

September 2019

# QIAamp<sup>®</sup> DSP Circulating NA Kit Bruksanvisning (Handbok)

Version 1



50

IVD

CE

REF

61504



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden

R4 MAT

1118364SV

Sample to Insight



# Innehåll

Avsedd användning .....	4
Sammanfattning och förklaring .....	4
Användningsprinciper .....	5
Provvolymer .....	5
Lyseringsprov .....	7
Adsorption av QIAamp Mini-kolonnmembranet .....	7
Avlägsnande av restkontaminanter .....	7
Eluering av rena nukleinsyror .....	8
Utbyte och storlek på nukleinsyror .....	8
Beskrivning av protokoll .....	9
Material som medföljer .....	10
Kitinnehåll .....	10
Material som behövs men inte medföljer .....	11
Varningar och försiktighet .....	12
Förvaring och hantering av reagenser .....	15
Förvaring och hantering av prover .....	16
Förfarande .....	17
Förberedning av buffertar och reagenser .....	24
Breeze-protokoll: Rening av cirkulerande nukleinsyror från 1–5 ml humanblodplasma .....	27
Klassiskt protokoll: Rening av cirkulerande nukleinsyror från 1–5 ml humanblodplasma ....	32
Kvalitetskontroll .....	37
Begränsningar .....	37

---

Symboler .....	38
Referenser.....	40
Kontaktinformation.....	40
Felsökningshandbok.....	41
Bilaga A: Rekommendation för separation och förvaring av blodplasma .....	43
Bilaga B: Allmänna hänvisningar angående RNA-hantering .....	45
Beställningsinformation.....	46
Dokumentrevisioner.....	47

# Avsedd användning

QIAamp DSP Circulating NA Kit är ett system som använder kiselmembranteknik (QIAamp-teknik) för isolering och rening av cirkulerande cellfritt DNA och RNA från plasmaprover från humanblod.

Produkten är avsedd att användas av yrkesanvändare, såsom tekniker och läkare som är utbildade i molekylärbiologiska metoder.

QIAamp DSP Circulating NA Kit är avsett för in vitro-diagnostisk användning.

## Sammanfattning och förklaring

Fritt cirkulerande nukleinsyror förekommer vanligtvis i humanplasma som korta fragment, < 1000 bp (DNA), < 1000 nt (RNA), eller så små som 20 nt (miRNA:er). Koncentrationen av fritt cirkulerande nukleinsyror i humanblodplasma är vanligtvis låg och varierar avsevärt mellan 1–100 ng/ml i humanprover från olika individer (1–5).

QIAamp DSP Circulating NA Kit möjliggör effektiv rening av cirkulerande nukleinsyror från humanplasma. Proverna kan vara antingen frysta eller färska. Förlängningsslangar och vakuumbearbetning på QIAvac 24 Plus möjliggör startprovolymer på upp till 5 ml och flexibla elueringsolymer mellan 20–150 µl möjliggör koncentrationer av nukleinsyretyper som förekommer i låga koncentrationer.

Eluerat fritt cirkulerande DNA eller RNA är redo för användning i nedströmstillämpningar eller för förvaring. QIAamp DSP Circulating NA Kit ger effektiv borttagning av protein, nukleaser och andra föroreningar.

---

# Användningsprinciper

QIAamp DSP Circulating NA-proceduren består av 4 steg (lysering, bindning, tvätt och eluering) och utförs med QIAamp Mini-kolonner på QIAvac-systemet. Den robusta proceduren bidrar till att minska korskontamination mellan prover och öka användarsäkerheten vid hantering av potentiellt smittsamma prover.

Denna enkla procedur är lämplig för samtidig bearbetning av upp till 24 prover på mindre än 2 timmar.

## Provvolymer

QIAamp Mini-kolonner binder fragmenterade nukleinsyror som är så korta som 20 nt, men utbytet beror på provvolymen och koncentrationen av cirkulerande nukleinsyror i provet (vanligtvis 1–100 ng/ml i plasma). QIAamp DSP Circulating NA-proceduren har optimerats för provvolymen på upp till 5 ml.

