Září 2019

QIAamp® DSP Circulating NA Kit Návod k použití (příručka)

Verze 1

50

IVD

CE

REF 61504

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden

R4 MAT 1118364CS

Sample to Insight

QIAGEN

Obsah

Účel použití 4
Shrnutí a vysvětlení 4
Principy postupu 5
Objemy alikvotů 5
Lýza alikvotů 7
Adsorpce na membránu kolonky QIAamp Mini 7
Odstranění reziduálních kontaminantů 7
Eluování čistých nukleových kyselin 8
Výtěžek a velikost nukleových kyselin 8
Popis protokolů 9
Dodávané materiály 10
Obsah sady 10
Další potřebné materiály, které nejsou součástí sady 11
Varování a bezpečnostní opatření 13
Skladování reagencií a manipulace s nimi 16
Uchovávání a nakládání se vzorkem 17
Postup 18
Příprava pufrů a reagencií 25
Protokol Breeze: Purifikace cirkulujících nukleových kyselin z 1–5 ml lidské krevní plazmy 28
Klasický protokol: Purifikace cirkulujících nukleových kyselin z 1–5 ml lidské krevní plazmy 33

Kontrola kvality 38
Omezení 38
Symboly 39
Literatura 41
Kontaktní údaje 41
Řešení potíží 42
Příloha A: Doporučení pro separaci a skladování krevní plazmy 44
Příloha B: Obecné pokyny pro manipulaci s RNA 46
Informace pro objednání 47
Historie revizí příručky 48

Účel použití

Sada QIAamp DSP Circulating NA Kit představuje systém, jenž využívá technologii silikátové membrány (technologie QIAamp) pro izolaci a čištění DNA a RNA bez cirkulujících buněk z alikvotů lidské krevní plazmy.

Tento produkt je určen pro použití profesionálními uživateli, např. techniky a lékaři vyškolenými v technikách molekulární biologie.

Sada QIAamp DSP Circulating NA Kit je určena pro diagnostické účely in vitro.

Shrnutí a vysvětlení

Volně cirkulující nukleové kyseliny jsou přítomny v lidské plazmě obvykle jako krátké fragmenty, < 1 000 bp (DNA), < 1 000 nt (RNA) nebo malé 20 nt (miRNA). Koncentrace volně cirkulujících nukleových kyselin v lidské krevní plazmě je obvykle nízká a mezi jednotlivci se značně liší v rozmezí 1–100 ng/ml v lidských alikvotech (1–5).

Sada QIAamp DSP Circulating NA Kit umožňuje účinnou purifikaci cirkulujících nukleových kyselin z lidské plazmy. Alikvoty mohou být čerstvé nebo zmrazené. Zkumavky Extension Tubes a vakuové zpracování na QIAvac 24 Plus umožňují, aby počáteční objemy alikvotů byly až do 5 ml, a flexibilní eluční objemy mezi 20–150 µl umožňují zkoncentrování druhů nukleových kyselin, které jsou přítomny v nízkých koncentracích.

Oddělená, volně cirkulující genomová DNA nebo RNA je připravena k použití v navazujících aplikacích, případně je vhodná pro skladování. Sada QIAamp DSP Circulating NA Kit poskytuje efektivní odstraňování bílkovin, nukleáz a dalších nečistot.

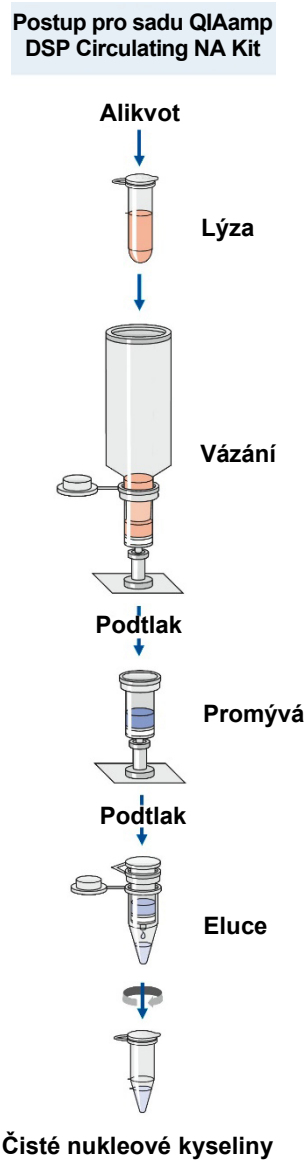
Principy postupu

Postup QIAamp DSP Circulating NA zahrnuje 4 kroky (lýzu, vázání, promývání a eluci) a provádí se pomocí kolon QIAamp Mini v systému QIAvac. Robustní postup pomáhá minimalizovat křížovou kontaminaci mezi alikvoty a zvyšuje bezpečnost uživatele při manipulaci s potenciálně infekčními alikvoty.

Jednoduchý postup je vhodný pro současné zpracování až 24 alikvotů za méně než 2 hodiny.

Objemy alikvotů

Kolonky QIAamp Mini vážou fragmentované nukleové kyseliny krátké délky 20 nt, ale výtěžek závisí na objemu alikvotu a koncentraci cirkulujících nukleových kyselin v alikvotu (obvykle 1–100 ng/ml v plazmě). Postup QIAamp DSP Circulating NA byl optimalizován pro objemy alikvot do 5 ml.



Obrázek 1. Přehled postupu pro sadu QIAamp DSP Circulating NA Kit

Lýza alikvotů

Volně cirkulující nukleové kyseliny v biologických tekutinách jsou obvykle vázány na bílkoviny nebo obaleny ve vezikulách, což vyžaduje účinný krok lýzy, aby se uvolnily nukleové kyseliny pro selektivní vázání na kolonu QIAamp Mini. Proto jsou alikvoty lyzovány za vysoce denaturačních podmínek při zvýšených teplotách v přítomnosti proteinázy K a Bufferu ACL, což zajišťuje inaktivaci DNáz a RNáz a uvolňování nukleových kyselin z vázaných bílkovin, lipidů a vezikul.

Adsorpce na membránu kolonky QIAamp Mini

Aby bylo možné optimální vázání cirkulujících nukleových kyselin na membránu, upraví se podmínky vázání přidáním Bufferu ACB k lyzátu. Lyzáty se poté nanesou na kolonky QIAamp Mini a cirkulující nukleové kyseliny se adsorbují z velkého objemu na membránu na bázi oxidu křemičitého při průchodu lyzátu indukovaném podtlakem. Koncentrace soli a hodnoty pH zajistí, že většina proteinů a další kontaminanty, které mohou inhibovat PCR a ostatní enzymatické reakce v dalších stupních, nebudou vázány na membránu kolonky QIAamp Mini.

Pro protokol je vyžadované vakuové potrubí (např. systém QIAvac 24 Plus s připojovacím systémem QIAvac Connecting System) a vakuová pumpa schopná generovat vakuum cca 800–900 mbar (např. vakuová pumpa QIAGEN® Vacuum Pump). Pro snadné sledování podtlaku a pohodlné uvolnění vakua by měl být použit vakuový regulátor Vacuum Regulator (součást připojovacího systému QIAvac Connecting System).

Odstranění reziduálních kontaminantů

Zatímco nukleové kyseliny zůstávají vázány na membránu, kontaminanty se účinně vymyjí během 3 promývacích kroků.

Eluování čistých nukleových kyselin

Eluce se provádí pomoci Bufferu AVE. V jediném kroku se vysoce čisté cirkulující nukleové kyseliny eluují v Bufferu AVE, který je vytemperován na pokojovou teplotu. Lze použít flexibilní eluční objem 50–150 µl. Pokud jsou vyžadovány vyšší koncentrace nukleových kyselin, může být eluční objem snížen na pouhých 20 µl. Eluční objemy menší než 50 µl vedou k vyšší koncentraci eluátů nukleových kyselin, ale mohou vést k nižšímu celkovému výtěžku.

Objem regenerovaného eluátu může být až o 5 µl menší, než je objem elučního pufru použitého v kolonce.

Výtěžek a velikost nukleových kyselin

Výtěžky volně cirkulujících nukleových kyselin izolovaných z biologických alikvotů jsou obvykle nižší než 1 µg, a proto je obtížné je stanovit spektrofotometrem. Absolutní výtěžek cirkulující DNA a RNA získaný z alikvotu pomocí sady QIAamp DSP Circulating NA Kit se mezi alikvoty od různých jedinců liší a také závisí na dalších faktorech (např. na určitých stádiích onemocnění). Kromě toho je pravděpodobné, že nosičová RNA přítomná v extrahovaných nukleových kyselinách bude dominovat hodnotám UV absorbance (viz strana 26). Ke stanovení výtěžků se doporučují metody kvantitativní amplifikace.

Distribuce velikosti cirkulujících nukleových kyselin purifikovaných pomocí sady QIAamp DSP Circulating NA Kit může být kontrolována elektroforézou na agarózovém gelu nebo hybridizací na cílově specifickou značenou sondu [5] či mikrofluidický elektroforézní roztok (např. Agilent Bioanalyzer).

