

Augusti 2018

Handbok till QIAamp[®] DSP Virus Kit



QIAamp DSP Virus Kit är ett allmänt system som använder QIAamp-teknologi för isolering och rening av virala nukleinsyror från human plasma eller serumprover för in vitro-diagnostiska procedurer.

För in vitro-diagnostisk användning

IVD

CE

REF

60704

i

1114514SV

QIAGEN

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, TYSKLAND

R3 MAT

1114514SV

Innehåll

Kitinnehåll.....	3
Symboler	4
Förvaring.....	6
Kvalitetskontroll	6
Avsedd användning.....	7
Begränsningar för produktanvändning	7
Varningar och försiktighet.....	8
Inledning	10
Princip och utförande.....	10
Prestandaegenskaper.....	11
Utrustning och reagenser som ska tillhandahållas av användaren.....	16
Viktiga anmärkningar.....	17
Viktigt att tänka på före start.....	17
Beredning av RNA	18
Förvaring av prover	18
Beredning av reagenser och buffertar	19
Eluering av virala nukleinsyror	22
De virala nukleinsyrornas utbyte och kvalitet.....	23
Montera vakuumsystemet QIAvac 24 Plus	24
Protokoll: Isolering och rening av virala nukleinsyror från plasma eller serum.....	27
Revisionshistorik	31

Kitinnehåll

QIAamp DSP Virus Kit			
Katalognr.			60704
Antal beredningar			50
QIAamp MinElute®	QIAamp MinElute-kolonner med tvättrör (WT) (2 ml)	COL	50
EXT	Column Extenders (Kolonnförlängare) (3 ml)	COL EXT	50
ET	Elution Tubes (Elueringsrör) (1,5 ml)	ELU TUBE	50
VC	VacConnectors (Vakuumanslutningar)	VAC CON	50
LT	Lysis Tubes (Lyseringsrör) (2 ml)	LYS TUBE	50
WT	Wash Tubes (Tvättrör) (2 ml)	WASH TUBE	50
AL	Lysis Buffer* (Lyseringsbuffert)	LYS BUF	33 ml
AW1	Wash Buffer 1* (Tvättbuffert 1) (koncentrat)	WASH BUF 1 CON	19 ml
AW2	Wash Buffer 2† (Tvättbuffert 2) (koncentrat)	WASH BUF 2 CON	13 ml
AVE	Elution Buffer† (Elueringsbuffert) (lila lock)	ELU BUF	4 x 2 ml
PS	Protease Solvent† (Proteaslösningsmedel)	QPROT SOLV	4,4 ml
Bärare	Carrier-RNA (Bärrar-RNA) (röda lock)	CAR RNA	310
QP	QIAGEN® Protease (QIAGEN®-proteas)	QPROT	1 flaska

* Innehåller guanidinhydroklorid. Inte kompatibel med desinfektionsmedel med blekmedel. Säkerhetsinformation finns på sidan 8.

† Innehåller natriumazid som konserveringsmedel.

‡ Resuspensionsvolym 4,4 ml.

Symboler



Kitet innehåller reagens för 50 provpreparat



Se informationen i handboken



Använd före

IVD

In vitro-diagnostisk medicinsk produkt

REF

Katalognummer

LOT

Lotnummer

MAT

Materialnummer

COMP

Komponenter

VOL

Volym



Temperaturbegränsningar



Vid ankomst



Laglig tillverkare

Viktig anmärkning



Byt handskar efter protokollsteg med denna markering



Öppna vid leverans. Förvara QIAamp Mini-spinnkolonner vid 2-8 °C

GTIN

GS-artikelnummer



Skriv ner aktuellt datum efter tillsats av etanol i flaskan

ADD

Tillsätta

CONT

Innehåller

LYOPH

Frystorkad

RCNS

Rekonstituera

EtOH

Etanol

GuHCl

Guanidinhydroklorid

MALEIC ACID

Maleinsyra

SUBT

Subtilisin



Leder till

Förvaring

QIAamp MinElute-kolonnerna ska förvaras vid 2-8 °C vid ankomsten.

Alla buffertar kan förvaras i rumstemperatur (15-25 °C).

Frystorkat bärar-RNA kan förvaras vid rumstemperatur fram till utgångsdatumet. Bärar-RNA kan endast lösas upp i elueringsbuffert (AVE), upplöst bärar-RNA ska omedelbart tillsättas till lyseringsbuffert (AL) enligt beskrivningen på sidan 19. Denna lösning ska beredas färsk, och är hållbar vid 2-8 °C i upp till 48 timmar. Oanvända delar av bärar-RNA upplöst i elueringsbuffert (AVE) ska frysas i alikvoter vid -20 °C.

Frystorkat QIAGEN-proteas (QP) kan förvaras i rumstemperatur fram till utgångsdatumet utan att dess prestanda påverkas.

Rekonstituerat QIAGEN-proteas (QP) är hållbart i upp till 1 år vid förvaring i 2–8 °C, men endast fram till utgångsdatumet.

Rekonstituerad tvättbuffert 1 (AW1) och rekonstituerad tvättbuffert 2 (AW2) är hållbara i upp till 1 år vid förvaring i rumstemperatur, men endast fram till utgångsdatumet.

Kvalitetskontroll

I enlighet med QIAGENs certifierade totala kvalitetshanteringssystem testas varje batch QIAamp DSP Virus Kit mot förbestämda specifikationer för att garantera konstant produktkvalitet.

Avsedd användning

QIAamp DSP Virus Kit är ett allmänt system som använder QIAamp-teknologi för isolering och rening av virala nukleinsyror från human plasma eller serumprover för in vitro-diagnostiska ändamål. Ett diagnostiskt resultat genererat med provförberedningsmetoden tillsammans med en efterföljande diagnostisk NAT-analys bör tolkas med hänsyn tagen till andra kliniska undersökningar eller laboratorieundersökningar.