## Procedur för QIAamp DSP Circulating NA Kit

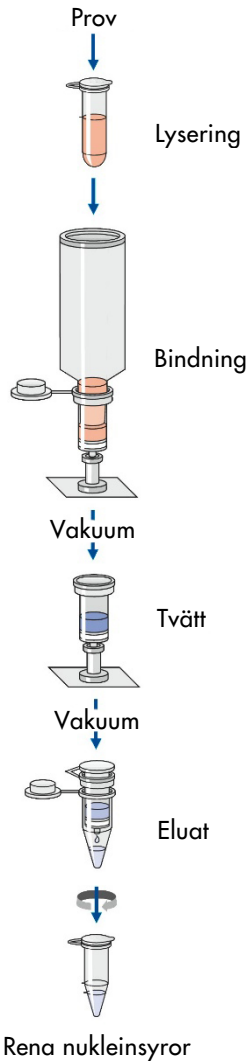


Bild 1. Översikt över procedur för QIAamp DSP Circulating NA Kit

---

## Lyseringsprov

Fritt cirkulerande nukleinsyror i biologiska vätskor binds vanligtvis till protein eller kapslas in i vesiklar, vilket kräver ett effektivt lyseringssteg för att frigöra nukleinsyror så att de kan bindas selektivt till QIAamp Mini-kolonnen. Därför lyseras prover under högdenaturerande förhållanden vid förhöjda temperaturer tillsammans med proteinas K och Buffer ACL, vilket säkerställer inaktiveringen av DNaser och RNaser samt frigör nukleinsyror från bundna proteiner, fetter och vesiklar.

## Adsorption av QIAamp Mini-kolonnmembranet

För att tillåta optimal bindning av de cirkulerande nukleinsyror till membranet justeras bindningsförutsättningarna genom att Buffer ACB tillsätts till lysatet. Lysatet överförs därefter till en QIAamp Mini-kolonn och cirkulerande nukleinsyror adsorberas från en stor volym till kiseldioxidmembranet när lysatet dras igenom detta med hjälp av vakuumtryck. Salt- och pH-förhållandena säkerställer att majoriteten av protein och andra kontaminanter som kan försämra PCR och andra enzymatiska nedströmsreaktioner inte fastnar på QIAamp Mini-kolonnmembranet.

Ett vakuumgrenrör (t.ex. QIAvac 24 Plus med QIAvac Connecting System) och en vakuumpump som kan skapa ett vakuum på ~800–900 mbar (t.ex. QIAGEN® Vacuum Pump) krävs för protokollet. En Vacuum Regulator bör användas (del av QIAvac Connecting System) för enkel övervakning av vakuumtrycket och ett lämpligt vakuumutsläpp.

## Avlägsnande av restkontaminanter

Nukleinsyror förblir bundna till membranet medan kontaminanterna effektivt tvättas bort under 3 tvättsteg.

## Eluering av rena nukleinsyror

Eluering sker med användning av Buffer AVE. I ett och samma steg elueras högrenade nukleinsyror i Buffer AVE som ekvilibrerats till rumstemperatur. En flexibel eluering volym på 50–150 µl kan tillämpas. Om högre koncentrationer av nukleinsyror krävs kan eluering volymen minskas ner till 20 µl. Eluering volymer under 50 µl leder till mer koncentrerade eluat av nukleinsyror, men kan leda till lägre totalt utbyte.

Den erhållna eluat volymen kan vara upp till 5 µl mindre än den volym eluering buffert som tillsattes till kolonnen.

## Utbyte och storlek på nukleinsyror

Utbytet av fritt cirkulerande nukleinsyror som isoleras från biologiska prover är vanligtvis lägre än 1 µg och är därför svårt att bestämma med en spektrofotometer. Det totala utbytet cirkulerande DNA och RNA som kan erhållas från ett prov med QIAamp DSP Circulating NA Kit varierar mellan prover från olika individer och beror också på andra faktorer (t.ex. vissa sjukdomstillstånd). Dessutom är det sannolikt att förekomsten av bärar-RNA i de utvunna nukleinsyrorna dominerar UV-absorptionsresultaten (se sidan 25). Kvantitativa förstärkningsmetoder rekommenderas för att fastställa utbytet.

Storleksdistributionen av cirkulerande nukleinsyror som renas med QIAamp DSP Circulating NA Kit kan kontrolleras med agarosgelelektrofores eller hybridisering till en målspecifik märkt prob<sup>5</sup> eller en lösning för mikrofluidikelektrofores (t.ex. Agilent Bioanalyzer).



---

## Beskrivning av protokoll

Två olika protokoll tillhandahålls i den här handboken.

“Breeze-protokoll: Rening av cirkulerande nukleinsyror från 1–5 ml humanblodplasma” (sidan 27) används för att bearbeta upp till 5 ml plasma i steg om 1 ml och har optimerats för minimal manuell insats och kort omsättningstid.

“Klassiskt protokoll: Rening av cirkulerande nukleinsyror från 1–5 ml humanblodplasma” (sidan 32) används för att bearbeta upp till 5 ml plasma i steg om 1 ml och utgör det oförändrade protokollet för version 3 (R3) av handboken för QIAamp DSP Circulating NA Kit.

