

Декември 2017 г.

Протоколен лист за QIAasymphony[®] SP

Протокол Complex800_OBL_V4_DSP

Този документ представлява *лист от протокола Complex800_OBL_V4_DSP* за QIAasymphony SP, R2, за QIAasymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit, версия 1.

Обща информация

QIASymphony DSP Virus/Pathogen Kit е предназначен за in vitro диагностика.

Комплект	QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit
Материал за проби	Респираторни и урогенитални проби
Име на протокола	Complex800_OBL_V4_DSP
Набор тестови контроли по подразбиране	ACS_Complex800_OBL_V4_DSP
Възможност за избор	Обем за елуиране: 60 µl, 85 µl, 110 µl
Необходима версия на софтуера	Версия 4.0 или по-нова

Чекмедже „Sample“ (Проба)

Тип на пробата	Респираторни проби (BAL, изсушени тампони, транспортни среди, аспирати, слюнка) и урогенитални проби (урина, транспортни среди)
Обем на пробата	Зависи от типа на използваната епруветка за проби; за повече информация вижте www.qiagen.com/goto/dsphandbooks
Първични епруветки за проби	За повече информация вижте www.qiagen.com/goto/dsphandbooks
Вторични епруветки за проби	За повече информация вижте www.qiagen.com/goto/dsphandbooks
Вложки	Зависи от типа на използваната епруветка за проби; за повече информация вижте www.qiagen.com/goto/dsphandbooks
Друго	Необходима е смес от носител за РНК и Buffer AVE; използването на вътрешна контрола е по избор

Чекмедже „Reagents and Consumables“ (Реагенти и консумативи)

Положение A1 и/или A2	Касети за реагенти (Reagent cartridge, RC)
Положение B1	неприложимо
Държач за стелажи за крайници 1 –17	Филтриращи крайници за еднократна употреба, 200 µl
Държач за стелажи за крайници 1 –17	Филтриращи крайници за еднократна употреба, 1500 µl
Държач за секционни кутии 1 – 4	Секционни кутии, съдържащи касети за приготвяне на проби
Държач за секционни кутии 1 – 4	Секционни кутии, съдържащи 8-прътни калъфи

n/a = неприложимо.

Чекмедже „Waste“ (Отпадъци)

Държач за секционни кутии 1 – 4	Празни секционни кутии
Държач на торбата за отпадъци	Торба за отпадъци
Държач на бутилката за течни отпадъци	Бутилка за течни отпадъци

Чекмедже „Eluate“ (Елуат)

Стелаж за елуиране (препоръчваме да използвате гнездо 1, охлаждащо положение)

За повече информация вижте www.qiagen.com/goto/dsphandbooks

Необходими пластмасови елементи

	Една партида, 24 проби*	Две партии, 48 проби*	Три партии, 72 проби*	Четири партии, 96 проби*
Филтриращи накрайници за еднократна употреба, 200 µl ^{†‡}	96	96	128	128
Филтриращи накрайници за еднократна употреба, 1500 µl ^{†‡}	128	192	224	288
Касети за приготвяне на проби [§]	18	36	54	72
8-прътни калъфи [¶]	3	6	9	12

* Извършването на повече от едно сканиране на наличностите изисква допълнителни филтриращи накрайници за еднократна употреба. Използването на по-малко от 24 проби на партида намалява броя накрайници за еднократна употреба, необходим за цикъла.

[†] В един стелаж за накрайници има 32 филтриращи накрайника.

[‡] Броят необходими филтриращи накрайници е за 1 сканиране на наличностите в касети за реагенти.

[§] В една секционна кутия има 28 касети за приготвяне на проби.

[¶] В една секционна кутия има дванадесет 8-прътни калъфа.

Забележка: Посоченият брой филтриращи накрайници може да е различен от количеството, показано на сензорния екран, в зависимост от настройките – например брой вътрешни контроли, използвани за една партида.

Избран обем за елуиране

Избран обем за елуиране (µl)*	Първоначален обем за елуиране (µl) [†]
60	90
85	115
110	140

* Обемът за елуиране, избран в сензорния екран. Това е минималният достъпен обем елуат в епруветката за окончателно елуиране.

[†] Първоначалният обем на разтвора за елуиране, който е необходим, за да се гарантира, че действителният обем елуат е същият като избрания обем.