Popis protokolů

V této příručce jsou uvedeny dva různé protokoly.

„Protokol Breeze: Purifikace cirkulujících nukleových kyselin z 1–5 ml lidské krevní plazmy“(strana 28) je určen pro zpracování až 5 ml plazmy v krocích po 1 ml a byl optimalizován pro krátkou dobu manipulace a zpracování.

„Klasický protokol: Purifikace cirkulujících nukleových kyselin z 1–5 ml lidské krevní plazmy“(strana 33) je pro zpracování až 5 ml plazmy v krocích po 1 ml a představuje nezměněný protokol z příručky k sadě QIAamp DSP Circulating NA Kit, revize 3 (R3).

Dodávané materiály

Obsah sady

QIAamp DSP Circulating NA Kit			**(50)**
Katalogové č.			**61504**
Počet prep.			**50**
QIAamp Mini	QIAamp Mini columns with Wash Tubes (Kolonky QIAamp Mini s promývacími zkumavkami) (WT) (2 ml)	COL	50
EXT	Column Extenders (Nástavce na kolonky) (20 ml)	COL EXT	2x 25
WT	Wash Tubes (Promývací zkumavky) (2 ml)	WASH TUBE	50
ET	Elution Tubes (Eluční zkumavky) (1,5 ml)	ELU TUBE	50
VC	VacConnectors (Vakuové konektory)	VAC CON	50
ACL*	Lysis Buffer* (Lyzační pufr)	LYS BUF	220 ml
ACB*	Binding Buffer (Vazebný pufr) (koncentrát)	BIND BUF CONC	300 ml
ACW1*	Wash Buffer 1* (Promývací pufr 1) (koncentrát)	WASH BUF 1 CONC	19 ml
ACW2†	Wash Buffer 2† (Promývací pufr 2) (koncentrát)	WASH BUF 2 CONC	13 ml
AVE†	Elution Buffer† (Eluční pufr) (fialové krytky)	ELU BUF	5x 2 ml
PROTK	QIAGEN Proteinase K (Proteináza K QIAGEN)	PROTK	4x 7 ml
Carrier	Carrier RNA (Nosičová RNA) (červené krytky)	CAR RNA	310 µg
	Příručka	HB	1

* Obsahuje chaotropní sůl. Varování a bezpečnostní opatření jsou uvedeny na straně 13.
† Obsahuje azid sodný jako konzervační látku.

Další potřebné materiály, které nejsou součástí sady

Při manipulaci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní pracovní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Další informace si vyhledejte v příslušných bezpečnostních listech (safety data sheets, SDS), které obdržíte od dodavatele výrobku.

Zajistěte, aby byly přístroje zkontrolovány a nakalibrovány podle doporučení výrobce.

Pro všechny protokoly

- Pipety (nastavitelné)
- Sterilní pipetovací špičky (jsou doporučeny pipetovací špičky s aerosolovou bariérou, aby se zabránilo křížové kontaminaci)
- Vodní lázeň nebo topný blok schopné uchovávat 50ml centrifugační zkumavky při teplotě 56 nebo 60 °C*
- Topný blok nebo podobné zařízení při teplotě 56 °C schopné uchovávat 2ml promývací zkumavky (pouze u klasického protokolu)*
- Mikrocentrifuga (s rotorem pro 2ml zkumavky)*
- 50ml centrifugační zkumavky
- Vakuové potrubí QIAvac 24 Plus vacuum manifold (kat. č. 19413)
- Připojovací systém QIAvac Connecting System (kat. č. 19419) nebo jeho ekvivalent
- Vacuum Pump (kat. č. 84010 [USA a Kanada], 84000 [Japonsko] nebo 84020 [zbytek světa]) nebo ekvivalentní pumpa schopná generovat vakuum od –800 do –900 mbar
- Etanol (96–100%)†
- Isopropanol (100%)
- Rozdrcený led (pouze pro „Klasický protokol: Purifikace cirkulujících nukleových kyselin z 1–5 ml lidské krevní plazmy“)

* Zajistěte, aby byly přístroje zkontrolovány a kalibrovány podle doporučení výrobce.

† Nepoužívejte denaturovaný alkohol, který obsahuje další látky, jako například metanol nebo metyletylketon.

- Některé alikvoty mohou vyžadovat ředění fosfátem pufrovaným fyziologickým roztokem (phosphate-buffered saline, PBS).
- Volitelné: VacValves (kat. č. 19408)

Varování a bezpečnostní opatření

Pro diagnostické použití in vitro

Při manipulaci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní pracovní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Bližší informace jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech (safety data sheets, SDS). Bezpečnostní listy jsou k dispozici také online v PDF formátu na stránkách www.qiagen.com/safety, kde si můžete najít, přečíst a vytisknout bezpečností listy všech souprav QIAGEN a jejich součástí.

VAROVÁNÍ Nebezpečí zranění

NEPŘIDÁVEJTE roztoky bělících prostředků nebo kyselin přímo do odpadních materiálů z přípravy alikvotů.

Buffer ACL, Buffer ACB a Buffer ACW1 obsahuje guanidinové soli, které mohou při smíšení s bělicím činidlem vytvářet vysoce reaktivní sloučeniny.

V případě rozlití tekutin obsahujících tyto pufry 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.

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

Buffer ACB

Obsahuje guanidin isothiokyanát. Nebezpečí! Zdraví škodlivý při požití. Může být škodlivý při kontaktu s kůží nebo při vdechnutí. Způsobuje vážné popáleniny kůže a poškození očí. Škodlivý pro život ve vodním prostředí s dlouhodobými nepříznivými účinky. Při kontaktu s kyselinami uvolňuje velmi toxický plyn. Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranné brýle / obličejový štít. 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. Ihned kontaktujte TOXIKOLOGICKÉ CENTRUM nebo lékaře.

Buffer ACL

Obsahuje guanidin isothiokyanát. Nebezpečí! Zdraví škodlivý při požití. Může být škodlivý při kontaktu s kůží nebo při vdechnutí. Způsobuje vážné popáleniny kůže a poškození očí. Škodlivý pro život ve vodním prostředí s dlouhodobými nepříznivými účinky. Při kontaktu s kyselinami uvolňuje velmi toxický plyn. Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranné brýle / obličejový štít. 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. Ihned kontaktujte TOXIKOLOGICKÉ CENTRUM nebo lékaře.

Buffer ACW1

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

Proteináza K

Obsahuje: proteinázu K. Nebezpečí! Způsobuje mírné podráždění kůže. Při vdechnutí může vyvolat příznaky alergie nebo astmatu, případně dechové obtíže. Vyvarujte se vdechování prachu/dýmu/plynu/mlhy/výparů/aerosolů. Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranné brýle / obličejový štít. Používejte ochranný respirátor. Pokud dojde k zasažení nebo důvodné obavě, že došlo k zasažení: Kontaktujte TOXIKOLOGICKÉ CENTRUM nebo lékaře. Přeneste osobu na čerstvý vzduch a ponechte ji v poloze usnadňující dýchání.

Skladování reagencií a manipulace s nimi

Kolonky QIAamp Mini by měly být skladovány v suchu při teplotě 2–8 °C. Všechny pufry by měly být skladovány při pokojové teplotě (15–25 °C). Kolonky QIAamp Mini a pufry lze za těchto podmínek skladovat až do data exspirace uvedeného na krabici sady, aniž by vykazovaly jakékoli snížení výkonu.

Lyofilizovaná nosičová RNA by měla být uložena při pokojové teplotě (15–25 °C) až do data exspirace uvedeného na štítku komponenty. Nosičová RNA by měla být rozpuštěna v Bufferu AVE; rozpuštěná nosičová RNA by měla být okamžitě přidána do Bufferu ACL, jak je popsáno na straně 29 pro protokol Breeze a na straně 34 pro klasický protokol. 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 Bufferu AVE by se měly zmrazit v alikvotních podílech při teplotě −30 °C až −15 °C.

Sada QIAamp DSP Circulating NA Kit obsahuje roztok proteinázy K připravený k použití, který je rozpuštěn ve speciálně vytvořeném zásobním pufru. Proteináza K je stabilní až do data exspirace uvedeného na štítku komponenty při skladování při pokojové teplotě (15–25 °C).

Uchovávání a nakládání se vzorkem

Uchovávání krve a manipulace s ní

Aby nedošlo k rozkladu bezbuněčných nukleových kyselin a uvolňování buněčných nukleových kyselin, doporučujeme uchovávat celou krev po dobu maximálně 6 hodin při teplotě 2–8 °C (např. alikvoty v EDTA). Pokud používáte stabilizované zkumavky na odběr krve, vezměte prosím v úvahu podmínky skladování udané výrobcem. Doporučujeme tyto podmínky skladování ověřit v kombinaci s vaší konkrétní navazující aplikací a cílem.

Uchovávání plazmy a manipulace s ní

Při použití EDTA jako antikoagulantu, zejména pro RNA, se doporučuje neprodleně po darování krve provést separaci plazmy a izolaci nukleových kyselin. Při krátkodobém skladování může být plazma skladována až 24 hodin při teplotě 2–8 °C.