Produkten är avsedd för användning av professionella användare som laboratoriepersonal och läkare utbildade i molekylärbiologiska tekniker. Den är utformad för användning med efterföljande applikation som använder enzymatisk amplifiering eller annan enzymatisk modifiering av DNA eller RNA följt av signaldetektion eller amplifiering. De isolerade och renade virala nukleinsyrorna kan användas vid kvalitativa (t.ex. blodscreening) såväl som kvantitativa (t.ex. virala belastningsövervakning) diagnostiska NAT-analyser.

För att minimera oegentligheter i diagnostiska resultat är produkten avsedd att användas med en intern kontroll såväl som positiva och negativa kontroller under provberedningsprocessen, och provförstärkning och detektering i enlighet med den använda nedströmsanalysen.

Den här produkten är utformad för användning med QIAvac 24 Plus-vakuumsystemet eller ett liknande vakuumsystem.

Begränsningar för produktanvändning

Kitet är inte till för användning med blod, vävnad, benmärg eller odlade celler. Kitet är inte heller till för isolering och rening av nukleinsyror från bakterier, svampar eller parasiter. Kitets prestanda vid isolering och rening av virala nukleinsyror från andra cellfria kroppsvätskor, såsom urin och CSF, har inte utvärderats.

Varningar och försiktighet

Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (safety data sheets, SDS). De är tillgängliga på webben i behändigt PDF-format på adressen www.qiagen.com/safety, där du kan visa och skriva ut säkerhetsdatablad för varje QIAGEN-kit och kitkomponent.

FÖRSIKTIGHET: Tillsätt inte blekmedel eller sura lösningar i avfallet från provberedningen.

Lyseringsbuffert (AL) och tvättbuffert 1 (AW1) innehåller guanidinhydroklorid som kan bilda mycket reaktiva föreningar i kombination med blekmedel. Om vätska med dessa buffertar spills ut ska rengöring utföras med lämpliga laboratorierengöringsmedel och vatten. Om den spillda vätskan innehåller potentiellt smittsamma ämnen ska området först rengöras med laboratorierengöringsmedel och vatten och därefter med 1 % (v/v) natriumhypoklorit.

Om buffertflaskorna är skadade eller läcker ska man använda handskar och skyddsglasögon när flaskorna kastas för att undvika personlig skada eller skada på andra.

QIAGEN har inte testat vätskeavfallet som genereras av QIAamp DSP Virus-proceduren för resterande smittbärande material. Därför bör universella försiktighetsåtgärder (handskar, labbrockar och ögonskydd) användas för hantering av potentiellt smittsamt humant källmaterial vid arbete med denna produkt, och flytande avfall måste betraktas som smittsamt och hanteras och kasseras i enlighet med lokala säkerhetsbestämmelser.

Nedanstående faro- och skyddsangivelser gäller för komponenter i QIAamp DSP Virus Kit.

AL-buffert



Innehåller: guanidinhydroklorid; maleinsyra. Varning! Kan vara skadligt vid förtäring eller inandning. Irriterar huden. Kan orsaka allergisk hudreaktion. Orsakar allvarlig ögonirritation. Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd.

AW1-buffert



Innehåller: guanidinhydroklorid. Varning! Skadligt vid förtäring eller inandning. Irriterar huden. Orsakar allvarlig ögonirritation. Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd.

QIAGEN-proteas



Innehåller: subtilisin. Fara! Farligt vid förtäring. Irriterar huden. Orsakar allvarlig ögonskada. Kan orsaka allergi- eller astmasymptom eller andningssvårigheter vid inandning. Kan orsaka andningsirritation. Inandas inte damm/rök/gaser/dimma/ångor/sprej. Använd



skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd. Använd andningsskydd. VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i



flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja. Vid exponering eller oro: Kontakta genast GIFTINFORMATIONSCENTRAL eller läkare. Flytta personen till frisk luft och se till att han eller hon vilar i en ställning som underlättar andningen.

Inledning

The QIAamp DSP Virus Kit använder en väletablerad teknik för samtidig isolering och rening av viralt DNA och RNA. QIAamp DSP Virus-proceduren innehåller en kombination av det kvartsbaserade membranets selektivt bindande egenskaper med minimala elueringsvolymerna på 20 eller 60 µl.

Processen är lämplig för användning med plasma eller serum, vilka kan innehålla citrat eller EDTA. Proverna kan vara färska, lyofiliserade eller frysta, förutsatt att de inte har frysts ned och tinats upp mer än en gång. Proceduren kan användas för isolering av viralt RNA och DNA från ett brett urval av RNA- och DNA-virus. Processen är utformad för att undvika risken för korskontamination mellan prover och medger säker hantering av potentiellt smittbärande prover. Proceduren är mycket väl lämpad för simultan bearbetning av flera prover. Virala nukleinsyror elueras i elueringsbuffert (AVE), bruksfärdigt för förstärkningsreaktioner eller förvaring vid -20 °C.

Princip och utförande

QIAamp DSP Virus-proceduren består av 4 steg:

- Lysering av viruspartiklarna i provet
- Bindning av virala nukleinsyror i lysatet till membranet i en QIAamp MinElute-kolonn
- Tvättning av membranet
- Eluering av de virala nukleinsyrorerna från membranet

Proceduren utförs med hjälp av QIAamp MinElute-kolonner på ett vakuumprenör.

Lysering av viruspartiklar

Prov lyseras under denatureringsförhållanden vid förhöjda temperaturer. Lysering utförs i närvaro av QIAGEN-proteas (QP) och lyseringsbuffert (AL), som tillsammans säkerställer inaktivering av RNaser.

Bindning av nukleinsyror till QIAamp MinElute-kolonnmembranet

För att optimera bindningen av viralt DNA och RNA till QIAamp MinElute-kolonnmembranet, tillsätts först etanol till lysaten. Varje lysat appliceras därefter till en QIAamp MinElute-kolonn, och virala nukleinsyror adsorberas till det kiselbaserade membranet när lysatet dras igenom detta med hjälp av vakuumtryck.