# Material som medföljer

## Kitinnehåll

QIAamp DSP Circulating NA Kit			(50)
Katalognr.			61504
Antal beredningar			50
QIAamp Mini	QIAamp Mini columns with Wash Tubes (QIAamp Mini-kolonner med tvättrör) (WT) (2 ml)	<b>COL</b>	50
EXT	Column Extenders (Kolonnförlängare) (20 ml)	<b>COL EXT</b>	2 x 25
WT	Wash Tubes (Tvättrör) (2 ml)	<b>WASH TUBE</b>	50
ET	Elution Tubes (Elueringsrör) (1,5 ml)	<b>ELU TUBE</b>	50
VC	VacConnectors (Vakuumslutningar)	<b>VAC CON</b>	50
ACL*	Lysis Buffer* (Lyseringsbuffert)	<b>LYS BUF</b>	220 ml
ACB*	Binding Buffer* (Bindningsbuffert) (koncentrat)	<b>BIND BUF CONC</b>	300 ml
ACW1*	Wash Buffer 1* (Tvättbuffert 1) (koncentrat)	<b>WASH BUF 1 CONC</b>	19 ml
ACW2†	Wash Buffer 2† (Tvättbuffert 2) (koncentrat)	<b>WASH BUF 2 CONC</b>	13 ml
AVE†	Elution Buffer† (Elueringsbuffert) (lila lock)	<b>ELU BUF</b>	5 x 2 ml
PROTK	QIAGEN Proteinase K (Proteinas K)	<b>PROTK</b>	4 x 7 ml
Bärare	Carrier-RNA (Bärr-RNA) (röda lock)	<b>CAR RNA</b>	310 µg
	Handbok	<b>H B</b>	1

\* Innehåller kaotropiskt salt. Sidan 12 innehåller Varningar och försiktighet.

† Innehåller natriumazid som konserveringsmedel.

# Material som behövs men inte medföljer

Använd alltid lämplig laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (Safety Data Sheets, SDS) som kan erhållas från respektive tillverkare.

Kontrollera att instrumenten har kontrollerats och kalibrerats enligt tillverkarens instruktioner.

För alla protokoll

- Pipetter (justerbara)
- Sterila pipettspetsar (pipettspetsar med aerosolbarriärer rekommenderas för att förebygga korskontamination)
- Vattenbad eller värmeblock med kapacitet för 50 ml-centrifugrör vid 56 °C eller 60 °C\*
- Värmeblock eller liknande med kapacitet för 2 ml tvättrör vid 56 °C (endast för klassiskt protokoll)\*
- Mikrocentrifug (med rotor för 2 ml provrör)\*
- 50 ml centrifugrör
- QIAvac 24 Plus Vacuum Manifold (vakuumbgrenrör) (katalognr 19413)
- QIAvac Connecting System (katalognr 19419) eller motsvarande
- Vacuum Pump (katalognr 84010 [USA och Kanada], 84000 [Japan] eller 84020 [övriga världen]) eller motsvarande pump som kan skapa ett vakuum på -800 till -900 mbar
- Etanol (96-100 %)<sup>†</sup>
- Isopropanol (100 %)
- Krossad is (endast för "Klassiskt protokoll: Rening av cirkulerande nukleinsyror från 1–5 ml humanblodplasma").
- Vissa prover kan behöva spädas med fosfatbuffrad saltlösning (phosphate-buffered saline, PBS)
- Valfritt: VacValves (katalognr 19408)


\* Säkerställ att instrumenten har kontrollerats och kalibrerats enligt tillverkarens rekommendationer.

<sup>†</sup> Använd inte denaturerad alkohol som innehåller andra substanser, såsom metanol eller metyletylketon.

# Varningar och försiktighet

För in vitro-diagnostisk användning

Använd alltid lämplig laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (Safety Data Sheets, SDS). De finns tillgängliga på webben i behändigt PDF-format på adressen [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), där du kan hitta, visa och skriva ut säkerhetsdatablad för varje QIAGEN-kit och kitkomponent.

<b>VARNING</b>	Risk för personskada
	Tillsätt <b>ALDRIG</b> blekmedel eller sura lösningar direkt till provavfallet.

Buffer ACL, Buffer ACB och Buffer ACW1 innehåller guanidinsalter, vilka kan bilda starkt reaktiva sammansättningar 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.

Följande risk- och skyddsmeddelanden gäller för komponenterna i QIAamp DSP Circulating NA Kit.

## Buffer ACB



Innehåller: guanidinisotiocyanat. Fara! Farligt vid förtäring. Kan vara skadligt vid hudkontakt eller inandning. Orsakar allvarliga frätskador på hud och ögon. Skadliga långtidseffekter för vattenlevande organismer. Utvecklar mycket giftig gas vid kontakt med syra. Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd. VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt att göra. Fortsätt att skölja. Kontakta genast GIFTINFORMATIONSCENTRAL eller läkare.