Pro delší skladování mohou být alikvoty plazmy ze stabilizovaných i nestabilizovaných zkumavek na odběr krve uchovávány při teplotě –20 °C (pouze pro DNA jako cíl) nebo –80 °C (DNA a RNA jako cíl) po dobu nejméně 4 týdnů.

Uchovávání eluovaných nukleových kyselin

Eluované nukleové kyseliny se shromažďují v 1,5ml elučních zkumavkách (součást sady). Purifikované cirkulující nukleové kyseliny mohou být skladovány až 24 hodin při teplotě 2–8 °C. Pro období skladování delší než 24 hodin se doporučuje uchovávání při teplotě –30 °C až –15 °C pro DNA a –90 °C až –60 °C pro následné aplikace s RNA.

Postup

Důležité body před zahájením používání

QIAvac 24 Plus

Systém QIAvac 24 Plus je navržen pro rychlé a efektivní vakuové zpracování až 24 centrifugačních kolon QIAGEN současně. Alikvoty a promývací roztoky se vedou přes membrány kolonky pomocí vakua namísto odstředění, což poskytuje vyšší rychlost a zkrácení času potřebného pro manipulaci při purifikačních postupech.

V kombinaci se systémem QIAvac Connecting System lze systém QIAvac 24 Plus použít jako průtokový systém. Proteklý alikvot je shromažďován do samostatné odpadní láhve.

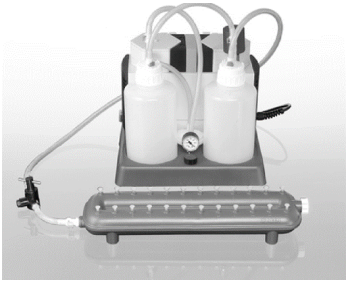
Při údržbě systému QIAvac 24 Plus postupujte podle pokynů pro manipulaci, které jsou uvedeny v *příručce k systému QIAvac 24 Plus*.

Zpracování kolonek QIAamp Mini v systému QIAvac 24 Plus

Kolonky QIAamp Mini jsou v systému QIAvac 24 Plus zpracovány pomocí jednorázových konektorů VacConnectors a opakovaně použitelných ventilů VacValves. Ventily VacValves (volitelné) se vkládají přímo do luerových slotů potrubí systému QIAvac 24 Plus a zajišťují stabilní průtok, což usnadňuje paralelní zpracování různých objemů alikvotu. Měly by být použity, pokud se průtoky alikvotů výrazně liší, aby se zajistil stálý podtlak. Konektory VacConnectors jsou jednorázové konektory, které se vejdou mezi kolonky QIAamp Mini a ventily VacValves nebo mezi kolonky QIAamp Mini a luerové sloty systému QIAvac 24 Plus. Zabraňují přímému kontaktu mezi centrifugační kolonkou a ventilem VacValve během purifikace, čímž se zabrání křížové kontaminaci mezi alikvoty. Konektory VacConnectors jsou po jednom použití vyřazeny. Vzhledem k velkému objemu použitého roztoku je vyžadován sytém QIAvac Connecting System (nebo podobné nastavení s odpadními lahvemi) (viz Obrázek 2).

Pokyny pro zacházení se systémem QIAvac 24 Plus

- Systém QIAvac 24 Plus vždy pokládejte na zajištěnou desku stolu nebo pracovní plochu. Pokud spadne, může potrubí systému QIAvac 24 Plus prasknout.
- Systém QIAvac 24 Plus vždy skladujte čistý a suchý. Postupy čištění najdete v příručce k systému QIAvac 24 Plus.
- Komponenty systému QIAvac 24 Plus nejsou odolné vůči určitým rozpouštědlům (Tabulka 1). Pokud se tato rozpouštědla vylijí na jednotku, důkladně ji opláchněte vodou.
- Pro zajištění konzistentního výkonu neaplikujte silikonové ani vakuové mazivo na žádnou část potrubí systému QIAvac 24 Plus.
- Při práci v blízkosti vakuového potrubí pod tlakem buďte vždy opatrní a používejte ochranné brýle.
- Informace o dílech nebo náhradních dílech získáte u technického servisu společnosti QIAGEN nebo od místního distributora.
- Podtlak je rozdílový tlak mezi vnitřkem vakuového potrubí a atmosférou (standardní atmosférický tlak: 1 013 milibar nebo 760 mm Hg) a může být měřen pomocí systému QIAvac Connecting System (viz Obrázek 2). Protokoly vyžadují vakuovou pumpu schopnou generovat vakuum nebo podtlak −800 až −900 mbar (např. vakuová pumpa QIAGEN Vacuum Pump). Vyšším podtlakům je nutné se vyhnout. Použití podtlaků nižších, než je doporučeno, může snížit výtěžek a čistotu nukleových kyselin a zvýšit riziko ucpávání membrán.



Obrázek 2. Systémy QIAvac 24 Plus, QIAvac Connecting System a vakuová pumpa

Tabulka 1. Vlastnosti chemické odolnosti systému QIAvac 24 Plus

Je odolný vůči		Není odolný vůči
Octová kyselina	Chaotropní soli	Benzen
Kyselina chromová	Koncentrované alkoholy	Fenol
SDS	Chlorid sodný	Chloroform
Tween® 20	Močovina	Toluen
Chlorové bělidlo	Kyselina chlorovodíková	Étery
Hydroxid sodný		

Nastavení vakuového potrubí systému QIAvac 24 Plus vacuum manifold

1. Připojte systém QIAvac 24 Plus ke zdroji vakua. Pokud používáte systém QIAvac Connecting System, připojte systém k potrubí a zdroji vakua, jak je popsáno v příloze A *příručky k systému QIAvac 24 Plus*.
2. Do každého luerového slotu systému QIAvac 24 Plus, který má být použit, vložte ventil VacValve (volitelný) (viz Obrázek 3). Nepoužité luerové sloty uzavřete luerovými zátkami nebo zavřete vložený ventil VacValve.

   Ventily VacValves by se měly použít, pokud se průtoky alikvotů významně liší, aby se zajistil stálý podtlak.
3. Do každého ventilu VacValve vložte konektor VacConnector (viz Obrázek 3).

   Tento krok proveďte přímo před zahájením purifikace, abyste zabránili vystavení konektorů VacConnectors potenciálním kontaminantům ve vzduchu.
4. Kolonky QIAamp Mini vložte do konektorů VacConnectors na potrubí (viz Obrázek 3).

   Poznámka: Vyjměte zkumavku z blistru pro použití v protokolu purifikace.
5. Vložte nástavec kolonky (20 ml) do každé kolonky QIAamp Mini (viz Obrázek 3).

   Poznámka: Ujistěte se, že je nástavec kolonky pevně vložen do kolonky QIAamp Mini, aby nedošlo k úniku alikvotu.
6. Při purifikaci nukleových kyselin postupujte podle pokynů v protokolech. Konektory VacConnectors po použití odpovídajícím způsobem zlikvidujte.

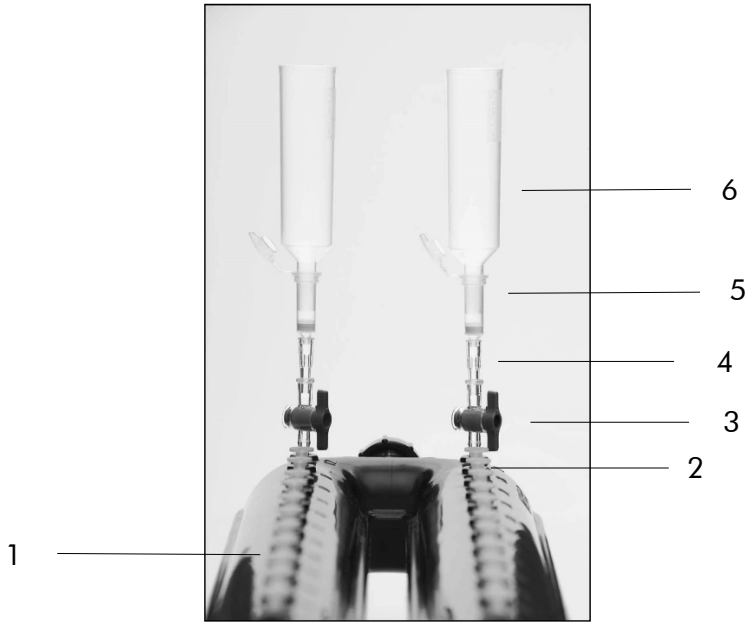
Víčko kolonky QIAamp Mini nechejte při použití vakua otevřené.

Vypněte vakuum mezi kroky, abyste zajistili, že během zpracování bude aplikován konzistentní rovnoměrný podtlak. Pro rychlejší uvolnění vakua by měl být použit vakuový regulátor Vacuum Regulator (součást připojovacího systému QIAvac Connecting System).

Poznámka: Každý ventil VacValve může být uzavřen jednotlivě, když je alikvot kompletně protažen kolonkou, což umožňuje současné zpracování alikvotů různých objemů nebo viskozit.