Avlägsnande av restkontaminanter

Medan de virala nukleinsyrorna kvarstår som bundna till membranet i QIAamp MinElute-kolonnmembranet tvättas kontaminanter effektivt bort med hjälp av först tvättbuffert 1 (AW1), sedan tvättbuffert 2 (AW2) och därefter etanol.

Eluering av rena nukleinsyror

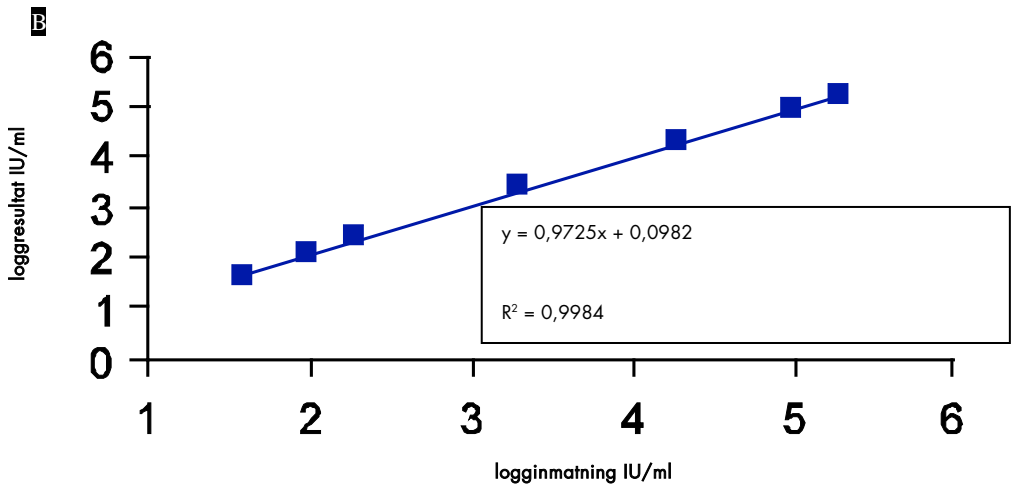
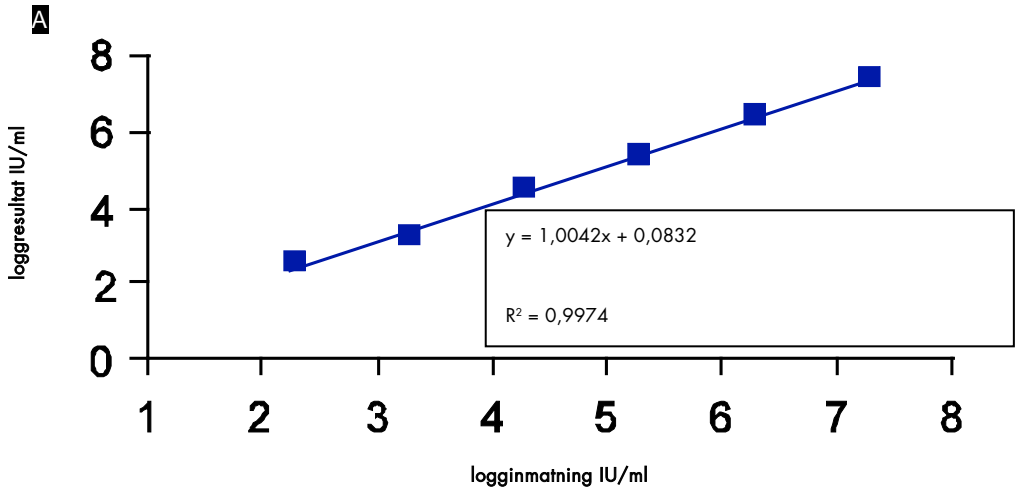
Virala nukleinsyror elueras från QIAamp MinElute-kolonnmembranet med hjälp av elueringsbuffert (AVE). QIAamp MinElute-kolonner möjliggör elueringsvolymmer på 20 µl eller 60 µl.

Prestandaegenskaper

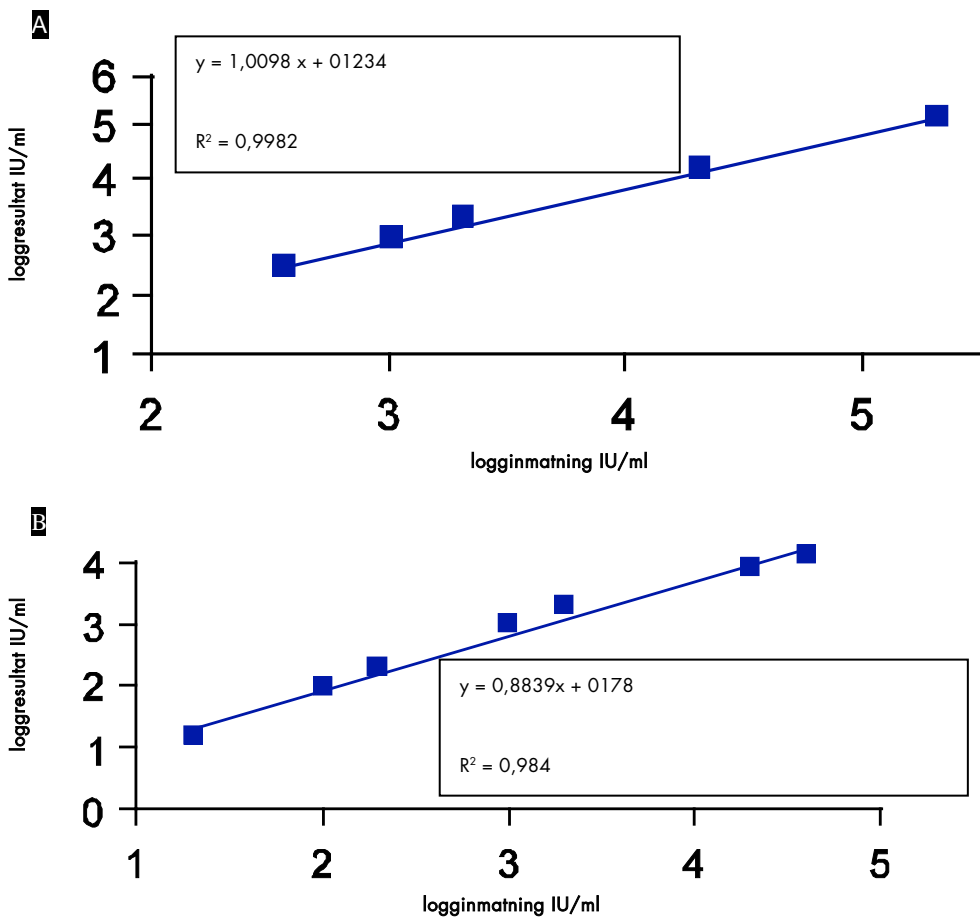
QIAamp DSP Virus-procedurens linjära intervall har bestämts för HIV-RNA och HBV-DNA i flera diagnostiska nedströmsanalyser (Tabell 1, Figur 1 och Figur 2).