## Buffer ACL



Innehåller: guanidinisotiocyanat. Fara! Farligt vid förtäring. Kan vara skadligt vid hudkontakt eller inandning. Orsakar allvarliga frätskador på hud och ögon. Skadliga långtidseffekter för vattenlevande organismer. Utvecklar mycket giftig gas vid kontakt med syra. Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd. VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt att göra. Fortsätt att skölja. Kontakta genast GIFTINFORMATIONSCENTRAL eller läkare.

## Buffer ACW1



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

## Proteinas K



Innehåller: Proteinas K. Fara! Orsakar lindrig hudirritation. Kan orsaka allergi- eller astmasymptom eller andningssvårigheter vid inandning. Andas inte in damm/rök/gaser/dimma/ångor/sprej. Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd. Använd andningsskydd. Vid exponering eller misstanke om exponering: Kontakta GIFTINFORMATIONSCENTRAL eller läkare. Flytta personen till frisk luft och se till att han eller hon vilar i en ställning som underlättar andningen.

---

## Förvaring och hantering av reagenser

QIAamp Mini-kolonner ska förvaras torrt i 2–8 °C. Alla buffertar ska förvaras i rumstemperatur (15–25 °C). QIAamp Mini-kolonner och -buffertar kan förvaras under dessa förutsättningar fram till förpackningens utgångsdatum utan försämrad funktion.

Frystorkat bärar-RNA kan förvaras i rumstemperatur (15–25 °C) fram till det utgångsdatum som står angivet på komponentens etikett. Bärar-RNA ska lösas i Buffer AVE. Upplöst RNA bör tillsättas omedelbart till Buffer ACL enligt beskrivningen på sidan 28 för Breeze-protokollet och på sidan 33 för det klassiska protokollet. Denna lösning ska beredas färsk och är hållbar vid 2–8 °C i upp till 48 timmar. Oanvända delar av bärar-RNA upplöst i Buffer AVE ska frysas i alikvoter vid –30 till –15 °C.

QIAamp DSP Circulating NA Kit innehåller proteinas K som är redo för användning och som löses i en särskilt formulerad förvarningsbuffert. Protein K är stabilt fram till utgångsdatumet på komponentetiketten när det förvaras i rumstemperatur (15–25 °C).

# Förvaring och hantering av prover

## Förvaring och hantering av blod

För att undvika nedbrytning av cellfria nukleinsyror och att cellnukleinsyror frigörs, rekommenderar vi att helblod förvaras i högst 6 timmar vid 2–8 °C (t.ex. EDTA-prover). Om du använder stabiliserade blodprovtagningsrör bör du följa tillverkarens förvaringsvillkor. Vi rekommenderar att du validerar dessa förvaringsvillkor tillsammans med din specifika nedströmstillämpning och mål.

## Förvaring och hantering av plasma

Vi rekommenderar att separationen av plasma och isoleringen av nukleinsyror utförs omedelbart efter bloddonationen när du använder EDTA som antikoagulant, särskilt för RNA. Vid kort förvaring kan plasma lagras i upp till 24 timmar i 2–8 °C.

För längre förvaring kan plasmaaliquoter från stabiliserade såväl som icke-stabiliserade blodprovtagningsrör förvaras i –20 °C (endast för DNA som mål) eller –80 °C (DNA och RNA som mål) i minst 4 veckor.

## Förvaring av eluerade nukleinsyror

Eluerade nukleinsyror samlas upp i 1,5 ml elueringsrör (medföljer). De renade cirkulerande nukleinsyror kan förvaras i upp till 24 timmar i 2–8 °C. För längre förvaring än 24 timmar rekommenderas förvaring i –30 till –15 °C för DNA och –90 till –60 °C för RNA-nedströmstillämpningar.



# Förfarande

Viktigt att tänka på före start

## QIAvac 24 Plus

QIAvac 24 Plus har utformats för snabb och effektiv vakuumbearbetning av upp till 24 parallella QIAGEN-spinnkolonner. Prov- och tvättlösningar hämtas genom kolonmembranen med hjälp av vakuum istället för centrifugering, vilket ökar hastigheten och minskar operatörens arbete med reningsprocedurerna.

Tillsammans med QIAvac Connecting System kan QIAvac 24 Plus användas som ett genomflödningsystem. Provfiltratet samlas upp i en separat avfallsflaska.

Se hanteringsriktlinjerna i *handboken för QIAvac 24 Plus* för information om underhåll av QIAvac 24 Plus.