7. Po zpracování alikvotů systém QIAvac 24 Plus vyčistěte (viz „Čištění a dekontaminace systému QIAvac 24 Plus“ v *příručce k systému QIAvac 24 Plus*).

   Poznámka: Buffer ACL, ACB a ACW1 není kompatibilní s dezinfekčními prostředky obsahujícími bělidlo. Varování a bezpečnostní opatření jsou uvedeny na straně 13.



Obrázek 3. Nastavení QIAvac 24 Plus s kolonkami QIAamp Mini s použitím ventilů VacValves, konektorů VacConnectors a nástavcem na kolonky.

1 Vakuové potrubí QIAvac 24 Plus vacuum manifold

2 Luerový slot systému QIAvac 24 Plus (uzavřený s luerovým konektorem)

3 Ventil VacValve**

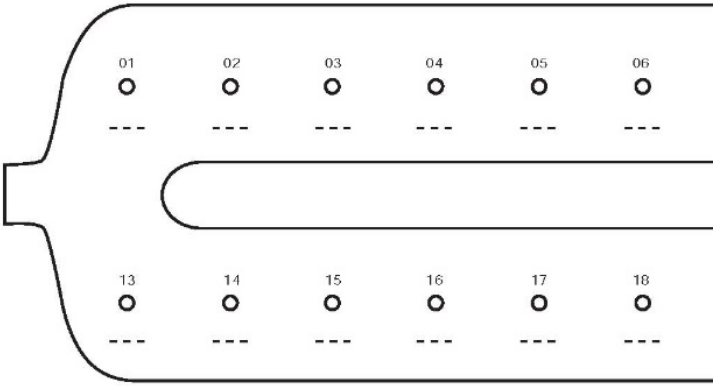
4 Vakuový konektor VacConnector

5 Kolonka QIAamp Mini

6 Nástavce na kolonky

Doporučujeme označení zkumavek a kolonek QIAamp Mini pro použití s vakuovým systémem QIAvac 24 Plus podle schématu na Obrázek 4, aby se zabránilo pomíchání alikvotů. Je možné udělat fotokopii obrázku a označit na něm názvy alikvotů.

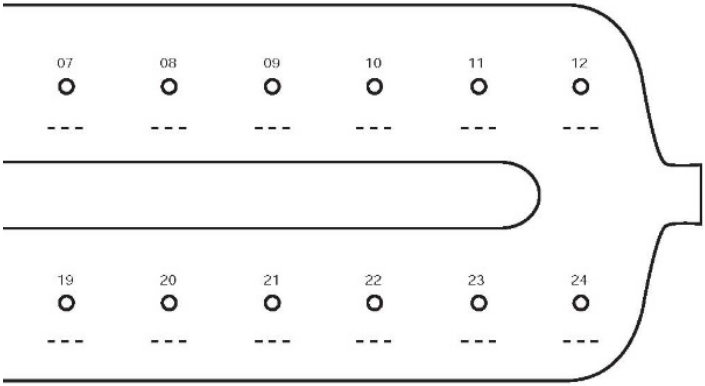
* Musí být zakoupeno samostatně.


01
02
03
04
05
06
13
14
15
16
17
18

Datum: _____

Uživatel: _____

Pracovní ID číslo: _____



Obrázek 4. Schéma značení pro zkumavky a kolonky QIAamp Mini pro použití s vakuovým systémem QIAvac 24 Plus

Příprava pufrů a reagencií

Buffer ACB

Před použitím přidejte 200 ml isopropanolu (100%) do 300 ml koncentrátu Bufferu ACB, abyste získali 500 ml Bufferu ACB. Po přidání isopropanolu dobře promíchejte.

Buffer ACW1*

Před použitím přidejte 25 ml etanolu (96–100%) do 19 ml koncentrátu Bufferu ACW1, abyste získali 44 ml Bufferu ACW1. Po přidání etanolu dobře promíchejte.

Buffer ACW2†

Před použitím přidejte 30 ml etanolu (96–100%) do 13 ml koncentrátu Bufferu ACW2, abyste získali 43 ml Bufferu ACW2. Po přidání etanolu dobře promíchejte.

Přidání nosičové RNA do Bufferu ACL*

Nosičová RNA slouží ke 2 účelům: Zaprvé, podporuje vázání nukleových kyselin na membránu QIAamp Mini, zvláště pokud je v alikvotu velmi málo cílových molekul. Zadruhé, přídavek velkého množství nosičové RNA snižuje možnost degradace RNA ve vzácném případě, kdy molekuly RNázy uniknou denaturaci chaotropními solemi a detergenty v Bufferu ACL.

Množství lyofilizované nosičové RNA (součást dodávky) dostačuje pro objem Bufferu ACL dodávaného se sadou. Doporučená koncentrace nosičové RNA byla upravena tak, aby bylo možné používat protokol QIAamp DSP Circulating NA jako generický purifikační systém kompatibilní s většinou různých amplifikačních systémů, který je vhodný pro široké spektrum RNA a DNA cílů.

* Obsahuje chaotropní sůl. Varování a bezpečnostní opatření viz strana 13.
† Obsahuje azid sodný jako konzervační látku.

Různé amplifikační systémy mají proměnlivou účinnost v závislosti na celkovém množství nukleových kyselin přítomných v reakci. Eluáty z této sady obsahují jak nukleové kyseliny, tak nosičovou RNA s tím, že množství nosičové RNA ve většině případů vysoce překračuje množství cirkulujících nukleových kyselin. Kvantifikace izolovaných cirkulujících nukleových kyselin měřením absorbance UV tedy nebude adekvátní, protože výsledky takových měření jsou stanoveny přítomností nosičové RNA.

Pro dosažení nejvyšších hladin senzitivity při amplifikačních reakcích možná bude nezbytné snížit množství nosičové RNA přidaného do Bufferu ACL.

U amplifikačních systémů zahrnujících oligo dT primery by během izolace volných cirkulujících nukleových kyselin neměla být přidána žádná nosičová RNA.

Přidejte 1 550 µl Bufferu AVE* do zkumavky obsahující 310 µg lyofilizované nosičové RNA, abyste získali roztok o koncentraci 0,2 µg/µl. Důkladně rozpusťte nosičovou RNA, rozdělte na alikvotní podíly vhodné velikosti a uchovávejte při teplotě –30 °C až –15 °C. Alikvotní množství nosičové RNA nezmrazujte/nerozmrazujte více než 3krát.

Všimněte si, že nosičová RNA se v Bufferu ACL nerozpouští. Musí se nejprve rozpustit v Bufferu AVE a poté přidat do Bufferu ACL.

Vypočítejte objem směsi Bufferu ACL-nosičová RNA potřebný na dávku alikvotů podle tabulek v protokolech. Vyberte počet alikvotů, které mají být zpracovány současně.

Jemně promíchejte 10x otočením zkumavky nebo lahvičky dnem vzhůru. Aby nedošlo ke tvorbě pěny, nevytvářejte vír.

*Obsahuje azid sodný jako konzervační látku.

Poznámka: Proces přípravy alikvotu je optimalizován na maximálně 1,0 µg nosičové RNA na alikvot. Pokud se ukáže, že je pro váš amplifikační systém lepší méně nosičové RNA, převeďte pouze požadované množství rozpuštěné nosičové RNA do zkumavek obsahujících Buffer ACL. Na každý mikrogram nosičové RNA požadované pro přípravu přidejte do Bufferu ACL 5 µl rozpuštěné nosičové RNA. (Použití méně než 1,0 µg nosičové RNA na alikvot musí být přínosné a validováno pro každý konkrétní typ alikvotu a analýzu prováděnou v dalším stupni.)

Protokol Breeze: Purifikace cirkulujících nukleových kyselin z 1–5 ml lidské krevní plazmy

Tento protokol je určen k purifikaci cirkulující DNA a RNA z 1–5 ml lidské krevní plazmy a byl optimalizován pro kratší dobu manipulace a zpracování. Existující uživatelsky ověřené pracovní postupy používající sadu QIAamp DSP circulating Kit, verze 1/R3, jsou uvedeny v části „Klasický protokol: Purifikace cirkulujících nukleových kyselin z 1–5 ml lidské krevní plazmy“ (strana 33).

Důležité body před zahájením používání

- Všechny kroky centrifugace se provádějí při pokojové teplotě (15–25 °C).
- Vypněte vakuum mezi kroky, abyste zajistili, že během kroků protokolu bude aplikován konzistentní rovnoměrný podtlak.
- **Poznámka**: Tlak vakuové pumpy by měl být mezi –800 až –900 mbar.
- Vytemperujte alikvoty na pokojovou teplotu.
- Použijte fosfátem pufrovaný fyziologický roztok, aby se objem alikvotu dostal na nejbližší přesný objem (1 ml až 5 ml).
- Nastavte QIAvac 24 Plus, jak je popsáno na straně 20.
- Zahřejte vodní lázeň nebo topný blok na 56 °C pro použití s 50ml centrifugačními zkumavkami ve 3. kroku.
- Před použitím kolonky QIAamp Mini pro odstřeďování temperujte alespoň 1 hodinu na pokojovou teplotu.
- Zajistěte, aby byl Buffer ACB, Buffer ACW1 a Buffer ACW2 připraven (přídavek isopropanolu nebo etanolu) podle pokynů na straně 25.
- Přidejte nosičovou RNA rekonstituovanou v Bufferu AVE do Bufferu ACL podle pokynů v Tabulka 2.