Tabell 1.-Diagnostiska nedströmsanalyser där QIAamp DSP Virus-procedurens linjära intervall har testats

Analys	Kit
Realtids-RT-PCR av HIV-RNA	TaqMan [®] -analys och cobas [®] AMPLICOR HIV-1 MONITOR [®] -test
Realtids-PCR av HBV-DNA	TaqMan-analys och cobas AMPLICOR HBV MONITOR [®] -test



Figur 1. QIAamp DSP Virus-procedurens linjära intervall vid användning av TaqMan-analyser. QIAamp DSP Virus-procedurens linjära intervall vid 60 µl elueringsvolym bestämdes med hjälp av TaqMan-analyser för **A** HIV-RNA och **B** HBV-DNA.



Figur 2. QIAamp DSP Virus-procedurens linjära intervall vid användning av cobas AMPLICOR MONITOR-tester. QIAamp DSP Virus-procedurens linjära intervall vid 60 µl elueringsvolym bestämdes med hjälp av cobas AMPLICOR MONITOR-tester för **A** HIV-RNA och **B** HBV-DNA.

Detektionsgränsen (detection limit, DL) och kvantifieringsgränsen (quantification limit, QL), i enlighet med ICH-riktlinjerna 2QA och 2QB, har bestämts för QIAamp DSP Virus-proceduren (med en startprovvolym på 500 µl och elueringsvolymerna på 20 µl och 60 µl) med hjälp av diagnostiska nedströmsanalyser (Tabell 2 och Tabell 3).

Tabell 2.-Detektionsgräns för QIAamp DSP Virus-procedur

Analys	Elueringsvolym	95 % Cut-Off
<i>artus</i> [®] 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 manuellt HIV-RNA	60 µl	90,92 IU/ml (n=209)
TaqMan HBV-DNA	60 µl	4,73 IU/ml (n=192)

Tabell 3.-Kvantifieringsgräns för QIAamp DSP Virus-procedur

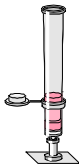
Analys	QL	CV
TaqMan HBV-DNA	5,7 IU/ml	< 70 % (n=88)
TaqMan HIV-RNA	52 IU/ml	< 60 % (n=88)
cobas AMPLICOR HIV-RNA	100 IU/ml	< 60 % (n=88)
cobas AMPLICOR HBV-DNA	30 IU/ml	< 60 % (n=88)
cobas AMPLICOR HCV RNA [®]	700 IU/ml	< 60 % (n=66)

QIAamp DSP Virus -procedur

Prov



Lysering



Bindning

Vakuu



Tvätt
(AW1)

Ta bort EXT
innan vakuu
appliceras

Vakuu



Tvätt
(AW2)

Vakuu



Tvätt
(etanol)

Vakuu



Torrsnurr
ning

Eluering

Renade virala
nukleinsyror

Läs protokollet (sidan 27) noga innan du börjar.

Tillsätt 75 µl QP, 500 µl prov och 500 µl AL i LT.

Vortexblanda i 15 sekunder.

Inkubera i 15 minuter (± 1 minut) vid 56 °C (± 1 °C).

Tillsätt 600 µl etanol

Vortexblanda i 15 sekunder.

Inkubera i 5 minuter (± 1 minut) i rumstemperatur (15–25 °C).

Överföra lysater till QIAamp MinElute-kolonn med bifogat EXT.

Tillsätt 600 µl rekonstituerad AW1.

Ta bort EXT.

Tillsätt 700 µl rekonstituerad AW2.

Tillsätt 750 µl etanol

Placera QIAamp MinElute-kolonn i WT.

Centrifugera i 1 minut vid 14 000 rpm.

Placera QIAamp MinElute-kolonn i WT.

Inkubera i 3 minuter vid 56 °C.

Placera QIAamp MinElute-kolonn i ET.

Tillsätt 20 µl eller 60 µl AVE.

Inkubera i 3 minuter i rumstemperatur.

Centrifugera i 1 minut vid 14 000 rpm.

Utrustning och reagenser som ska tillhandahållas av användaren

Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Se lämpliga säkerhetsdatablad från produktleverantören för materialsäkerhet.

- Etanol (96-100 %)
- Pipetter* och pipettspetsar (det rekommenderas att pipettspetsar med aerosolbarriärer används för att undvika korskontamination)
- Engångshandskar
- Värmeblock* för lysning av prov vid 56 °C (Eppendorf® Thermomixer med termoblock för mikroprovror på 2,0 ml rekommenderas†)
- Mikrocentrifug*
- Mätcylinder (50 ml)
- Vortexblandare
- QIAvac 24 Plus-vakuumsystem (QIAvac 24 Plus, kat.nr 19413, QIAvac Connecting System, kat.nr 19419 och Vacuum Pump, kat.nr 84020‡), eller motsvarande vanligt laborativakuumsystem


* För att säkerställa att proverna bearbetas ordentligt under QIAamp DSP Virus-proceduren, rekommenderar vi bestämt att instrumenten (t.ex. pipetter och värmeblock) kalibreras i enlighet med tillverkarnas rekommendationer.