## Bearbeta QIAamp Mini-kolonner i QIAvac 24 Plus

QIAamp Mini-kolonner bearbetas i QIAvac 24 Plus med VacConnectors för engångsbruk och VacValves för flergångsbruk. VacValves (tillval) sätts in direkt i QIAvac 24 Plus-grenrörets luerfack, vilket ger en stadig flödes hastighet som möjliggör parallellbearbetning av olika provvolymmer. De bör användas för att säkerställa ett konsekvent vakuum om provflödes hastigheterna avviker avsevärt från varandra. VacConnectors är engångskopplingar som passar mellan QIAamp Mini-kolonner och VacValves eller mellan QIAamp Mini-kolonner och luerfacken på QIAvac 24 Plus. De förhindrar direkt kontakt mellan spinnkolonnen och VacValve under reningen, vilket förebygger korskontamination mellan proverna. VacConnectors kasseras efter en användning. På grund av de stora lösningsvolymmer som används krävs QIAvac Connecting System (eller en liknande lösning med avfallsflaskor) (se Bild 2).

## Hanteringsriktlinjer för QIAvac 24 Plus

- Ställ alltid QIAvac 24 Plus på en säker bänk- eller arbetsyta. Om du tappar QIAvac 24 Plus kan grenröret spricka.
- QIAvac 24 Plus ska alltid förvaras rent och torrt. Rengöringsförfaranden finns i handboken för QIAvac 24 Plus.
- Komponenterna i QIAvac 24 Plus tål inte vissa lösningsmedel (Tabell 1). Om dessa lösningsmedel spills på enheten ska den sköljas noggrant med vatten.
- För att säkerställa en konsekvent prestanda, använd inte kisel- eller vakuumpfett på någon del av QIAvac 24 Plus-grenröret.
- Var alltid försiktig och använd skyddsglasögon när du arbetar nära ett vakuumpgrenrör med tryck.
- Kontakta QIAGEN:s tekniska service eller din lokala återförsäljare för information om reservdelar.
- Vakuumptrycket är tryckskillnaden mellan insidan av vakuumpgrenröret och atmosfären (standardatmosfärtryck 1013 millibar eller 760 mm Hg) och kan mätas med QIAvac Connecting System (se Bild 2). Protokollen kräver en vakuumpump som kan skapa ett vakuum på  $-800$  till  $-900$  mbar (t.ex. QIAGEN Vacuum Pump). Undvik högre vakuumptryck. Lägre vakuumptryck än det som rekommenderas kan minska utbytet av och renheten hos nukleinsyrorerna och ökar risken för blockerade membran.

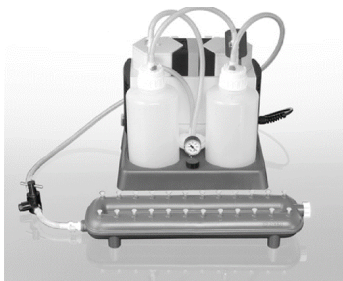


Bild 2. QIAvac 24 Plus, QIAvac Connecting System och vakuumpump

Tabell 1. Kemiska resistensegenskaper för QIAvac 24 Plus

Resistent mot		Ej resistent mot
Ättiksyra	Kaotropiska salter	Bensen
Kromsyra	Koncentrerade alkoholer	Fenol
SDS	Natriumklorid	Kloroform
Tween® 20	Karbamid	Toluen
Klorblekning	Saltsyra	Etrar
Natriumhydroxid		

## Montera QIAvac 24 Plus vacuum manifold

1. Anslut QIAvac 24 Plus till en vakuumkälla. Om du använder QIAvac Connecting System ska du ansluta systemet till grenröret och vakuumkällan enligt beskrivningen i bilaga A i *handboken för QIAvac 24 Plus*.
2. För in en VacValve (tillval) i varje luerfack på QIAvac 24 Plus som ska användas (se Bild 3). Stäng de luerfack som inte används med luerlock eller stäng infogad VacValve.  
För att säkerställa ett konsekvent vakuum bör VacValves användas om provernas flödes hastigheter avviker avsevärt från varandra.
3. Sätt in en VacConnector i varje VacValve (se Bild 3).  
Utför detta steg precis innan du påbörjar reningen för att undvika att VacConnectors exponeras för eventuella luftföroreningar.
4. Placera QIAamp Mini-kolonnerna i de VacConnectors som finns på grenröret (se Bild 3).  
Obs! Spara tvåttröret från blisterförpackningen för användning i reningsprotokollet.
5. Sätt in en kolonnförlängare (20 ml) i varje QIAamp Mini-kolonn (se Bild 3).  
Obs! Se till att kolonnförlängaren sitter stadigt i QIAamp Mini-kolonnen för att undvika provläckage.
6. För rening av nukleinsyror, följ anvisningarna i protokollet. Kassera VacConnectors på lämpligt vis efter användning.

---

Lämna locket på QIAamp Mini-kolonnen öppet medan vakuum appliceras.