Tabulka 2. Objem Bufferu ACL a nosičové RNA (rozpuštěné v Bufferu AVE) potřebný pro zpracování 1–5 ml alikvotů lidské krevní plazmy

Nastavení pro ml plazmy	A	B	C	D	E	Nosičová RNA v Bufferu AVE (µl)
	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	
Počet alikvotů	Buffer ACL (ml)					
1	0,9	1,8	2,6	3,5	4,4	5,6
2	1,8	3,5	5,3	7,0	8,8	11,3
3	2,6	5,3	7,9	10,6	13,2	16,9
4	3,5	7,0	10,6	14,1	17,6	22,5
5	4,4	8,8	13,2	17,6	22,0	28,1
6	5,3	10,6	15,8	21,1	26,4	33,8
7	6,2	12,3	18,5	24,6	30,8	39,4
8	7,0	14,1	21,1	28,2	35,2	45,0
9	7,9	15,8	23,8	31,7	39,6	50,6
10	8,8	17,6	26,4	35,2	44,0	56,3
11	9,7	19,4	29,0	38,7	48,4	61,9
12	10,6	21,1	31,7	42,2	52,8	67,5
13	11,4	22,9	34,3	45,8	57,2	73,1
14	12,3	24,6	37,0	49,3	61,6	78,8
15	13,2	26,4	39,6	52,8	66,0	84,4
16	14,1	28,2	42,2	56,3	70,4	90,0
17	15,0	29,9	44,9	59,8	74,8	95,6
18	15,8	31,7	47,5	63,4	79,2	101,3
19	16,7	33,4	50,2	66,9	83,6	106,9
20	17,6	35,2	52,8	70,4	88,0	112,5
21	18,5	37,0	55,4	73,9	92,4	118,1
22	19,4	38,7	58,1	77,4	96,8	123,8
23	20,2	40,5	60,7	81,0	101,2	129,4
24	21,1	42,2	63,4	84,5	105,6	135,0

Postup: Protokol Breeze

1. Napipetujte proteinázu QIAGEN Proteinase K, plazmu a Buffer ACL **v tomto pořadí** do 50ml centrifugační zkumavky (není součástí dodávky).

Nastavení	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**
ProtK (µl)	100	200	300	400	500
Plazma (ml)	1	2	3	4	5
ACL (ml)	0,8	1,6	2,4	3,2	4

2. Uzavřete víčko a promíchejte pulzním protřepáváním po dobu 5x 2 sekundy.

   Zajistěte, aby byl ve zkumavce vytvořen viditelný vír. Za účelem zajištění efektivní lýzy je zásadně důležité, abyste důkladně promíchali alikvot a Buffer ACL, čímž se získá homogenní roztok.

   Poznámka: V tento moment postup nepřerušujte. Okamžitě pokračujte ke kroku 3 a zahajte inkubaci lýzy.

3. Inkubujte při teplotě 56 °C (±1 °C) po dobu 15 (±1) minut.
4. Zkumavku položte zpět na laboratorní stůl a odšroubujte krytku.
5. Do lyzátu ve zkumavce přidejte Buffer ACB. Vyberte objem podle nastavení z kroku 1.

Nastavení	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**
ACB (ml)	1,8	3,6	5,4	7,2	9

6. Uzavřete víčko a důkladně promíchejte pulzním protřepáváním po dobu 5x 2 sekundy.

   Zajistěte, aby byl ve zkumavce vytvořen viditelný vír. Za účelem zajištění efektivní lýzy je zásadně důležité, abyste důkladně promíchali lyzát a Buffer ACB, čímž se získá homogenní roztok.

7. Inkubujte směs lyzátu a Bufferu ACB ve zkumavce po dobu 5 (±1) minut při pokojové teplotě.

8. Vložte kolonku QIAamp Mini do konektoru VacConnector na QIAvac 24 Plus (viz „Nastavení vakuového potrubí systému QIAvac 24 Plus“, strana 20). Do otevřené kolonky QIAamp Mini vložte 20ml nástavec kolonky.

   Ujistěte se, že je nástavec kolonky pevně vložen do kolonky QIAamp Mini, aby nedošlo k úniku alikvotu.

   Poznámka: V kroku 13 udržujte promývací zkumavku pro vysušení odstředěním.

9. Opatrně naneste lyzát z kroku 7 na nástavec kolonky QIAamp Mini. Zapněte vakuovou pumpu. Jakmile jsou všechny lyzáty zcela protaženy kolonkami, vypněte vakuovou pumpu a uvolněte tlak na 0 mbar. Nástavec kolonky opatrně vyjměte a zlikvidujte.

   Vezměte prosím na vědomí, že u velkých objemů lyzátu alikvotu (asi 18 ml, když začíná s alikvotem 5 ml) může trvat až 20 minut, než silou podtlaku projdou membránou QIAamp Mini.

   Pro rychlé a pohodlné uvolnění podtlaku by měl být použit vakuový regulátor Vacuum Regulator (součást připojovacího systému QIAvac Connecting System).

   Poznámka: Chcete-li se vyhnout křížové kontaminaci, dávejte pozor, abyste při vyjímání nástavců kolonek nepřecházeli přes sousední kolonky QIAamp Mini.

10. Na kolonku QIAamp Mini naneste 600 µl Bufferu ACW1. Víčko kolonky nechejte otevřené a zapněte vakuovou pumpu. Poté, co je veškerý Buffer ACW1 protažen kolonkou QIAamp Mini, vypněte vakuovou pumpu a uvolněte tlak na 0 mbar.

11. Na kolonku QIAamp Mini naneste 750 µl Bufferu ACW2. Víčko kolonky nechejte otevřené a zapněte vakuovou pumpu. Poté, co je veškerý Buffer ACW2 protažen kolonkou QIAamp Mini, vypněte vakuovou pumpu a uvolněte tlak na 0 mbar.

12. Na kolonku QIAamp Mini naneste 750 µl etanolu (96–100%). Víčko kolonky nechejte otevřené a zapněte vakuovou pumpu. Poté, co je veškerý etanol protažen kolonkou k odstředění, vypněte vakuovou pumpu a uvolněte tlak na 0 mbar.

13. Zavřete víčko kolonky QIAamp Mini. Vyjměte ji z vakuového potrubí a zlikvidujte konektor VacConnector. Umístěte kolonku QIAamp Mini do čisté 2ml promývací zkumavky (z kroku 8) a odstřeďujte při plných otáčkách (20 000x *g*; 14 000 ot./min.) po dobu 3 (±0,5) minut.

14. Vložte kolonku QIAamp Mini do čisté 2ml promývací zkumavky. Otevřete víčko a sestavu inkubujte při pokojové teplotě po dobu 3 minut, abyste membránu zcela vysušili.
15. Vložte kolonku QIAamp Mini do čisté 1,5ml eluční zkumavky (součást sady) a 2ml promývací zkumavku z kroku 14 zlikvidujte. Opatrně naneste 20–150 µl Bufferu AVE na střed membrány kolonky QIAamp Mini. Uzavřete víčko a inkubujte při pokojové teplotě po dobu 3 (±0,5) minut.

    Důležité: Zajistěte, aby byl eluční Buffer AVE vytemperován na pokojovou teplotu (15−25 °C). Pokud se eluce provádí v malých objemech (< 50 µl), eluční pufr se musí dávkovat na střed membrány pro úplnou eluci vázaných nukleových kyselin.

    Eluční objem je pružný a lze jej upravovat podle požadavků aplikací v dalších stupních analýzy.

    Eluce s menším objemem Bufferu AVE vede k vyšším koncentracím nukleových kyselin, ale může vést k nižšímu celkovému výtěžku.

    Získaný objem eluátu může být až o 5 µl menší než eluční objem aplikovaný na membránu kolonky QIAamp Mini.

    Poznámka: U očekávaných nízkých výtěžků nukleových kyselin je pro eluci doporučeno použití zkumavky s nízkou vazbou (není součástí dodávky).
16. Odstřeďujte v mikrocentrifuze při plné rychlosti (20 000x *g*; 14 000 ot./min.) po dobu 1 minuty, aby došlo k eluci nukleových kyselin.

Klasický protokol: Purifikace cirkulujících nukleových kyselin z 1–5 ml lidské krevní plazmy

Tento protokol představuje nezměněný protokol z příručky QIAamp DSP circulating NA Kit, revize 3 (R3) pro použití např. se stávajícími uživatelsky ověřenými pracovními postupy pro 1–5 ml lidské plazmy.

Důležité body před zahájením používání

- Všechny kroky centrifugace se provádějí při pokojové teplotě (15–25 °C).
- Vypněte vakuum mezi kroky, abyste zajistili, že během kroků protokolu bude aplikován konzistentní rovnoměrný podtlak.