† Detta är inte en fullständig lista över tillverkare och inkluderar inte många större försäljare av biologiska tillbehör.

‡ Katalognummer 84020 avser en pump som är lämplig för europeiska länder (t.ex. Tyskland). För länder med andra krav för spänning eller kontakter, kontakta QIAGENs tekniska support.

Viktiga anmärkningar

Viktigt att tänka på före start

- Kontrollera att satskomponenterna inte är skadade efter mottagande av satsen. Om blisterförpackningar eller buffertflaskor är skadade ska du kontakta QIAGENS tekniska support eller den lokala distributören. I händelse av vätskespill, se "Varningar och försiktighet" (sidan 8).
- Använd inte skadade satskomponenter eftersom det kan leda till dålig satsprestanda.
- Använd alltid RNase-fri utrustning.
- Förvara etanol (96–100 %) på is under proceduren.
- Byt alltid pipettspetsar mellan vätskeöverföringar. Användning av pipettspetsar med aerosolbarriärer rekommenderas för att undvika korskontamination.
- Alla centrifugeringssteg utförs i rumstemperatur (15-25 °C).
- Använd alltid engångshandskar och kontrollera regelbundet att de inte kontamineras av provmaterial.
- Kassera handskar om de blir kontaminerade, och utför alla steg markerade med handsymbolen. 
- Öppna endast ett rör åt gången för att undvika korskontamination.
- Använd inte satskomponenter från andra satser med den sats som för närvarande används såvida inte lotnumren är identiska.
- Undvik mikrobiell kontamination av satsreagenser.
- Arbete under laminära luftflödesförhållanden rekommenderas tills proverna har lyserats för att undvika kontamination från potentiellt smittsamma material.
- Denna sats bör endast användas av personal utbildad i in vitro-diagnostisk laboratoriepraxis.

- Proceduren ger anvisningar för bearbetning av ett enskilt plasma- eller serumprov. Upp till 24 prov kan emellertid bearbetas åt gången med vakuumsystemet QIAvac 24 Plus.

Beredning av RNA

Vid beredning av viralt RNA, arbeta snabbt under de manuella stegen av proceduren.

Elueringsbuffert (AVE) innehåller natriumazid*, ett antimikrobiellt ämne som förhindrar tillväxt av RNase-producerande organismer. Eftersom denna buffert dock inte innehåller några RNase-nedbrytande kemikalier, kommer den inte aktivt att inhibera RNaser som introducerats genom olämplig hantering. Var extremt försiktig för att undvika kontaminering med RNaser vid hantering av elueringsbuffert (AVE).

Förvaring av prover

Efter provtagning och centrifugering kan plasma eller serum förvaras vid 2–8 °C i upp till 6 timmar. För långvarig förvaring rekommenderas frysning vid -20 °C eller -80 °C i alikvoter. Frysta plasma- eller serumprover får inte tinas upp mer än en gång. Upprepad infrysning-upptining leder till denaturering och utfällning av proteiner, vilket kan resultera i minskade virala titrer och därmed minskat utbyte av virala nukleinsyror. Dessutom kan frystorkningsutfällningar som bildas under frysning-upptining sätta igen QIAamp MinElute-kolonmembranet. Om frystorkningsutfällningar är synliga bör de pelleras genom centrifugering vid cirka 6800 x g i 3 minuter. Den klarnade supernatanten ska aspireras och bearbetas omedelbart utan att rubba pelleten.

* Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier.

Beredning av reagenser och buffertar

Bereda QIAGEN-proteas

Tillsätt hela innehållet i flaskan med 4,4 ml proteaslösningsmedel (PS) till flaskan med frystorkad QIAGEN proteas (QP) och blanda noga. Blanda genom att vända flaskan flera gånger för att undvika skumbildning. Se till att QIAGEN Protease (QP) är fullständigt upplöst.



Tillsätt inte QIAGEN-proteas (QP) direkt i lyseringsbufferten (AL).

Tillsätta bärar-RNA och intern kontroll till lyseringsbuffert

Bärar-RNA har två funktioner. För det första förbättrar det bindningen av virala nukleinsyror till QIAamp MinElute-kolonmembranet, särskilt om det är mycket få målmolekyler i provet. För det andra minskar tillsatsen av stora mängder bärar-RNA risken för viral RNA-nedbrytning i den sällsynta händelsen att RNase-molekylerna undgår denaturering av de kaotropiska salterna och rengöringsmedlen i lyseringsbufferten (AL). Om bärar-RNA inte tillsätts till lyseringsbuffert (AL) kan detta leda till minskad återhämtning av viralt RNA eller DNA.

Bärar-RNA kan också ingå i vissa interna kontrollreagenser av kommersiella nedströmsanalyser. I dessa fall hänvisas till de relevanta användningsinstruktionerna från nedströmsanalysens tillverkare.

Användning av en intern kontroll rekommenderas starkt vid användning av QIAamp DSP Virus Kit i kombination med diagnostiska amplifieringssystem. RNA eller DNA för intern kontroll och rekonstituerad bärar-RNA bör tillsättas till lyseringsbufferten (AL) och blandas noggrant genom att vända röret 10 gånger. Använd inte vortex för att undvika skumbildning.

Se tillverkarens anvisningar för att bestämma den optimala koncentrationen av intern kontroll. Om man använder en annan koncentration än vad som rekommenderas kan det resultera i felaktiga resultat. Vid beräkning av den korrekta mängden intern kontroll som ska användas,

ta hänsyn till provets startvolym och elueringsvolymen. Kom ihåg att QIAamp DSP Virus Kit använder en startprovvolym på 500 µl.