Stäng av vakuuet mellan stegen för att säkerställa att en jämn och konsekvent vakuumnivå används under bearbetningen. En Vacuum Regulator (vakuumreglerare) kan användas om du vill frigöra vakuum snabbare (ingår i QIAvac Connecting System).

Obs! Varje VacValve kan stängas individuellt när provet har hämtats helt genom spinnkolonnen, vilket möjliggör parallellbearbetning av prover med olika volym eller viskositet.

7. När proverna har bearbetats rengör du QIAvac 24 Plus (se "Rengöring och dekontaminering av QIAvac 24 Plus" i *handboken för QIAvac 24 Plus*).

Obs! Buffer ACL, ACB och ACW1 är inte kompatibla med desinfektionsmedel som innehåller blekmedel. Sidan 12 innehåller Varningar och försiktighet.

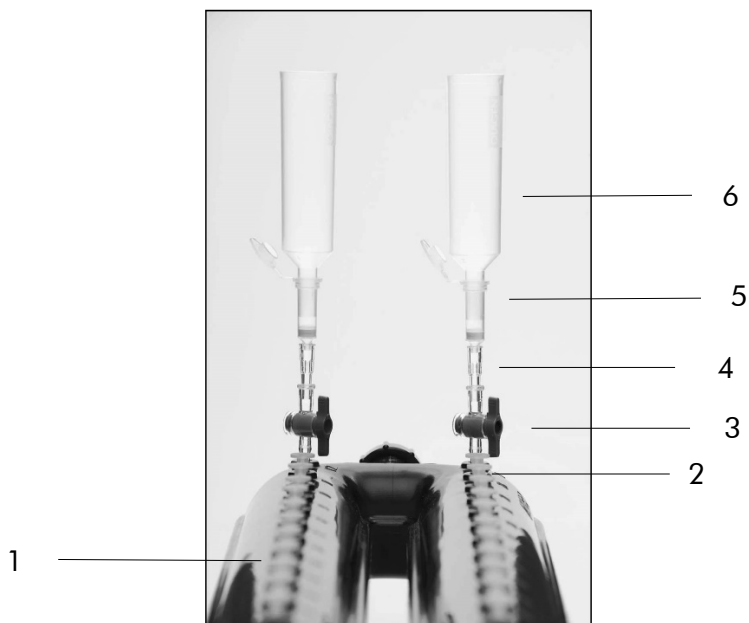
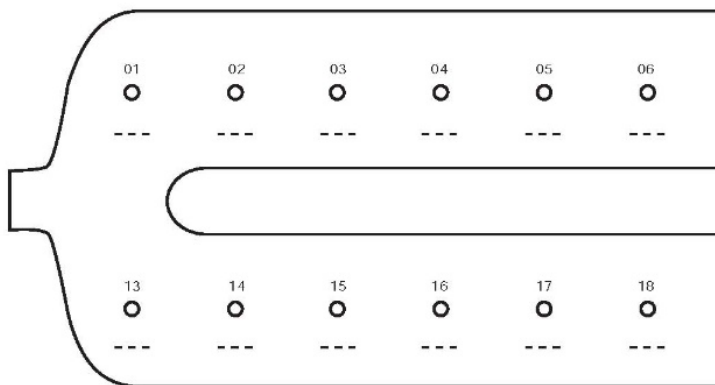


Bild 3. Konfigurera QIAvac 24 Plus med QIAamp Mini-kolonner med VacValves, VacConnectors och kolonnförlängare.

- |  |                      |
|--|----------------------|
| 1 QIAvac 24 Plus vacuum manifold                   | 4 VacConnector       |
| 2 Luerfack på QIAvac 24 Plus (stängs med luerlock) | 5 QIAamp Mini-kolonn |
| 3 VacValve**                                       | 6 Kolonnförlängare   |

Vi rekommenderar att du märker provrören och QIAamp Mini-kolonnerna för användning på QIAvac 24 Plus-vakuumsystemet enligt schemat i Bild 4 för att undvika förväxling av proverna. Detta schema kan fotokopieras och märkas med provnamn.

\* Måste köpas separat.



Datum: \_\_\_\_\_

Operatör: \_\_\_\_\_

Körnings-ID: \_\_\_\_\_

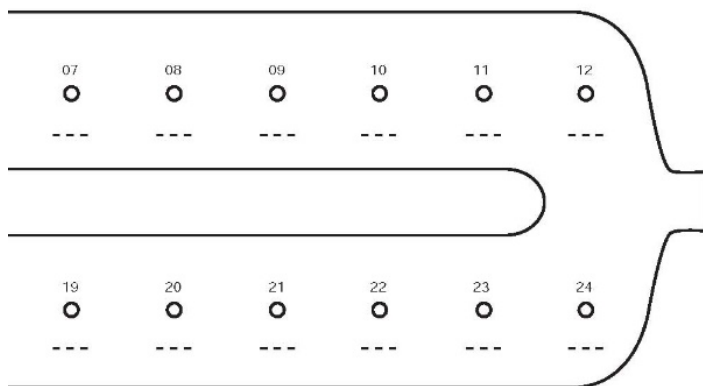


Bild 4. Märkningsschema för provrör och QIAamp Mini-kolonner för användning med vakuumsystemet QIAvac 24 Plus

# Förberedning av buffertar och reagenser

## Buffer ACB

Tillsätt 200 ml isopropanol (100 %) till 300 ml Buffer ACB-koncentrat inför användning. Detta ger 500 ml Buffer ACB. Blanda noggrant efter att isopropanol har tillsatts.