  Poznámka: Tlak vakuové pumpy by měl být mezi –800 až –900 mbar.
- Vytemperujte alikvoty na pokojovou teplotu.
- Použijte fosfátem pufrovaný fyziologický roztok, aby se objem alikvotu dostal na nejbližší přesný objem (1 ml až 5 ml).
- Nastavte QIAvac 24 Plus, jak je popsáno na straně 20.
- Zahřejte vodní lázeň nebo topný blok na 60 °C pro použití s 50ml centrifugačními zkumavkami ve 3. kroku.
- Nastavte topný blok na teplotu 56 °C pro použití s 2ml promývacími zkumavkami ve 14. kroku.
- Před použitím kolonky QIAamp Mini pro odstřeďování temperujte alespoň 1 hodinu na pokojovou teplotu.
- Zajistěte, aby byl Buffer ACB, Buffer ACW1 a Buffer ACW2 připraven (přídavek isopropanolu nebo etanolu) podle pokynů na straně 25.
- Přidejte nosičovou RNA rekonstituovanou v Bufferu AVE do Bufferu ACL podle pokynů v Tabulka 3.

Tabulka 3. Objem Bufferu ACL a nosičové RNA (rozpuštěné v Bufferu AVE) potřebný pro zpracování 1–5 ml alikvotů lidské krevní plazmy

Nastavení pro ml plazmy	A	B	C	D	E	Nosičová RNA v Bufferu AVE (µl)
	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	
Počet alikvotů	**Buffer ACL (ml)**					
1	0,9	1,8	2,6	3,5	4,4	5,6
2	1,8	3,5	5,3	7,0	8,8	11,3
3	2,6	5,3	7,9	10,6	13,2	16,9
4	3,5	7,0	10,6	14,1	17,6	22,5
5	4,4	8,8	13,2	17,6	22,0	28,1
6	5,3	10,6	15,8	21,1	26,4	33,8
7	6,2	12,3	18,5	24,6	30,8	39,4
8	7,0	14,1	21,1	28,2	35,2	45,0
9	7,9	15,8	23,8	31,7	39,6	50,6
10	8,8	17,6	26,4	35,2	44,0	56,3
11	9,7	19,4	29,0	38,7	48,4	61,9
12	10,6	21,1	31,7	42,2	52,8	67,5
13	11,4	22,9	34,3	45,8	57,2	73,1
14	12,3	24,6	37,0	49,3	61,6	78,8
15	13,2	26,4	39,6	52,8	66,0	84,4
16	14,1	28,2	42,2	56,3	70,4	90,0
17	15,0	29,9	44,9	59,8	74,8	95,6
18	15,8	31,7	47,5	63,4	79,2	101,3
19	16,7	33,4	50,2	66,9	83,6	106,9
20	17,6	35,2	52,8	70,4	88,0	112,5
21	18,5	37,0	55,4	73,9	92,4	118,1
22	19,4	38,7	58,1	77,4	96,8	123,8
23	20,2	40,5	60,7	81,0	101,2	129,4
24	21,1	42,2	63,4	84,5	105,6	135,0

Postup: Klasický protokol

1. Napipetujte proteinázu QIAGEN Proteinase K, plazmu a Buffer ACL v tomto pořadí do 50ml centrifugační zkumavky (není součástí dodávky).

Nastavení	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**
ProtK (µl)	100	200	300	400	500
Plazma (ml)	1	2	3	4	5
ACL (ml)	0,8	1,6	2,4	3,2	4

2. Uzavřete víčko a promíchejte pulzním protřepáváním po dobu 30 sekund.

   Zajistěte, aby byl ve zkumavce vytvořen viditelný vír. Za účelem zajištění efektivní lýzy je zásadně důležité, abyste důkladně promíchali alikvot a Buffer ACL, čímž se získá homogenní roztok.

   Poznámka: V tento moment postup nepřerušujte. Okamžitě pokračujte ke kroku 3 a zahajte inkubaci lýzy.

3. Inkubujte při teplotě 60 °C (±1 °C) po dobu 30 (±2) minut.
4. Zkumavku položte zpět na laboratorní stůl a odšroubujte krytku.
5. Do lyzátu ve zkumavce přidejte Buffer ACB. Vyberte objem podle nastavení z kroku 1.

Nastavení	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**
ACB (ml)	1,8	3,6	5,4	7,2	9

6. Uzavřete víčko a důkladně promíchejte pulzním protřepáváním po dobu 30 sekund.

   Zajistěte, aby byl ve zkumavce vytvořen viditelný vír. Za účelem zajištění efektivní lýzy je zásadně důležité, abyste důkladně promíchali lyzát a Buffer ACB, čímž se získá homogenní roztok.

7. Inkubujte směs lyzátu a Bufferu ACB ve zkumavce po dobu 5 (±1) minut na ledu.

8. Vložte kolonku QIAamp Mini do konektoru VacConnector na QIAvac 24 Plus (viz „Nastavení vakuového potrubí systému QIAvac 24 Plus“, strana 20). Do otevřené kolonky QIAamp Mini vložte 20ml nástavec kolonky.

   Ujistěte se, že je nástavec kolonky pevně vložen do kolonky QIAamp Mini, aby nedošlo k úniku alikvotu.

   Poznámka: V kroku 13 udržujte promývací zkumavku pro vysušení odstředěním.

9. Opatrně naneste lyzát z kroku 7 na nástavec kolonky QIAamp Mini. Zapněte vakuovou pumpu aplikováním tlaku −800 až –900 mbar. Jakmile jsou všechny lyzáty zcela protaženy kolonkami, vypněte vakuovou pumpu a uvolněte tlak na 0 mbar. Nástavec kolonky opatrně vyjměte a zlikvidujte.

   Vezměte prosím na vědomí, že u velkých objemů lyzátu alikvotu (asi 18 ml, když začíná s alikvotem 5 ml) může trvat až 20 minut, než silou podtlaku projdou membránou QIAamp Mini.

   Pro rychlé a pohodlné uvolnění podtlaku by měl být použit vakuový regulátor Vacuum Regulator (součást připojovacího systému QIAvac Connecting System).

   Poznámka: Chcete-li se vyhnout křížové kontaminaci, dávejte pozor, abyste při vyjímání nástavců kolonek nepřecházeli přes sousední kolonky QIAamp Mini.

10. Na kolonku QIAamp Mini naneste 600 µl Bufferu ACW1. Víčko kolonky nechejte otevřené a zapněte vakuovou pumpu. Poté, co je veškerý Buffer ACW1 protažen kolonkou QIAamp Mini, vypněte vakuovou pumpu a uvolněte tlak na 0 mbar.

11. Na kolonku QIAamp Mini naneste 750 µl Bufferu ACW2. Víčko kolonky nechejte otevřené a zapněte vakuovou pumpu. Poté, co je veškerý Buffer ACW2 protažen kolonkou QIAamp Mini, vypněte vakuovou pumpu a uvolněte tlak na 0 mbar.

12. Na kolonku QIAamp Mini naneste 750 µl etanolu (96–100%). Víčko kolonky nechejte otevřené a zapněte vakuovou pumpu. Poté, co je veškerý etanol protažen kolonkou k odstředění, vypněte vakuovou pumpu a uvolněte tlak na 0 mbar.

13. Zavřete víčko kolonky QIAamp Mini. Vyjměte ji z vakuového potrubí a zlikvidujte konektor VacConnector. Umístěte kolonku QIAamp Mini do čisté 2ml promývací zkumavky (z kroku 8) a odstřeďujte při plných otáčkách (20 000x *g*; 14 000 ot./min.) po dobu 3 (±0,5) minut.
14. Vložte kolonku QIAamp Mini do čisté 2ml promývací zkumavky. Otevřete víčko a sestavu inkubujte při 56 °C (±1 °C) po dobu 10 (±1) minut, abyste membránu zcela vysušili.
15. Vložte kolonku QIAamp Mini do čisté 1,5ml eluční zkumavky (součást sady) a 2ml promývací zkumavku z kroku 13 zlikvidujte. Opatrně naneste 20–150 µl Bufferu AVE na střed membrány kolonky QIAamp Mini. Uzavřete víčko a inkubujte při pokojové teplotě po dobu 3 (±0,5) minut.

    Důležité: Zajistěte, aby byl eluční Buffer AVE vytemperován na pokojovou teplotu (15−25 °C). Pokud se eluce provádí v malých objemech (< 50 µl), eluční pufr se musí dávkovat na střed membrány pro úplnou eluci vázaných nukleových kyselin.

    Eluční objem je pružný a lze jej upravovat podle požadavků aplikací v dalších stupních analýzy.

    Eluce s menším objemem Bufferu AVE vede k vyšším koncentracím nukleových kyselin, ale může vést k nižšímu celkovému výtěžku.

    Získaný objem eluátu může být až o 5 µl menší než eluční objem aplikovaný na kolonku QIAamp Mini.