För att bereda bärar-RNA-lösningen, tillsätt 310 µl elueringsbuffert (AVE) till röret som innehåller 310 µg frystorkat bärar-RNA för att erhålla en lösning med 1 µg/µl. Lös upp bärar-RNA noggrant, dela lösningen i lagom stora alikvoter och förvara vid -20 °C. Frys/tina inte alikvoter av bärar-RNA mer än 2 gånger.

Observera att det inte går att lösa upp bärar-RNA i lyseringsbuffert (AL). Det måste först lösas upp i elueringsbufferten (AVE), och därefter tillsättas till lyseringsbufferten (AL). Se till att bärar-RNA har upplösts helt i den korrekta volymen av elueringsbuffert (AVE) innan du blandar det med lyseringsbufferten (AL).



Använd alltid rätt intern kontroll för nedströmsanalysen. Se tillverkarens instruktioner för ytterligare information.

Beräkna den blandningsvolym lyseringsbuffert (AL)/bärar-RNA som behövs per provsats genom att välja antalet prover som ska bearbetas samtidigt i Tabell 4. Volymerna beräknas med hjälp av följande provberäkning:

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

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

där: n = antalet prover som ska bearbetas samtidigt

y = beräknad volym av lyseringsbuffert (AL)

z = den volym bärar-RNA/elueringsbuffert (AVE) som ska tillsättas till lyseringsbufferten (AL)

Tabell 4.-Volymen av lyseringsbuffert (AL) och bärar-RNA/elueringsbuffert (AVE) som krävs för QIAamp DSP Virus-procedur

Antal prover	Vol. AL (ml)	Vol. bärar-RNA/AVE (µl)	Antal prover	Vol. AL (ml)	Vol. bärar-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

Bereda tvättbuffert 1 (AW1)

Mät upp 25 ml etanol (96–100 %) med en mätcylinder och tillsätt det i flaskan som innehåller 19 ml koncentrat av tvättbuffert 1 (AW1). Förvara den rekonstituerade tvättbufferten 1 (AW1) i rumstemperatur (15–25 °C).



Blanda alltid den rekonstituerade tvättbufferten 1 (AW1) genom att vända flaskan flera gånger innan du startar proceduren.

Bereda tvättbuffert 2 (AW2)

Mät upp 30 ml etanol (96–100 %) med en mätcylinder och tillsätt det i flaskan som innehåller 13 ml koncentrat av tvättbuffert 2 (AW2). Förvara den rekonstituerade tvättbufferten 2 (AW2) i rumstemperatur (15–25 °C).



Blanda alltid den rekonstituerade tvättbufferten 2 (AW2) genom att vända flaskan flera gånger innan du startar proceduren.

Bereda elueringsbuffert (AVE)

Fyra rör med elueringsbuffert (AVE) ingår i kitet. Var försiktig så att du inte kontaminerar bufferten med RNaser. Om du utför 4 reningsprocedurer eller mindre med ett enstaka kit, rekommenderar vi att du kasserar röret med elueringsbuffert (AVE) vid varje procedurs slutförande.

Eluering av virala nukleinsyror

För nedströmstillämpningar som kräver små startvolymmer (t.ex. vissa PCR- och RT-PCR-analyser), kan användning av virala nukleinsyror eluerade i 20 µl elueringsbuffert (AVE) öka analysens känslighet.

Volymen av virala nukleinsyror som elueras från en QIAamp MinElute-kolonn kan vara upp till 5 µl mindre än volymen av elueringsbuffert (AVE) som tillsatts kolonnen. Exempelvis leder eluering av virala nukleinsyror med 60 µl elueringsbuffert (AVE) till ett eluat på uppskattningsvis 55 µl, medan eluering med 20 µl resulterar i ett eluat på 15 µl.

Utbytesvolymen av eluatet beror på provets natur. Om den erhållna eluatvolymen är för låg för nedströmsanalysen, öka volymen genom att tillsätta mer elueringsbuffert (AVE).

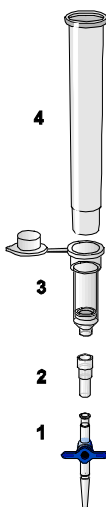
Eluerade virala nukleinsyror samlas in i elueringsrör (ET). Om du förvarar de virala nukleinsyrorerna i upp till 24 timmar, rekommenderar vi förvaring vid 2–8 °C.

De virala nukleinsyrorernas utbyte och kvalitet

Utbytet av och kvaliteten på de isolerade virala nukleinsyrorerna är lämpligt för alla typer av efterföljande detektionsmetoder i molekylär diagnostik. Diagnostiska analyser bör utföras i enlighet med tillverkarnas anvisningar.

Montera vakuumsystemet QIAvac 24 Plus

Se till att du monterar kolonnförlängaren (EXT), QIAamp MinElute-kolonnen, VacConnector (VC) och VacValve korrekt (se Figur 3).



Figur 3. Montering av komponenterna i QIAamp DSP Virus Kit för vakuumbearbetning av prov:

1: VacValve (tillhandahålls med vakuumsystemet)

3: QIAamp MinElute-kolonn

2: VacConnector (VC)

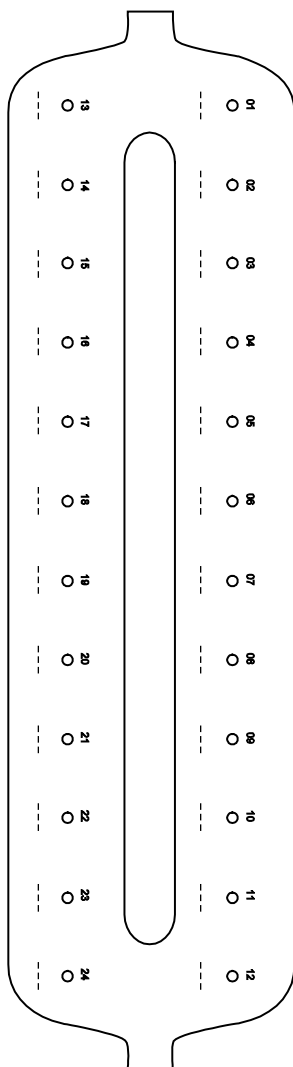
4: Kolonnförlängare (EXT)

Vi rekommenderar etikettering av lyseringsrören (LT), elueringsrören (ET) och QIAamp MinElute-kolonnerna för användning på QIAvac 24 Plus-vakuumsystemet, i enlighet med schemat i Figur 4, för att undvika att proverna blandas ihop. Detta schema kan fotokopieras och märkas med provnamn.