## Buffer ACW1 \*

Tillsätt 25 ml etanol (96–100 %) till 19 ml Buffer ACW1-koncentrat inför användning. Detta ger 44 ml Buffer ACW1. Blanda noggrant efter att etanol har tillsatts.

## Buffer ACW2†

Tillsätt 30 ml etanol (96–100 %) till 13 ml Buffer ACW2-koncentrat inför användning. Detta ger 43 ml Buffer ACW2. Blanda noggrant efter att etanol har tillsatts.

## Tillsätta bärar-RNA till Buffer ACL\*

Bärar RNA har 2 syften. För det första förbättrar det bindningen av nukleinsyror till QIAamp Mini-membranet, särskilt om det är mycket få målmolekyler i provet. För det andra minskar tillsatsen av stora mängder bärar-RNA risken för RNA-nedbrytning i den sällsynta händelsen att RNase-molekylerna undgår denaturering genom de kaotropiska salterna och rengöringsmedlen i Buffer ACL.

Mängden frystorkat bärar-RNA är tillräckligt för den volym Buffer ACL som medföljer kitet. Den rekommenderade koncentrationen av bärar-RNA har anpassats så att QIAamp DSP Circulating NA-protokollet kan användas som ett generiskt rengöringssystem kompatibelt med många olika förstärkningssystem, och är lämplig för ett stort urval RNA- och DNA-mål.

\* Innehåller kaotropiskt salt. Se varningar och försiktighetsåtgärder på sida 12.

† Innehåller natriumazid som konserveringsmedel.



---

Olika förstärkningssystem har varierande effektivitet beroende på den totala mängden nukleinsyror som förekommer i reaktionen. Eluat från denna sats innehåller både cirkulerande nukleinsyror och bärar-RNA, och mängden bärar-RNA överstiger vida mängden cirkulerande nukleinsyror i de flesta fall. Därför kommer mängdbestämningen av isolerade cirkulerande nukleinsyror genom UV-absorbansläsning inte vara tillräcklig, eftersom resultaten från sådana mätningar avgörs av förekomsten av bärar-RNA.

För att erhålla högsta känslighetsnivå på förstärkningsreaktionerna kan det vara nödvändigt att minska mängden bärar-RNA som tillsätts till Buffer ACL.

För förstärkningssystem som inbegriper oligo dT-primrar får bärar-RNA inte tillsättas under isoleringen av fritt cirkulerande nukleinsyror.

Tillsätt 1550 µl Buffer AVE\* till röret som innehåller 310 µg frystorkat bärar-RNA för att erhålla en lösning med koncentrationen 0,2 µg/µl. Lös upp bärar-RNA:t grundligt, dela upp det i alikvoter med lämplig storlek och förvara det i -30 till -15 °C. Undvik att frysa och tina upp alikvoterna med bärar-RNA mer än 3 gånger.

Det går inte att lösa upp bärar-RNA i Buffer ACL. Det måste först lösas upp i Buffer AVE och därefter tillsättas till Buffer ACL.

Beräkna hur stor volym Buffer ACL-bärar-RNA-blandning som behövs per provsats enligt tabellerna i protokollen. Välj antalet prover som ska bearbetas samtidigt.

Blanda försiktigt genom att vända röret eller flaskan 10 gånger. För att undvika skumbildning, vortexblanda inte.

\*Innehåller natriumazid som konserveringsmedel.

---

Obs! Provberedningsproceduren är optimerad för max 1,0 µg bärar-RNA per prov. Om mindre bärar-RNA har visat sig vara bättre för ditt förstärkningssystem ska endast erforderlig mängd upplöst bärar-RNA överföras till provrören med Buffer ACL. För varje mikrogram bärar-RNA som krävs per beredning ska 5 µl upplöst bärar-RNA tillsättas till Buffer ACL. (Användning av mindre än 1,0 µg bärar-RNA per prov kan vara lämpligt och måste valideras för varje specifik provtyp och nedströmsmetod.)