    Poznámka: U očekávaných nízkých výtěžků nukleových kyselin je pro eluci doporučeno použití zkumavky s nízkou vazbou (není součástí dodávky).
16. Odstřeďujte v mikrocentrifuze při plné rychlosti (20 000x *g*; 14 000 ot./min.) po dobu 1 minuty, aby došlo k eluci nukleových kyselin.

Kontrola kvality

V souladu se systémem řízení kvality QIAGEN certifikovaným ISO se testuje každá šarže sady QIAamp DSP Circulating NA Kit vůči předem stanoveným specifikacím, aby se zajistila konzistentní kvalita výrobku.

Omezení

Výkon systému pro izolaci cirkulujících bezbuněčných nukleových kyselin byl stanoven pomocí alikvotů lidské plazmy generovaných z následujících zkumavek pro odběr krve:

- K2-EDTA (Beckton Dickinson, kat. č. 367525)
- Zkumavka PAXgene Blood ccfDNA Tube (PreAnlaytiX, kat. č. 768115)
- Cell-Free DNA BCT (Streck, kat. č. 218962)

Každý uživatel je zodpovědný za platnost funkčnosti systémů u všech postupů používaných v dané laboratoři, které nejsou zahrnuty ve studiích funkčnosti výrobků QIAGEN.

Pro minimalizaci rizika negativního dopadu na diagnostické výsledky je zapotřebí používat pro aplikace v dalších stupních analýzy odpovídající kontroly. Pro další validaci se doporučují pokyny Mezinárodní konference o harmonizaci technických požadavků (International Conference on Harmonization of Technical Requirements, ICH) uvedené v dokumentu Validace analytických postupů ICH Q2(R1): Text a metodologie.

Jakékoliv získané diagnostické výsledky se musí interpretovat v kontextu ostatních klinických nebo laboratorních nálezů.

Symboly

Symbol	Definice symbolu
	Obsahuje reagencie pro <N> testů
	Použijte do
	Zdravotnický prostředek pro diagnostiku in vitro
	Při dodání
	Otevřít při převzetí; uchovávejte kolonky QIAamp Mini Spin při teplotě 2–8 °C
	Katalogové číslo
	Počet
	Číslo šarže
	Číslo materiálu
	Součásti
	Objem
	Přidání
	Teplotní omezení

	Výrobce
	Viz návod k použití
	Zapište aktuální datum přidání etanolu do lahvičky
	Etanol
	Zapište aktuální datum přidání isopropanolu do lahvičky
	Isopropanol
	Obsahuje
	Pokračování
	Guanidin thiokyanát
	Guanidin hydrochlorid
	BRIJ 58
	Globální číslo obchodní položky

Literatura

1. Levy, B. (2019) *Prenatal Diagnosis*. Methods in Molecular Biology. 2nd ed. New York: Humana Press.

2. Hahn, S. and Zimmermann, B.G. (2010) Cell-free DNA in maternal plasma: has the size-distribution puzzle been solved? Clin Chem. **56**, 1210-1211.

3. Anfossi, S., Babayan, A., Pantel, K., and Calin, G. (2018) Clinical utility of circulating non-coding RNAs - an update. Nat Rev Clin Oncol **15**, 541-563.

4. Babayan, A. and Pantel, K. (2018) Advances in liquid biopsy approaches for early detection and monitoring of cancer. Genome Med **10**, 21.

5. Terrinoni, A.,et al (2019) The circulating miRNAs as diagnostic and prognostic markers. Clin Chem Lab Med. **57**, 932-953.

Kontaktní údaje

Pro technickou podporu a více informací navštivte náš technický servis na **support.qiagen.com**, zavolejte nebo kontaktujte jedno z oddělení technického servisu společnosti QIAGEN či svého místního distributora (viz zadní strana nebo **www.qiagen.com**).

Řešení potíží

Uvedené návody mohou pomoci při řešení potíží, které mohou nastat při práci se systémem. Kontaktní informace naleznete na zadním obalu nebo navštivte stránky **www.qiagen.com**.

		Komentáře a návrhy
V eluátu je málo nukleové kyseliny nebo žádná		
a)	Použití nestabilizované plazmy	Nestabilizované alikvoty plazmy mohou vést ke zrychlené degradaci DNA. Doporučujeme postupovat podle normy CEN/TS 16835-3:2015. Zopakujte purifikační proceduru s novými alikvoty.
b)	Prodloužená doba mezi odběrem krve a přípravou plazmy	Nukleované krevní buňky se mohou rozpadat a uvolňovat genomovou DNA do plazmy, čímž se zředí cílová nukleová kyselina.
c)	Alikvoty byly zmrazené a rozmrazené více než jednou	Opakovanému zmrazování a rozmrazování je třeba se vyhnout, protože to může vést k degradaci DNA. Vždy používejte čerstvé alikvoty nebo alikvoty rozmrazené jen jednou.
d)	Nízká koncentrace cílové DNA v alikvotech	Alikvoty plazmy byly stály při pokojové teplotě příliš dlouho. Zopakujte purifikační proceduru s novými alikvoty. **Poznámka**: Někteří jedinci mohou mít v plazmě nízkou koncentraci bezbuněčné NA; v takových případech by měl být zvolen zvýšený objem alikvotu a nízký objem eluátu.
e)	Neefektivní lýza alikvotu v Bufferu ACL	Pokud byla proteináza QIAGEN Proteinase K dlouhodobě vystavena zvýšené teplotě, může ztratit aktivitu. Opakujte postup s použitím nových alikvotů a čerstvou proteinázou QIAGEN Proteinase K.
f)	Směs Bufferu ACL a nosičové RNA nebyla dostatečně promíchána	Promíchejte Buffer ACL s nosičovou RNA jemným převrácením zkumavky s Buffrem ACL a nosičovou RNA nejméně 10krát.
g)	Namísto 96–100% byl použit nízkoprocentní etanol	Zopakujte purifikační proceduru s novými alikvoty a 96–100% etanolem. Nepoužívejte denaturovaný alkohol, který obsahuje další látky, jako například metanol nebo metyletylketon.
h)	Buffer ACB byl připraven nesprávně	Zkontrolujte, zda byl koncentrát Bufferu ACB rekonstituován se správným objemem isopropanolu (nikoli etanolu, viz strana 25).
i)	Buffer ACW1 nebo Buffer ACW2 byl připraven nesprávně	Zkontrolujte, zda byly koncentráty Bufferu ACW1 a Bufferu ACW2 naředěny správným objemem etanolu (viz strana 25). Zopakujte purifikační proceduru s novými alikvoty.
j)	Buffer ACW1 nebo Buffer ACW2 připravený ze 70% etanolu	Zkontrolujte, zda byly koncentráty Bufferu ACW1 a Bufferu ACW2 naředěny 96–100% etanolem (viz strana 25). Zopakujte purifikační proceduru s novými alikvoty.
RNA nebo DNA nemají dobrou účinnost v následných enzymatických reakcích		
a)	V eluátu je málo DNA nebo žádná	Možné důvody jsou uvedeny výše v části „V eluátu je málo nukleové kyseliny nebo žádná“ výše. Pokud možno, zvyšte množství eluátu přidaného do reakce.

		Komentáře a návrhy
b)	Použit nevhodný eluční objem	Stanovte maximální objem eluátu vhodný pro vaši následnou aplikaci. V souladu s tím snižte nebo zvyšte objem eluátu přidaného do následné aplikace. Eluční objem může být úměrně upraven. **Poznámka**: Eluce s menším objemem Bufferu AVE vede k vyšším koncentracím nukleových kyselin, ale může vést k nižšímu celkovému výtěžku.
c)	Pufry nebyly důkladně promíchány	Složky promývacího Bufferu ACW2 sůl a etanol se mohly po dlouhém stání mezi jednotlivými cykly oddělit. Před každým cyklem vždy pufry dobře promíchejte.
d)	Rušení v důsledku nosičové RNA	Pokud přítomnost nosičové RNA v eluátu interferuje s následnou enzymatickou reakcí, může být nutné snížit množství nosičové RNA nebo ji úplně vynechat.
Obecné pokyny k manipulaci		
a)	Zanesená kolonka QIAamp Mini	Pokud je průtok snížen, lze prodloužit dobu podtlaku. Případně zavřete ventil VacValve, pokud je použit, a opatrně z kolonky QIAamp Mini vyjměte sestavu nástavec kolonky – VacConnector – VacValve, aniž byste v nástavci kolonky ztratili jakýkoli lyzát. Vyjměte kolonku QIAamp Mini z vakuového potrubí, vložte ji do promývací zkumavky o objemu 2 ml a odstřeďte ji při plných otáčkách, dokud alikvot zcela neprojde membránou. Vraťte zpět sestavu nástavec kolonky – VacConnector – VacValve obsahující zbývající lyzát. Zapněte vakuovou pumpu, otevřete ventil VacValve a pokračujte ve vkládání zbývajícího lyzátu. Pokud se kolonka QIAamp Mini nadále ucpává, opakujte výše uvedený postup. V důsledku opakovaného zmrazování a rozmrazování se mohly v plazmě vytvořit kryoprecipitáty. Ty mohou kolonku QIAamp Mini zablokovat. Zmrazenou a rozmrazenou plazmu nepoužívejte více než jednou. V případě, že jsou viditelné kryoprecipitáty, vyčistěte alikvot odstředěním po dobu 5 minut při 16 000x *g*.
b)	Variabilní eluční objemy	Různé alikvoty mohou ovlivnit objem koncového eluátu. Získaný objem eluátu může být až o 5 µl menší než eluční objem aplikovaný na kolonku QIAamp Mini.
c)	Podtlak od –800 do –900 mbar nebyl dosažen	Vakuové potrubí není pevně uzavřeno. Po zapnutí vakua zatlačte víčko vakuového potrubí dolů. Zkontrolujte, zda je dosaženo podtlaku. Těsnění víka QIAvac je opotřebované. Pohledem zkontrolujte těsnění potrubí a v případě potřeby je vyměňte. Ventily VacValves jsou opotřebované. Vyjměte všechny ventily VacValves a vložte konektory VacConnectors přímo do rozšíření luer. Vložte kolonky QIAamp Mini do konektorů VacConnectors, zavřete víčko kolonek a zapněte vakuum. Zkontrolujte, zda je dosaženo podtlaku. V případě potřeby ventily VacValves vyměňte. Připojení k vakuové pumpě je netěsné. Uzavřete všechna rozšíření luer krytkami luer a zapněte vakuovou pumpu. Zkontrolujte, zda je podtlak po zapnutí pumpy (a zavření ventilu Vacuum Regulator) stabilní. V případě potřeby vyměňte propojení mezi pumpou a vakuovým potrubím. Pokud podtlak stále není dosažen, vyměňte vakuovou pumpu za silnější.

