

Prosinec 2020

List protokolu QIAasymphony[®] SP

circDNA_2000_DSP_V2 a
circDNA_4000_DSP_V2

Tento dokument je protokol k soupravě QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit, verze 2, R1

Všeobecné informace

Pro diagnostiku in vitro.

Tento protokol je pro purifikaci lidské cirkulující bezbuněčné DNA z čerstvé nebo zmrazené lidské plazmy a moči s použitím přístroje QIASymphony SP a soupravy QIASymphony DSP Circulating DNA Kit.

Souprava	Souprava QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (kat. č. 937556)	
Materiál vzorku	Lidská plazma: Antikoagulovaná EDTA nebo citrátem nebo stabilizovaná ccfDNA Lidská moč: nestabilizovaná nebo stabilizovaná	
Název protokolu	circDNA_2000_DSP_V2	circDNA_4000_DSP_V2
Výchozí množina analytických kontrol	ACS_circDNA_2000_DSP_V2	ACS_circDNA_4000_DSP_V2
Eluční objem	60 µl	60 µl
Vyžadovaná verze softwaru	Verze 4.0 nebo vyšší	Verze 5.0 nebo vyšší

Zásuvka „Sample (Vzorek)“

Typ vzorku	Lidská plazma (viz „Příprava materiálu vzorků“) a Lidská moč (stabilizovaná nebo nestabilizovaná)
Objem vzorku	Závisí na typu použitých zkumavek na vzorky Další informace jsou uvedeny v seznamu laboratorního vybavení, který lze nalézt pod kartou zdroje na produktové stránce na adrese www.qiagen.com .
Zkumavky primárního vzorku	–
Zkumavky sekundárního vzorku	Další informace jsou uvedeny v seznamu laboratorního vybavení, který lze nalézt pod kartou zdroje na produktové stránce na adrese www.qiagen.com .
Vložky	–
Jiné	Proteinázu K je potřeba přidat do slotu A (pozice 1 a/nebo 2)

– = neuvedeno.

Příprava proteinázy K v zásuvce „Sample“ (Vzorek)

Sada QIASymphony DSP Circulating DNA Kit obsahuje roztok proteinázy K připravený k okamžitému použití, který lze uchovávat při pokojové teplotě (15–25 °C).

Poznámka: Zkumavky obsahující proteinázu K jsou umístěny v nosiči zkumavek. Zkumavky obsahující proteinázu K musí být umístěny na pozicích 1 a/nebo 2 ve slotu A zásuvky „Sample“ (Vzorek). Požadovaný typ zkumavky je uveden v seznamu laboratorního vybavení, který lze nalézt pod kartou zdroje na produktové stránce na adrese www.qiagen.com.

Počet vzorků*	circDNA_2000_DSP	circDNA_4000_DSP
8	1 980 µl	2 860 µl
24	3 740 µl	6 380 µl
48	6 380 µl	11 660 µl
72	9 020 µl	18 040 µl†
96	11 660 µl	23 320 µl†

* Pro každý vzorek je požadováno 110 µl pro circDNA_2000_DSP nebo 220 µl pro circDNA_4000_DSP a další prázdný objem 1 100 µl [(n x 110 nebo 220 µl) + 1 100 µl].

† Pro circDNA_4000_DSP: Jestliže zpracováváte více než 48 vzorků, použijte druhou zkumavku. Maximální plnicí objem jedné zkumavky je 11 660 µl. Pro druhou zkumavku je požadován další prázdný objem 1 100 µl.

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

Pozice A1 a/nebo A2	Kazeta s reagenty
Pozice B1	–
Držák se stojánkem pro špičky 1–18	Filtrační špičky k jednorázovému použití 200 µl nebo 1 500 µl
Držák jednotkové krabice 1–4	Jednotkové krabice obsahující kazety pro přípravu vzorků nebo 8-Rod Covers

– = neuváděno.

Zásuvka „Waste“ (Odpad)

Držák jednotkové krabice 1–4	Prázdné jednotkové krabice
Držák odpadních sáčků	Odpadní sáček
Držák nádoby na tekutý odpad	Prázdná lahev na kapalný odpad

Zásuvka „Eluate“ (Eluát)

Eluční stojánek (doporučuje se použít slot 1, chladičí pozici)	Další informace jsou uvedeny v seznamu laboratorního vybavení, který lze nalézt pod kartou zdroje na produktové stránce na adrese www.qiagen.com .
---	--

Požadované plastové vybavení

Protokol circDNA_2000_DSP

Plastové vybavení	Jedna šarže 24 vzorků*	Dvě šarže 48 vzorků*	Tři šarže 72 vzorků*	Čtyři šarže 96 vzorků*
Filtrační špičky k jednorázovému použití, 200 µl†	28	56	84	112
Filtrační špičky k jednorázovému použití, 1 500 µl†	56	112	168	224
Kazety pro přípravu vzorků§	15	30	45	60
8-Rod Covers¶	3	6	9	12

* Použití méně než 24 vzorků na šarži snižuje počet filtračních špiček k jednorázovému použití požadovaných na jeden cyklus.

