимо довести образцы до комнатной температуры (15–25 °C).

Плазма человека

Для приготовления плазмы крови можно использовать образцы крови с ЭДТА или цитратом в качестве антикоагулянта. Можно также использовать плазму, приготовленную из образцов в пробирках для сбора крови с консервантом для стабилизации ccfDNA. Плазму следует получать согласно указаниям производителя.

При использовании ЭДТА или цитрата в качестве антикоагулянта рекомендуется отделять плазму непосредственно после забора крови.

Для выполнения определенных задач на последующих этапах исследования может потребоваться исключить или свести к минимуму присутствие нуклеиновых кислот из везикул. В таких случаях рекомендуется проводить этап высокоскоростного центрифугирования при 16 000 x *g* в течение 10 минут при комнатной температуре (15–25 °C) после первоначального получения плазмы.

После сбора и центрифугирования плазму можно хранить при комнатной температуре до 7 суток и при температуре 2–8 °C до 14 суток. Для более длительного хранения рекомендуется замораживать аликвоты при температуре от –20 °C до –80 °C. Нельзя допускать оттаивания замороженной плазмы более 3 раз. Повторяющиеся циклы замораживания и оттаивания приводят к денатурации и осаждению белков и к уменьшению выхода циркулирующих внеклеточных нуклеиновых кислот. Если в образцах видны криопреципитаты, центрифугируйте их при 6800 x *g* в течение 3 минут при комнатной температуре (15–25 °C) и перенесите супернатанты, не потревожив осадок, во вторичные пробирки (см. перечень лабораторного оборудования на вкладке ресурсов страницы изделия на веб-сайте по адресу: www.qiagen.com). Немедленно начните процедуру выделения.

Моча человека

В связи с быстрой деградацией циркулирующей внеклеточной ДНК после сбора мочи настоятельно рекомендуется немедленно стабилизировать образцы мочи.

Стабилизированная моча человека

Стабилизированную мочу можно хранить при комнатной температуре (15–25 °C) или при 2–8 °C до 7 суток. Для более длительного хранения рекомендуется замораживать аликвоты при температуре от –30 °C до –15 °C или от –90 °C до –65 °C.

Предварительная обработка стабилизированных образцов мочи не требуется. После стабилизации рекомендуется центрифугировать образцы мочи при низкой скорости (1900 x g) в течение 10 минут при комнатной температуре (15–25 °C), чтобы удалить клетки до выделения циркулирующей внеклеточной ДНК. Если после центрифугирования в супернатантах виден осадок, нагрейте образцы до 25 °C на водяной бане, чтобы растворить осадок. Перед запуском цикла перенесите стабилизированные пробы мочи во вторичные пробирки, а затем загрузите пробирки в держатель для проб (см. перечень лабораторного оборудования на вкладке ресурсов страницы изделия на веб-сайте по адресу: www.qiagen.com).

«Нестабилизированная» моча человека

Перед началом работы по протоколу, согласно которому требуется использовать Buffer ATL, проверьте, образовался ли в Buffer ATL осадок. При необходимости растворите осадок путем нагревания до температуры 70 °C на водяной бане при осторожном помешивании. Аспирируйте пузырьки с поверхности Buffer ATL.

Примечание. Buffer ATL (Buffer ATL, 4 x 50 мл, № по кат. 939016) не входит в набор QIASymphony DSP Circulating DNA Kit, и его необходимо заказывать отдельно.

Сразу после забора образцов мочи рекомендуется центрифугировать их при низкой скорости (1900 x g) в течение 10 минут при комнатной температуре (15–25 °C), чтобы удалить клетки. Нестабилизированные образцы мочи нуждаются в предварительной обработке.

Важно! Перед началом предварительной обработки доведите образцы до комнатной температуры (15–25 °C).

Важно! Центрифугирование и предварительная обработка должны проводиться в течение 4 часов с момента забора образцов мочи.

- Смешайте 2500 мкл мочи (circDNA_2000_DSP) или 4500 мкл мочи (circDNA_4000_DSP) с 250 мкл или 450 мкл Buffer ATL соответственно.
- Инкубируйте образцы при комнатной температуре (15–25 °C) в течение 1 часа.

- Центрифугируйте образцы при 1900 x g в течение 10 минут при комнатной температуре (15–25 °C).

Если после центрифугирования в супернатанте виден осадок, нагрейте образцы до 25 °C на водяной бане, чтобы растворить осадок.

- Перенесите супернатанты во вторичные пробирки, а затем загрузите пробирки в держатель для проб (см. перечень лабораторного оборудования на вкладке ресурсов страницы изделия на веб-сайте по адресу: www.qiagen.com).

Важно! В нестабилизированной моче стабильность и целостность циркулирующей внеклеточной ДНК ограничены. Рекомендуется загружать не более одной партии из 24 проб на один цикл QIASymphony, чтобы свести к минимуму время обработки образцов мочи.

Интерферирующие вещества

При использовании образцов плазмы с высоким содержанием гамма-глобулина (> 30 г/л) возможно снижение выхода циркулирующей внеклеточной ДНК.

История изменения

Дата	Изменения
Версия 2, R1 декабрь 2020 г.	Первый выпуск.

Свежую информацию о лицензиях, а также заявления об отказе об ответственности применительно к конкретным продуктам см. в соответствующем руководстве к набору QIAGEN или руководстве пользователя. С руководствами к наборам QIAGEN и руководствами пользователя можно ознакомиться на веб-сайте по адресу www.qiagen.com. Их также можно заказать через техническую службу QIAGEN или регионального дистрибьютора.

Товарные знаки: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony® (группа QIAGEN). Используемые в настоящем документе зарегистрированные наименования, товарные знаки и т. п., даже не отмеченные специально как таковые, не должны рассматриваться как не защищенные законодательством.

12/2020 HB-2309-S02-001 © QIAGEN, 2020 г. Все права защищены.

Для заказа: www.qiagen.com/shop | Техническая поддержка: support.qiagen.com | Веб-сайт: www.qiagen.com