

december 2017

Protokolový list QIAasymphony[®] SP

Protokol Complex800_OBL_V4_DSP

Tento dokument je protokolovým listom Complex800_OBL_V4_DSP QIAasymphony SP, R2, pre súpravu QIAasymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit, verzia 1.

Všeobecné informácie

Súprava QIASymphony DSP Virus/Pathogen Kit je určená na diagnostické použitie in vitro.

Súprava	QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit
Materiál vzorky	Respiračné a urogenitálne vzorky
Názov protokolu	Complex800_OBL_V4_DSP
Východisková kontrolná súprava analýzy	ACS_Complex800_OBL_V4_DSP
Upraviteľné	Elučný objem: 60 µl, 85 µl, 110 µl
Potrebná softvérová verzia	Verzia 4.0 alebo vyššia

Zásuvka „Sample“ (Vzorka)

Typ vzorky	Respiračné vzorky (BAL, vysušené tampóny s výttermi, prepravné médiá, aspiráty, spútum) a urogenitálne vzorky (moč, prepravné médiá)
Objem vzorky	V závislosti od typu použitej skúmavky na vzorky; viac informácií nájdete na stránke www.qiagen.com/goto/dsphandbooks
Primárne skúmavky na vzorky	Viac informácií nájdete na stránke www.qiagen.com/goto/dsphandbooks
Sekundárne skúmavky na vzorky	Viac informácií nájdete na stránke www.qiagen.com/goto/dsphandbooks
Vložky	V závislosti od typu použitej skúmavky na vzorky; viac informácií nájdete na stránke www.qiagen.com/goto/dsphandbooks
Iné	Potrebná je zmes nosič RNA-pufer AVE; použitie interného kontrolného roztoku je voliteľné

Zásuvka „Reagents and Consumables“ (Reagencie a spotrebný materiál)

Umiestnenie A1 a/alebo A2	Reagenčná kazeta (Reagent cartridge, RC)
Umiestnenie B1	N/A
Držiak stojanu hrotov 1 – 17	Jednorazové filtračné hroty, 200 µl
Držiak stojanu hrotov 1 – 17	Jednorazové filtračné hroty, 1500 µl
Držiak škatuliek jednotky 1 – 4	Škatuľky jednotky obsahujúce kazety na prípravu vzoriek
Držiak škatuliek jednotky 1 – 4	Škatuľky jednotky obsahujúce 8-tyčkové kryty

N/A = Neaplikovateľné.

Zásuvka „Waste“ (Odpad)

Držiak škatuliek jednotky 1 – 4	Prázdne škatuľky jednotky
Držiak odpadového vrečka	Odpadové vrečko
Držiak nádoby na tekutý odpad	Nádoba na tekutý odpad

Zásuvka „Eluate“ (Eluát)

Stojan pre elúciu (odporúčame použitie slotu 1, chladené umiestnenie)	Viac informácií nájdete na stránke www.qiagen.com/goto/dsphandbooks
---	---

Požadované plastové pomôcky

	Jedna dávka, 24 vzoriek*	Dve dávky, 48 vzoriek*	Tri dávky, 72 vzoriek*	Štyri dávky, 96 vzoriek*
Jednorazové filtračné hroty, 200 µl ^{†‡}	96	96	128	128
Jednorazové filtračné hroty, 1500 µl ^{†‡}	128	192	224	288
Kazety na prípravu vzoriek [§]	18	36	54	72
8-tyčkový kryt [¶]	3	6	9	12

* Vykonanie viac než jedného snímania zásob si vyžaduje doplnkové jednorazové filtračné hroty. Použitie menej než 24 vzoriek na dávku znižuje počet jednorazových hrotov potrebných na sériu analýz.

[†] V stojane na hroty je 32 filtračných hrotov.

[‡] Počet potrebných filtračných hrotov zahŕňa filtračné hroty pre 1 snímanie zásob na reagenčnú kazetu.

[§] V škatuľke jednotky je 28 kaziet na prípravu vzoriek.

[¶] V škatuľke jednotky je dvanásť 8-tyčkových krytov.

Poznámka: Počet daných filtračných hrotov sa môže líšiť od počtov zobrazených na dotykovej obrazovke v závislosti od nastavení, napríklad od počtu interných kontrolných roztokov použitých v rámci dávky.

Zvolený elučný objem

Zvolený elučný objem (µl)*	Počiatočný elučný objem (µl) [†]
60	90
85	115
110	140

* Elučný objem zvolený na dotykovej obrazovke. Ide o minimálny dostupný objem eluátu v poslednej elučnej skúmvavke.

[†] Počiatočný objem elučného roztoku potrebný na zabezpečenie, aby bol skutočný objem eluátu rovnaký ako zvolený objem.