Datum: _____

Operatör: _____

Kör-ID: _____



Figur 4. Märkningschema för Lysis Tubes (LT), Elution Tubes (ET) och QIAamp MinElute-kolonner för användning med vakuumsystemet QIAvac 24 Plus.

Protokoll: Isolering och rening av virala nukleinsyror från plasma eller serum

För isolering och rening av virala nukleinsyror från 500 µl av EDTA- eller citratbehandlad plasma och serum.

Saker som bör göras före start

- Låt proven få rumstemperatur (15–25 °C) och se till att de är väl blandade.
- Tillsätt bärar-RNA rekonstituerat i elueringsbuffert (AVE) eller intern kontroll till lyseringsbuffert (AL) i enlighet med anvisningarna på sidan 19.
- Se till att tvättbuffert 1 (AW1), tvättbuffert 2 (AW2) och QIAGEN-proteas (QP) har förberetts i enlighet med anvisningarna i "Viktiga anmärkningar" på sidan 17.
- Låt elueringsbuffert (AVE) få rumstemperatur (15–25 °C) för användning i steg 18. Om det är möjligt, använd ny elueringsbuffert (AVE) för varje procedur (4 rör medföljer).
- Ställ in ett värmeblock på 56 °C för användning i steg 4 och 17.
- För in en VacConnector (VC) i varje lueradapter i vakuumsystemet för att undvika korskontamination.
- Se till att avfallsflaskan för vakuumsystemet är tom och att alla anslutningar är korrekta.
- Se den medföljande handboken för information om vakuumsystemets funktion, särskilt underhåll.

Utförande

1. Pipettera 75 µl QIAGEN-proteas (QP) i ett lyseringsrör (LT).



Kontrollera utgångsdatumet för det rekonstituerade proteaset innan användning.

2. Tillsätt 500 µl plasma eller serum till lyseringsröret (LT).

3. Tillsätt 500 µl lyseringsbuffert (AL) (innehållande 11,2 µg/ml bärar-RNA) till lyseringsröret (LT), stäng locket och blanda med puls-vortexblandning i 15 sekunder. Det är viktigt att prov och lyseringsbuffert (AL) blandas noggrant för att garantera effektiv lysering och ge en homogen lösning.



Lyseringsbuffert (AL) innehåller intern kontroll. Se till att korrekt volym av lyseringsbuffert (AL) tillsätts genom försiktig pipettering eller genom användning av en lämplig pipett som Eppendorfs flerstegspipett eller motsvarande eftersom lyseringsbuffert (AL) har hög viskositet.



Tillsätt inte QIAGEN-proteas (QP) direkt i lyseringsbufferten (AL).

4. Inkubera i 56 °C (±1 °C) i 15 minuter (±1 minut).
5. Centrifugera lyseringsröret (LT) i ≥5 sekunder med maximal hastighet för att avlägsna droppar från insidan av locket.



6. Byt handskar och öppna lyseringsröret (LT) försiktigt.

7. Tillsätt 600 µl etanol (96–100 %) till lyseringsröret (LT), stäng locket och blanda noggrant med puls-vortexblandning i ≥15 sekunder. Inkubera i 5 minuter (± 1 minut) i rumstemperatur (15–25 °C).

8. Centrifugera lyseringsröret (LT) i ≥5 sekunder med maximal hastighet för att avlägsna droppar från insidan av locket.

9. För in QIAamp MinElute-kolonnen i VacConnector (VC) på vakuumsystemet (se Figur 3, sidan 24). För in en kolonnförlängare (EXT) i den öppna QIAamp MinElute-kolonnen.



Behåll tvättröret (WT) för torrsnurrningen i steg 16.



10. Byt handskar och öppna endast ett rör åt gången.

11. Applicera hela lysatet från steg 7 försiktigt på kolonnförlängaren (EXT) av QIAamp MinElute-kolonnen utan att blöta ned kanten. Undvik att vidröra QIAamp MinElute-kolonnmembranet med pipettspetsen.

12. Sätt igång vakuumpumpen. Efter att lysatet har transporterats igenom QIAamp MinElute-kolonnen ska ventilen på vakuumsystemet öppnas för att bryta vakuuet.

Om flera QIAamp MinElute-kolonner bearbetas på samma gång rekommenderas att VacValve för varje kolonn stängs efter att lysatet har passerat för att minska tiden för detta vakuumsteg.



Om lysatet inte har passerat genom membranet helt efter 15 minuter, kassera QIAamp MinElute-kolonnen och upprepa proceduren med ett nytt prov.



Vakuumsystemets ventil bör användas för snabb utjämning av vakuumtrycket.

13. Applicera 600 µl tvättbuffert 1 (AW1) till QIAamp MinElute-kolonnen. Ta försiktigt bort och kassera kolonnförlängaren (EXT) och stäng ventilen på vakuumsystemet. Efter att tvättbuffert 1 (AW1) har transporterats igenom QIAamp MinElute-kolonnen ska ventilen på vakuumsystemet öppnas för att bryta vakuuet.



För att undvika korskontaminering, se till att de borttagna kolonnförlängarna (EXT) inte passerar över angränsande QIAamp MinElute-kolonner.