Приготвяне на вътрешна контрола – смес от носител за РНК (НОСИТЕЛ) и Buffer AVE (AVE)

Избран обем за елуиране (µl)	Обем на готовия носител за РНК (НОСИТЕЛ) (µl)	Обем на вътрешната контрола (µl)*	Обем на Buffer AVE (AVE) (µl)	Окончателен обем на проба (µl)
60	3	9	108	120
85	3	11,5	105,5	120
110	3	14	103	120

* Изчислението на количеството вътрешна контрола се базира на първоначалните обеми за елуиране. Допълнителният свободен обем зависи от типа на използваната епруветка за проби; за повече информация вижте www.qiagen.com/goto/dsphandbooks.

Забележка: Показаните в таблицата стойности за са приготвяне на вътрешна контрола – смес от носител за РНК (НОСИТЕЛ) за низходящ тест, който изисква 0,1 µl вътрешна контрола/µl елуат.

Външно лизиране

Когато работите с химикали, винаги носете подходящо лабораторно облекло, ръкавици за еднократна употреба и предпазни средства за очите. За повече информация вижте съответните информационни листове за безопасност на материалите (material safety data sheets, MSDS), предлагани от доставчика на продукта.

Протоколите Complex на QIASymphony се състоят от 4 стъпки: лизиране, свързване, промиване и елуиране. За някои проби е полезно да извършвате лизирането ръчно – например за инактивиране на патогените в шкаф за биологична безопасност. Протоколът Complex800_OBL_V4_DSP позволява извършване на ръчно лизиране по подобен начин като за протокола Complex800_V6_DSP. Предварително третираните проби се прехвърлят в QIASymphony SP и се обработват с протокола Complex800_OBL_V4_DSP.

Забележка: Протоколът Complex800_OBL_V4_DSP изисква Buffer ACL и Buffer ATL (ATL). Buffer ACL (кат. № 939017) и Buffer ATL (ATL) (кат. № 939016) не са част от QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit и трябва да бъдат поръчани отделно.

Ръчно лизиране

1. Пипетирайте 80 µl протеиназа K, 295 µl Buffer ATL (ATL), 120 µl смес за вътрешна контрола Carrier RNA и 560 µl Buffer ACL в епруветка 4,5 ml (Nunc CryoTube 12,5 x 92 mm, полипропиленова епруветка 4,5 ml, кат. № на Nunc 363452).

Забележка: Когато ще се обработва повече от една проба чрез ръчно лизиране, може да се приготви такъв готов разтвор. Трябва само да умножите обемите, необходими за една проба, по общия брой проби, които ще се обработват, и да включите допълнителен обем, еквивалентен на 2 допълнителни проби. Обърнете епруветката няколко пъти, за да се разбърка, прехвърлете 1055 µl от всяка епруветка в епруветка 4,5 ml и след това за всяка епруветка продължете със стъпка 4.

2. Затворете капака и разбъркайте, като обърнете епруветката 5 пъти.
3. Центрофугирайте кратко епруветката, за да премахнете капките от вътрешността на капака.
4. Добавете 800 µl проба в епруветката, затворете капака и разбъркайте чрез импулсен вортекс за 10 секунди.
5. Инкубирайте епруветката при 68° C за 15 минути (±1 минута).
6. Центрофугирайте кратко епруветката, за да премахнете капките от вътрешността на капака. Поставете вложките на съответните епруветки за проби в носач за епруветки и заредете епруветките за проби (без капаци).

Приготвяне на материал за проби

Урина

Урината може да се обработва без по-нататъшно предварително третиране. Системата е оптимизирана за чисти проби от урина, които не съдържат консерванти. За увеличаване на чувствителността към бактериални патогени пробите може да се центрофугират. След изхвърляне на супернатанта пелетата може да се ресуспендира в поне 800 µl Buffer ATL (ATL) (кат. № 939016). Използвайте 800 µl от предварително третиран материал като проба за подготовка на външното лизиране.

Изолиране на геномна ДНК от грам-положителни бактерии

Пречиштането на ДНК може да се подобри за някои грам-положителни бактерии чрез предварително третиране с ензими преди прехвърляне на пробата в QIAasymphony SP и стартиране на протокола Complex800_OBL_V4_DSP.