Príprava zmesi interný kontrolný roztok–nosič RNA (CARRIER)–pufer AVE (AVE)

Zvolený elučný objem (μl)	Objem nosiča RNA (CARRIER) (μl)	Objem interného kontrolného roztoku (μl)*	Objem pufru AVE (AVE) (μl)	Konečný objem na vzorku (μl)
60	3	9	108	120
85	3	11,5	105,5	120
110	3	14	103	120

* Výpočet množstva interného kontrolného roztoku vychádza z počiatočných elučných objemov. Doplnkový prázdny objem závisí od typu použitej skúmavky na vzorky; viac informácií nájdete na stránke www.qiagen.com/goto/dsphandbooks.

Poznámka: Hodnoty zobrazené v tabuľke sa vzťahujú k príprave zmesi interný kontrolný roztok–nosič RNA (CARRIER) pre analýzu proti smeru reťazca, ktorá si vyžaduje 0,1 μl interného kontrolného roztoku/μl eluátu.

Externá lýza

Počas práce s chemikáliami noste vždy vhodný laboratórny plášť, jednorazové rukavice a ochranné okuliare. Viac informácií nájdete na príslušných kartách bezpečnostných údajov materiálu (material safety data sheets, MSDS), ktoré sú k dispozícii u dodávateľa produktov.

Protokoly Complex QIASymphony pozostávajú zo 4 krokov: lýza, viazanie, premytie, elúcia. U niektorých vzoriek je užitočné vykonať lýzu manuálne, napríklad na inaktiváciu patogénov v biologicky bezpečnej pracovni. Protokol Complex800_OBL_V4_DSP umožňuje vykonanie manuálnej lýzy podobným spôsobom ako v prípade protokolu Complex800_V6_DSP. Vzorky s predbežnou úpravou sú prenesené do QIASymphony SP a spracované protokolom Complex800_OBL_V4_DSP.

Poznámka: Protokol Complex800_OBL_V4_DSP vyžaduje pufer ACL a pufer ATL (ATL). Pufer ACL (kat. č. 939017) a pufer ATL (ATL) (kat. č. 939016) nie sú súčasťou súpravy QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit a musia sa objednať samostatne.

Manuálna lýza

1. Napipetujte 80 μl proteínázy K, 295 μl pufru ATL (ATL), 120 μl zmesi interného kontrolného roztoku a nosiča RNA a 560 μl pufru ACL do 4,5 ml skúmavky (Nunc CryoTube 12,5 x 92 mm, 4,5 ml polypropylénová skúmavka, Nunc kat. č. 363452).

Poznámka: Keď sa manuálnou lýzou bude spracovávať viac než jedna vzorka, môže sa pripraviť zásobný roztok tohto roztoku. Jednoducho vynásobte objemy potrebné pre jednu vzorku celkovým počtom vzoriek, ktoré sa majú spracovať, a pridajte doplnkový objem rovný 2 vzorkám navyše. Skúmavku niekoľkokrát obráťte, aby sa jej obsah premiešal, preneste 1 055 μl do 4,5 ml skúmavky pre každú vzorku, potom pokračujte u každej vzorky krokom 4.

2. Zatvorte viečko a obrátením skúmavky 5-krát zamiešajte obsah.
3. Skúmavku krátko odstredte, aby sa odstránili kvapky zvnútra viečka.
4. Do skúmavky pridajte 800 µl vzorky, zatvorte viečko a miešajte pulzným vortexom 10 sekúnd.
5. Skúmavku inkubujte pri teplote 68 °C po dobu 15 minút (± 1 minúta).
6. Skúmavku krátko odstredte, aby sa odstránili kvapky zvnútra viečka. Zasuňte vložky pre príslušné skúmavky so vzorkami do nosiča skúmaviek a vložke skúmavky so vzorkami (bez viečok).

Príprava materiálu na vzorky

Moč

Moč sa môže spracovávať bez predbežnej úpravy. Systém je optimalizovaný pre čisté vzorky moču, ktoré neobsahujú konzervačné látky. Na zvýšenie citlivosti na patogénne baktérie možno vzorky odstrediť. Po likvidácii supernatantu sa dá granula opäť suspendovať v min. 800 µl pufru ATL (ATL) (kat. č. 939016). Ako vzorku na prípravu externej lýzy použite 800 µl vopred upraveného materiálu.

Izolácia genomickej DNA z gram-pozitívnej baktérie

Purifikácia DNA sa dá pre niektoré gram-pozitívne baktérie zlepšiť enzymatickou predbežnou úpravou pred prenosom vzorky do QIASymphony SP a spustením protokolu Complex800_OBL_V4_DSP.