14. Applicera 750 µl tvättbuffert 2 (AW2) till QIAamp MinElute-kolonnen utan att blöta ned kanten. Undvik att vidröra QIAamp MinElute-kolonnmembranet med pipettspetsen. Låt kolonnens lock vara öppet och stäng ventilen på vakuumsystemet. Efter att tvättbuffert 2 (AW2) har transporterats igenom QIAamp MinElute-kolonnen ska ventilen på vakuumsystemet öppnas för att bryta vakuuet.

15. Applicera 750 µl etanol (96–100 %) till QIAamp MinElute-kolonnen utan att blöta ned kanten. Undvik att vidröra QIAamp MinElute-kolonnmembranet med pipettspetsen. Låt kolonnens lock vara öppet och stäng ventilen på vakuumsystemet. Efter att etanolen har transporterats igenom QIAamp MinElute-kolonnen, ska ventilen på vakuumsystemet öppnas för att bryta vakuuet.



Använd pipettspetsar med aerosolbarriär för att applicera etanol till QIAamp MinElute-kolonnen.

16. Stäng locket på QIAamp MinElute-kolonnen, ta bort den från vakuumsystemet och kassera VacConnector (VC). Placera QIAamp MinElute-kolonnen i ett tvättröret (WT) som sparats från steg 9 och centrifugera med maximal hastighet (cirka 20 000 x g eller 14 000 varv/min.) i 1 minut för att fullständigt torka membranet. Kassera tvättröret (WT) som innehåller filtratet.



Uteslutning av torrcentrifugeringen kan leda till inhibering av efterföljande analys.

17. Placera QIAamp MinElute-kolonnen i ett nytt tvättrör (WT), och inkubera med locket öppet i 56 °C i 3 minuter för att få eventuell kvarvarande vätska att avdunsta.

18. Placera QIAamp MinElute-kolonnen i ett rent elueringsrör (ET) och kassera tvättröret (WT). Öppna försiktigt locket på QIAamp MinElute-kolonnen och tillsätt 20 µl eller 60 µl elueringsbuffert (AVE) (beroende på nedströmsanalysen) mitt på membranet. Stäng locket och inkubera i rumstemperatur (15–25 °C) i ≥3 minuter. Centrifugera vid maximal hastighet (cirka 20 000 x g eller 14 000 varv/min.) i 1 minut för att eluera de virala nukleinsyrorna.



Följ underhållsproceduren för vakuumsystemet när protokollet har utförts (se handboken som medföljer vakuumsystemet för mer information).

Uppdaterad licensinformation och produktspecifika friskrivningsklausuler finns i respektive QIAGEN-kithandbok eller -bruksanvisning. Handböcker och bruksanvisningar till QIAGEN Kit finns på www.qiagen.com eller kan beställas från QIAGENS tekniska support eller din lokala återförsäljare.

Revisionshistorik

Dokumentrevisioner

R3	Lade till förtydligande fotnot om vakuumpump-kat.nr, se sidan 16.
08/2018	Uppdaterade varningar och försiktighetsåtgärder. Uppdaterade handbokens format.

Den här sidan har avsiktligt lämnats tom

Den här sidan har avsiktligt lämnats tom

Den här sidan har avsiktligt lämnats tom

Begränsat licensavtal för QIAamp DSP Virus Kit

Användning av den här produkten innebär att köpare eller användare av produkten godkänner följande villkor:

1. Produkten får endast användas i enlighet med de protokoll som medföljer produkten och den här handboken och får endast användas med komponenterna som ingår i kitet. QIAGEN ger ingen licens för någon av sina immateriella tillgångar för att använda eller inkludera komponenterna i detta kit med komponenter som inte ingår i detta kit förutom vad som beskrivs i de protokoll som medföljer produkten, den här handboken och ytterligare protokoll som finns på www.qiagen.com. Vissa av de här ytterligare protokollen har tillhandahållits av QIAGEN-användare för andra QIAGEN-användare. De här protokollen har inte testats noggrant eller optimerats av QIAGEN. QIAGEN garanterar inte att de inte kränker tredje parts rättigheter.
2. Förutom de uttryckligen angivna licenserna kan QIAGEN inte garantera att detta kit och/eller dess användning inte kränker oberoende tredje parts rättigheter.
3. Kitet och dess komponenter är licensierade för engångsbruk och får inte återanvändas, förbättras eller säljas vidare.
4. QIAGEN avsäger sig specifikt ansvar för alla andra licenser, uttryckliga eller underförstådda, förutom de uttryckligen angivna.
5. Inköparen och användaren av detta kit samtycker till att inte vidta eller tillåta att någon annan vidtar några steg som kan leda till eller underlätta några åtgärder som är förbjudna enligt ovan. QIAGEN kan kräva upphävande av detta begränsade licensavtal i domstol och ska ersättas för alla undersöknings- och rättegångskostnader, inklusive advokatkostnader, vid eventuell åtgärd för att upprätthålla detta begränsade licensavtal eller någon av företagets immateriella rättigheter avseende kitet och/eller någon av dess komponenter.

För uppdaterade licensvillkor, se www.qiagen.com.

Varumärken: QIAGEN®, QIAamp®, *artus*®, MinElute® (QIAGEN-gruppen); AMPLICOR HBV MONITOR®, AMPLICOR HCV MONITOR®, AMPLICOR HIV-1 MONITOR®, cobas®, TaqMan® (Roche-gruppen); RealArt™ (*artus GmbH*); Eppendorf® (Eppendorf AG). Registrerade namn, varumärken osv. som används i det här dokumentet ska inte anses som oskyddade enligt lag även om de inte uttryckligen anges som skyddade.

1114514 08/2018 HB-0109-003 © 2018 QIAGEN, med ensamrätt.

Beställning www.qiagen.com/shop | Teknisk support support.qiagen.com | Webbplats www.qiagen.com