† Ve stojánku na filtrační špičky je 32 filtračních špiček.

‡ Počet požadovaných filtračních špiček zahrnuje filtrační špičky pro 1 inventární sken na kazetu s reagenty.

§ V jednotkové krabici je 28 kazet pro přípravu vzorků.

¶ V jednotkové krabici je dvanáct 8-Rod Covers.

Protokol circDNA_4000_DSP

Plastové vybavení	Jedna šarže 24 vzorků*	Dvě šarže 48 vzorků*	Tři šarže 72 vzorků*	Čtyři šarže 96 vzorků*
Filtrační špičky k jednorázovému použití, 200 µl ^{†‡}	28	56	84	112
Filtrační špičky k jednorázovému použití, 1 500 µl ^{†‡}	96	192	288	384
Kazety pro přípravu vzorků [§]	18	36	54	72
8-Rod Covers [¶]	3	6	9	12

* Použití méně než 24 vzorků na šarži snižuje počet filtračních špiček k jednorázovému použití požadovaných na jeden cyklus.

[†] Ve stojánku na filtrační špičky je 32 filtračních špiček.

[‡] Počet požadovaných filtračních špiček zahrnuje filtrační špičky pro 1 inventární sken na kazetu s reagenty.

[§] V jednotkové krabici je 28 kazet pro přípravu vzorků.

[¶] V jednotkové krabici je dvanáct 8-Rod Covers.

Poznámka: Udávaný počet filtračních špiček se liší od počtu zobrazeného na dotykové obrazovce v závislosti na nastaveních. Doporučuje se naplnit maximální možný počet špiček.

Eluční objem

Zvolený eluční objem	Výchozí eluční objem
60 µl	75 µl

Eluční objem se vybírá na dotykové obrazovce. Průměrný dostupný eluční objem je ≥ 60 µl. V jednotlivých případech se může konečný eluční objem pro jednotlivé vzorky změnit až o 5 µl směrem dolů vůči zvolenému objemu (např. 55 µl). Doporučuje se zkontrolovat aktuální objem eluátu při používání systému automatického nastavení kvantitativní analýzy, který před přenosem neověřuje objem eluátu.

Uchovávání eluátů

Doporučuje se vyjmout destičku s eluáty ze zásuvky „Eluate“ (Eluát) ihned po skončení cyklu. Eluční destičky mohou být ponechány v přístroji QIASymphony SP po skončení běhu přes noc (maximálně 16 hodin, včetně doby běhu; doporučené podmínky prostředí: relativní vlhkost 18–26 °C a relativní vlhkost 20–75 %). V závislosti na teplotě a vlhkosti může docházet ke kondenzaci nebo vypařování eluátů.

Po přípravě vzorku mohou být eluáty uchovávány při teplotě 2–8 °C až po dobu až 1 měsíc. Pro dlouhodobé skladování mohou být eluáty uchovávány při teplotě –30 až –15 °C nebo –90 až –65 °C. Zmrazené eluates nesmí roztát více než 3krát.

Příprava materiálu vzorků

Při práci s chemikáliemi noste vždy laboratorní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Další informace si vyhledejte v příslušných bezpečnostních listech (BL) které obdržíte od dodavatele výrobku.

Důležité body, než začnete

- Zamezte vytvoření pěny na nebo ve vzorcích.
- Vzorky by měly být před začátkem protokolu ekvilibrovány na pokojovou teplotu (15–25 °C).

Lidská plazma

K přípravě plazmy lze použít vzorky krve upravené EDTA nebo citrátem jako antikoagulantem. Může být také použita plazma připravená z odběrových zkumavek s krví stabilizovanou ccfDNA. Plazma je generována dle specifikací výrobce.

Při použití EDTA nebo citrátu jako antikoagulantu se doporučuje neprodleně po darování krve provést separaci plazmy.

Mohou být nezbytné určité následné aplikace pro vyloučení nebo minimalizaci nukleových kyselin z vezikul. V takových případech se doporučuje provádět krok vysokorychlostní centrifugace při 16 000 x g po dobu 10 minut při pokojové teplotě (15–25 °C) po výchozím generování plazmy.