1. Odstreďujte baktériu pri 5 000 x g po dobu 10 minút.
2. Bakteriálnu granulu suspendujte v 800 µl vhodného enzymatického roztoku (lyzozým 20 mg/ml alebo lyzostafín 200 µg/ml; 20 mM Tris·HCl, pH 8.0; 2 mM EDTA; 1,2 % Triton X--100).
3. Inkubujte pri teplote 37 °C po dobu aspoň 30 minút (± 2 minúty).
4. Krátko skúmavku odstredte, aby sa odstránili kvapky zvnútra viečka.
5. Ako vzorku na prípravu externej lýzy použite 800 µl vopred upraveného materiálu.

Viskózne alebo mukózne vzorky

Niektoré vzorky (napr. spútum, respiračné aspiráty) môžu byť viskózne a za účelom možnosti pipetovania si vyžadujú skvapalnenie. Vzorky s nízkou viskozitou si nevyžadujú ďalšiu prípravu. Vzorky so strednou až vysokou viskozitou sa majú pripravovať nasledovne:

1. Vzorku zriedte v pomere 1 : 1 s látkou Sputasol*† (Oxoid, kat. č. SR0233) alebo 0,3 % (obj. hm.) DTT.

Poznámka: Roztok 0,3 % DTT sa dá vytvoriť vopred a uskladniť v príslušných alikvótach pri teplote –20 °C. Po použití treba rozmrazenú alikvótu zlikvidovať.

2. Inkubujte pri teplote 37 °C, kým nie je viskozita vzorky vhodná na pipetovanie.
3. Ako vzorku na prípravu externej lýzy použite 800 µl vopred upraveného materiálu.

Vysušené tampóny s telesnou tekutinou a sekrétom

1. Ponorte konček vysušeného tampónu do 1050 µl pufru ATL (ATL) (kat. č. 939016) a inkubujte za stáleho miešania pri teplote 56 °C po dobu 15 minút (± 1 minúta). Ak miešanie nie je možné, pred a po inkubácii vírivo premiešavajte podobu aspoň 10 sekúnd.
2. Tampón vyberte a odstráňte všetku kvapalinu pritlačením tampónu o vnútornú stenu skúmavky.
3. Ako vzorku na prípravu externej lýzy použite 800 µl vopred upraveného materiálu.

Poznámka: Tento protokol je optimalizovaný pre bavlnené a polyetylénové tampóny. Pri použití iných tampónov môže byť potrebné upraviť objem pufru ATL (ATL), aby bol zabezpečený objem materiálu na vzorky aspoň 800 µl.

Respiračné alebo urogenitálne tampóny

Skladovacie médiá pre respiračné alebo urogenitálne tampóny sa dajú použiť bez predbežnej úpravy. Ak ste tampón nevybrali, odstráňte kvapalinu pritlačením tampónu o stenu skúmavky. Teraz by sa mal odstrániť všetok nadbytočný hlien vo vzorke jeho zachytením na tampón. Všetku zvyškovú kvapalinu z hlienu a tampónu treba následne odstrániť pritlačením tampónu o stenu skúmavky. Nakoniec treba tampón s hlienom odstrániť a zlikvidovať. Ak sú vzorky viskózne, vykonajte krok skvapalnenia (pozri časť „Viskózne alebo mukózne vzorky“ vyššie) pred prenosom vzorky do QIASymphony SP. Ak k dispozícii nie je dostatok počiatočného materiálu, napipetujte pufer ATL (ATL) do prepravného média, aby ste prispôsobili minimálny počiatočný objem, a vírivo premiešavajte vzorku v skúmavke po dobu 15 – 30 sekúnd (ak prepravné médium obsahuje tampón, tento krok vykonajte pred odstránením tampónu). Ako vzorku na prípravu externej lýzy použite 800 µl vopred upraveného materiálu.

* Sputasol (Oxoid, kat. č. SR0233, www.oxoid.com) alebo ditiotreitol (DTT).

† Nejde o úplný zoznam dodávateľov.

Prehľad revízií

Prehľad revízií dokumentu	
R2 12/2017	Aktualizácia softvéru QIASymphony verzie 5.0

Aktuálne licenčné informácie a právne informácie špecifické pre produkt nájdete v sprievodcovi alebo používateľskej príručke k súprave QIAGEN®. Sprievodcov a používateľské príručky k súpravám QIAGEN nájdete na lokalite www.qiagen.com alebo o ne môžete požiadať oddelenie technických služieb spoločnosti QIAGEN alebo svojho miestneho distribútora.

Ochranné známky: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony® (QIAGEN Group). Registrované názvy, ochranné známky atď. použité v tomto dokumente sa nesmú považovať za známky nechránené podľa zákona, i keď neboli ako také označené príslušným symbolom. 12/2017 HB-0301-S31-002 © 2017 QIAGEN, všetky práva vyhradené.

Objednávky www.qiagen.com/shop | Technická podpora support.qiagen.com | Webová lokalita www.qiagen.com