1. Пелетирайте бактериите чрез центрофугиране при 5000 x g за 10 минути.
2. Суспендирайте бактериалната пелета в 800 µl подходящ ензимен разтвор (20 mg/ml lysozyme или 200 µg/ml lysostaphin; 20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 2 mM EDTA; 1,2% Triton X--100).
3. Инкубирайте при 37° C поне 30 минути (± 2 минути).
4. Центрофугирайте кратко епруветката, за да премахнете капките от вътрешността на капака.
5. Използвайте 800 µl от предварително третирания материал като проба за подготовка на външното лизиране.

Вискозни или мукозни проби

Възможно е някои проби (напр. слюнка, респираторни аспирати) да са вискозни и да изискват втечняване, което да позволи пипетирането им. Слабо вискозните проби не налагат допълнителна подготовка. Средно до силно вискозните проби трябва да се подготвят по следния начин:

1. Разтворете пробата 1:1 със Sputasol*† (Oxoid, кат. № SR0233) или 0,3% (w/v) DTT.
Забележка: Разтворът 0,3% DTT може да се приготви предварително и да се съхранява на подходящи аликвоти при -20 °C. След употреба изхвърляйте размразените аликвоти.
2. Инкубирайте при 37° C, докато вискозитетът на пробите стане подходящ за пипетиране.
3. Използвайте 800 µl от предварително третирания материал като проба за подготовка на външното лизиране.

Изушена телесна течност и тампони със секрет

1. Потопете върха на изсушения тампон в 1050 µl Buffer ATL (ATL) (кат. № 939016) и инкубирайте при 56° C за 15 минути (± 1 минута) с непрекъснато разбъркване. Ако не е възможно разбъркване, обработете с вортекс преди и след инкубирането в продължение на поне 10 секунди.
2. Извадете тампона и изстискайте цялата течност, като го притиснете към вътрешността на епруветката.

* Sputasol (Oxoid, кат. № SR0233, www.oxoid.com) или дитиотрейтол (DTT).

† Списъкът на доставчиците не е пълен.

3. Използвайте 800 µl от предварително третирания материал като проба за подготовка на външното лизиране.

Забележка: Този протокол е оптимизиран за памучни или полиетиленови тампони. Когато използвате други тампони, може да е необходимо да коригирате обема на Buffer ATL (ATL), за да осигурите наличие на поне 800 µl материал за проби.

Респираторни или урогенитални тампони

Средата за съхранение на респираторни или урогенитални тампони може да се използва без предварително третиране. Ако тампонът не е изваден, притиснете го към стената на епруветката, за да изстискате течността. На този етап трябва да отстраните от пробата излишната слуз, като я съберете по тампона. След това трябва да изстискате остатъчната течност от слузта и тампона, като притиснете тампона към стената на епруветката. Накрая тампонът и слузта трябва да се извадят и изхвърлят. Ако пробите са вискозни, изпълнете стъпката за втечняване (вижте „Вискозни или мукозни проби“ по-горе), преди да прехвърлите пробата в QIASymphony SP. Ако няма достатъчно начален материал, пипетирайте Buffer ATL (ATL) в транспортната среда, за да коригирате необходимия минимален начален обем, и обработете пробата с вортекс за 15 – 30 секунди в епруветката (ако тампонът е в транспортната среда, изпълнете тази стъпка, преди да го извадите). Използвайте 800 µl от материала като проба за подготовка на външното лизиране.

История на редакциите

История на редакциите на документа	
R2 12/2017	Актуализация за QIASymphony, версия на софтуера 5.0

За актуална информация относно лицензирането и конкретните за продуктите правни бележки вижте ръководството или наръчника за потребителя на набора QIAGEN®. Ръководствата и наръчниците за потребителя на комплектите QIAGEN са достъпни на адрес www.qiagen.com или могат да бъдат заявени от отдела за техническо обслужване на QIAGEN или местния ви дистрибутор.

Търговски марки: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony® (QIAGEN Group). Регистрираните имена, търговските марки и т.н., използвани в този документ, дори ако не са изрично обозначени като такива, не се считат за незащитени от закона. 12/2017 HB-0301-S31-002 © 2017 QIAGEN, всички права запазени.

Поръчване www.qiagen.com/shop | Техническа поддръжка support.qiagen.com | Уебсайт www.qiagen.com