Po odběru a centrifugaci může být plazma uchovávána při pokojové teplotě až 7 dnů a při teplotě 2–8 °C až po dobu 14 dnů. Při delším skladování doporučujeme zmrazení alikvotních podílů na teplotu –20 °C nebo –80 °C. Zmrazená plazma nesmí roztát více než 3krát. Opakované zmrazování a roztátí vede k denaturaci a precipitaci proteinů, což může mít za následek snížené výtěžky cirkulujících bezbuněčných nukleových kyselin. Pokud jsou ve vzorcích viditelné kryoprecipitáty, centrifugujte při 6 800 x g 3 minuty při pokojové teplotě (15–25 °C) a přeneste supernatanty do sekundární zkumavky na vzorek, aniž byste narušili destičky (viz seznam laboratorního vybavení, který lze nalézt pod kartou zdroje na produktové stránce na adrese www.qiagen.com). Ihned zahajte purifikační postup.

Lidská moč

Vzhledem k rychlé degradaci cirkulující DNA po odběru moči se důrazně doporučuje vzorky moči okamžitě stabilizovat.

Stabilizovaná lidská moč

Stabilizovaná moč může být skladována při pokojové teplotě (15–25 °C) nebo při teplotě 2–8 °C až po dobu 7 dní. Při delším skladování doporučujeme zmrazení alikvotních podílů na teplotu –30 až –15 °C nebo –90 až –65 °C.

Stabilizované vzorky moči nevyžadují předběžnou úpravu vzorku. Po stabilizaci se doporučuje centrifugovat vzorky moči při nízké rychlosti (při 1 900 x g) 10 minut při pokojové teplotě (15–25 °C) pro odstranění buněk před extrakcí cirkulující bezbuněčné DNA. Pokud jsou po centrifugaci v supernatantech viditelné precipitáty, zahřívejte vzorky na 25 °C ve vodní lázni k rozpuštění precipitátů. Před spuštěním běhu přeneste vzorky stabilizované moči do sekundární zkumavky na vzorek a pak naplňte tuto zkumavku stojanu na vzorky (viz seznam laboratorního vybavení, který lze nalézt pod kartou zdroje na produktové stránce na adrese www.qiagen.com).

Lidská moč „nestabilizovaná“

Před zahájením protokolu, který vyžaduje Buffer ATL, zkontrolujte, zda se v pufru Buffer ATL vytvořil precipitát. V případě potřeby rozpustěte při zahřívání na 70 °C s šetrným mícháním ve vodní lázni. Odsajte bubliny z povrchu Buffer ATL.

Poznámka: Buffer ATL (Buffer ATL, 4 x 50 ml, kat. č. 939016) není součástí sady QIASymphony DSP Circulating DNA Kit a je nutno je objednat samostatně.

Doporučuje se centrifugovat vzorek moči okamžitě po odběru při nízké rychlosti (při 1 900 x g) 10 minut při pokojové teplotě (15–25 °C) pro odstranění buněk. Nestabilizované vzorky moči vyžadují předběžnou úpravu vzorku.

Důležité: Před zahájením předběžné úpravy vytemperujte vzorky na pokojovou teplotu (15–25 °C).

Důležité: Centrifugaci a předběžnou úpravu je třeba provést do 4 hodin od odběru vzorku moči.

- Smíchejte 2 500 µl moči (circDNA_2000_DSP) nebo 4 500 µl moči (circDNA_4000_DSP) s 250 µl nebo 450 µl pufru Buffer ATL.
- Inkubujte vzorky při pokojové teplotě (15–25 °C) 1 hodinu.
- Centrifugujte vzorky při 1 900 x g 10 minut při pokojové teplotě (15–25 °C).
Pokud jsou po centrifugaci v supernatantu viditelné precipitáty, zahřívejte vzorky na 25 °C ve vodní lázni k rozpuštění precipitátů.
- Přeneste supernatanty do sekundární zkumavky na vzorek a pak naplňte tuto zkumavku stojanu na vzorky (viz seznam laboratorního vybavení, který lze nalézt pod kartou zdroje na produktové stránce na adrese www.qiagen.com)

Důležité: Stabilita a integrita cirkulující bezbuněčné DNA je v nestabilizované moči omezená. Doporučuje se naplnit maximálně jednu šarži obsahující 24 vzorků na jeden běh QIASymphony pro minimalizaci času vzorků moči v přístroji.

Interferující látky

Vzorky plazmy s vysokými koncentracemi gamaglobulinu (>30 g/l) mohou vést ke sníženému zachytu cirkulující bezbuněčné DNA.

Historie revizí

Datum	Změny
Verze 2, R1 prosinec 2020	První vydání.

Aktuální licenční informace a odmítnutí odpovědnosti specifické pro výrobek jsou uvedeny v příručce pro soupravu 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.

Ochranné známky: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony® (skupina QIAGEN). Registrované názvy, ochranné známky atd. použité v tomto dokumentu, i když takto nejsou konkrétně označeny, nesmějí být považovány za nechráněné zákonem.

12/2020 HB-2309-S02-001 © 2020 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.

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