Příloha A: Doporučení pro separaci a skladování krevní plazmy

Při stabilizaci zkumavek pro odběr krve (např. zkumavka PAXgene ccfDNA nebo zkumavka Streck Cell-Free DNA) postupujte podle pokynů výrobce pro separaci a skladování plazmy. Doporučujeme tyto podmínky skladování ověřit v kombinaci s vaší konkrétní navazující aplikací a cílem.

U nestabilizovaného BCT doporučujeme postupovat podle normy CEN/TS 16835-3:2015.

Při izolaci cirkulujících bezbuněčných nukleových kyselin z alikvotů krve doporučujeme postupovat podle tohoto protokolu, který zahrnuje krok odstředění s vysokou silou g, aby se odstranily buněčné zbytky, čímž se sníží množství buněčné nebo genomové DNA a RNA v alikvotu.

1. Umístěte celý vzorek krve v EDTA ve zkumavkách BD Vacutainer® (nebo v jiných primárních zkumavkách na krev obsahujících EDTA jako antikoagulant) do centrifugy chlazené na teplotu 4 °C, s výkyvným rotorem a příslušnými jamkami.
2. Alikvoty krve odstřeďujte 10 minut při 1 900x *g* (3 000 ot./min.) při teplotě 4 °C.
3. Opatrně nasajte plazmatický supernatant, aniž byste narušili vrstvu rozhraní plazma–buňka. Z jedné 10ml primární zkumavky na krev lze získat asi 4–5 ml plazmy.

   Poznámka: Plazma může být v této fázi použita pro cirkulaci nukleové kyseliny. Následující vysokorychlostní odstředění však odstraní další buněčné zbytky a kontaminaci cirkulujících nukleových kyselin genomovou DNA a RNA odvozenou z poškozených nukleovaných krvinek.
4. Odsátá plazma je přenesena do čisté centrifugační zkumavky.
5. Alikvoty plazmy odstřeďujte 10 minut při 16 000x *g* (v rotoru s pevným úhlem) při teplotě 4 °C.

   Tím se odstraní další buněčné nukleové kyseliny připojené k buněčnému zbytku.

6. Opatrně odeberte supernatant a přeneste jej do nové zkumavky, aniž byste narušili peletu.
7. Pokud bude plazma použita pro extrakci nukleových kyselin ve stejný den, skladujte ji při teplotě 2–8 °C až do dalšího zpracování. Pro delší skladování mohou být alikvoty plazmy ze stabilizovaných i nestabilizovaných zkumavek na odběr krve uchovávány při teplotě –20 °C (DNA jako cíl) nebo –80 °C (RNA jako cíl) po dobu nejméně 4 týdnů. Před použitím plazmy pro extrakci cirkulujících nukleových kyselin nechte zkumavky plazmy rozmrazit při pokojové teplotě.
8. **Volitelné**: Za účelem odstranění kryoprecipitátů odstřeďujte alikvoty plazmy po dobu 5 minut při 16 000x *g* (v rotoru s pevným úhlem).

   Volitelné: Přeneste supernatant do nové zkumavky a poté spusťte protokol extrakce cirkulující nukleové kyseliny.

Příloha B: Obecné pokyny pro manipulaci s RNA

Manipulace s RNA

Ribonukleázy (RNázy) jsou velmi stabilní a aktivní enzymy, které obecně nevyžadují ke své funkci přítomnost kofaktorů. RNázy je těžké inaktivovat a k degradaci RNA stačí již velmi malé množství, proto byste neměli používat žádné laboratorní pomůcky ze skla nebo umělé hmoty, které nebyly předtím zbaveny kontaminace RNázou. Během purifikace nukleových kyselin a po ní dbejte důsledně na to, aby se nedopatřením do alikvotů RNA nedostala žádná kontaminace RNázou. Pro vytvoření a udržení prostředí prostého RNáz se musejí uplatnit následující bezpečnostní opatření během předběžného zpracování a používání nádob a roztoků k jednorázovému a vícenásobnému použití při práci s RNA.

Obecné pokyny k manipulaci

Práce s RNA by měla vždy probíhat podle zásad řádné mikrobiologické a aseptické pracovní techniky. Ruce a prachové částice mohou přenášet bakterie a plísně a jsou to nejčastější zdroje kontaminace RNázou. Při manipulaci s reagenciemi a alikvoty RNA vždy noste latexové nebo vinylové rukavice, abyste zabránili kontaminaci RNázou z povrchu kůže nebo ze zaprášeného laboratorního vybavení. Jednorázové rukavice často vyměňujte a uzavírejte všechny zkumavky ihned po použití. Pokud chcete purifikovanou RNA pro následující aplikace rozpipetovat, ponechte ji na ledu.

Jednorázové plastové vybavení

Během tohoto postupu se doporučuje používat jednorázové sterilní polypropylenové zkumavky prosté RNáz.

Informace pro objednání

Výrobek	Obsah	Kat. č.
QIAamp DSP Circulating NA Kit (50)	Souprava pro přípravu 50 vzorků: Kolonky QIAamp Mini, nástavec na kolonky, konektory VacConnectors, proteáza K QIAGEN Proteinase K, reagencie, pufry a odběrové zkumavky	61504
Příslušenství		
QIAvac 24 Plus vacuum manifold*	Vakuové vedení pro zpracování kolon 1–24 Spin: Vakuové vedení QIAvac 24 Plus Vacuum manifold, luerové konektory a rychlospojky	19413
Vacuum Pump*	Univerzální vakuová pumpa	84010 [USA a Kanada] 84000 [Japonsko] 84020 [zbytek světa]
QIAvac Connecting System*	Systém pro připojení vakuového potrubí k vakuové pumpě: zahrnuje nosič, láhve na odpad, hadičky, spojky, ventil, měřidlo a 24 ventilů VacValves	19419

* Pro použití s vakuovými protokoly.

Aktuální licenční informace a odmítnutí odpovědnosti specifická pro výrobek jsou uvedeny v příručce pro sadu QIAGEN nebo uživatelské příručce. Příručky k soupravám QIAGEN a uživatelské příručky jsou k dispozici na stránkách **www.qiagen.com** nebo si je lze vyžádat od technických služeb společnosti QIAGEN nebo místního distributora.

Historie revizí příručky

Datum	Změny
R4 09/2019	Změna zamýšleného použití pouze na bezbuněčné nukleové kyseliny pouze z lidské plazmy. Zahrnutí protokolu „Breeze“. Nebyly zahrnuty žádné protokoly pro moč a miRNA. Aktualizace informací o bezpečnosti.

Omezené licenční ujednání pro sadu QIAamp DSP Circulating NA 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**. Některé z těchto doplňujících protokolů byly poskytnuty uživateli 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, přepracovávat ani opakovaně prodávat.

4. Společnost QIAGEN specificky odmítá jakékoliv 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 jakékoliv 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 a/nebo jejími součástmi.

Pro aktualizovaná licenční ustanovení viz **www.qiagen.com**.

Ochranné známky: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp® (QIAGEN Group); BD Vacutainer® (Becton, Dickinson and Company); Tween® (ICI Americas Inc.). Registrované názvy, ochranné známky atd. použité v tomto dokumentu, a to i v případě, že takto nejsou výslovně označeny, nejsou považovány za zákonem nechráněné.

1118364 10/2019 HB-0466-005 © 2019 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.