# Breeze-protokoll: Rening av cirkulerande nukleinsyror från 1–5 ml humanblodplasma

Detta protokoll är avsett för rening av cirkulerande DNA och RNA från 1–5 ml humanblodplasma och har optimerats för minimal arbetsinsats och kort bearbetningstid. Se "Klassiskt protokoll: Rening av cirkulerande nukleinsyror från 1–5 ml humanblodplasma" (sidan 32) för befintliga användarvaliderade arbetsflöden som använder version 1/R3 av QIAamp DSP Circulating Kit.

Viktigt att tänka på före start

- Alla centrifugeringssteg utförs i rumstemperatur (15-25 °C).
- Stäng av vakuemet mellan stegen för att säkerställa att en jämn och konsekvent vakuumnivå används under protokollstegen.
- Obs! Vakuumpumstrycket bör vara mellan –800 och – 900 mbar.
- Ekvilibrera proverna till rumstemperatur.
- Använd fosfatbuffrad saltlösning tills provvolymen är lika med den närmaste exakta volymen (1 ml till 5 ml).
- Ställ in QIAvac 24 Plus enligt beskrivningen på sidan 19.
- Värm ett vattenbad eller ett värmeblock till 56 °C för användning med 50 ml centrifugrör i steg 3.
- Ekvilibrera QIAamp Mini-spinnkolonner till rumstemperatur i minst 1 timme före användning.
- Kontrollera att Buffer ACB, Buffer ACW1 och Buffer ACW2 har förberetts (tillsättning av isopropanol eller etanol) enligt anvisningarna på sidan 24.
- Tillsätt bärar-RNA rekonstituerat i Buffer AVE till Buffer ACL i enlighet med anvisningarna i Tabell 2.

Tabell 2. Volym Buffer ACL och bärar-RNA (löst i Buffer AVE) som krävs för bearbetning av 1–5 ml humanblodplasma prover

Konfiguration för ml plasma	A	B	C	D	E	Bärar-RNA i Buffer AVE (µl)
	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	
Number of samples (Antal prover)	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

## Förfarande: Breeze-protokoll

1. Pipettera QIAGEN Proteinase K, plasma och Buffer ACL i den ordningen i ett 50 ml centrifugrör (medföljer ej).

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

2. Stäng locket och pulsvortexblanda i 5 x 2 sekunder.

Kontrollera att en synlig virvel bildas i provröret. För att säkerställa effektiv lysering är det viktigt att provet och Buffer ACL blandas nogga för att få fram en homogen lösning.

Obs! Stör inte proceduren under den här tiden. Fortsätt omedelbart vidare till steg 3 för att starta lysersinkubationen.

3. Inkubera i 56 °C ( $\pm 1$  °C) i 15 ( $\pm 1$ ) minuter.
4. Sätt tillbaka provröret på arbetsbänken och skruva loss korken.
5. Tillsätt Buffer ACB till lysatet i provröret. Välj volym enligt konfigurationen i steg 1.

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

6. Stäng locket och pulsvortexblanda noggrant i 5 x 2 sekunder.

Kontrollera att en synlig virvel bildas i provröret. För att säkerställa effektiv lysering är det viktigt att lysatet och Buffer ACB blandas nogga för att få fram en homogen lösning.

7. Inkubera lysat-Buffer ACB-blandningen i provröret i 5 ( $\pm 1$ ) i rumstemperatur.

8. Sätt in QIAamp Mini-kolonnerna i VacConnector på QIAvac 24 Plus (se "Montera QIAvac 24 Plus vacuum manifold", sidan 19). Sätt in en 20 ml kolonnförlängare i den öppna QIAamp Mini-kolonnen.

Se till att kolonnförlängaren sitter stadigt i QIAamp Mini-kolonnen för att undvika provläckage.

Obs! Spara tvättröret för torkcentrifugeringen i steg 13.

9. Applicera försiktigt lysatet från steg 7 i kolonnförlängaren på QIAamp Mini-kolonnen. Sätt igång vakuumpumpen. När alla lysat har hämtats fullständigt genom kolonnerna stänger du av vakuumpumpen och släpper trycket till 0 mbar. Ta försiktigt bort kolonnförlängaren och kassera den.

Observera att stora provlysatvolym (omkring 18 ml när du börjar med ett 5 ml prov) kan behöva upp till 20 minuter för att passera genom QIAamp Mini-membranet med hjälp av vakuumkraft.

En Vacuum Regulator (vakuumreglerare) kan användas om du vill frigöra vakuum snabbare och enklare (ingår i QIAvac Connecting System).

Obs! För att undvika korskontamination ska du undvika att korsangränsa QIAamp Mini-kolonner medan kolonnförlängare avlägsnas.

10. Tillsätt 600 µl Buffer ACW1 i QIAamp Mini-kolonnen. Låt locket på kolonnen vara öppet och slå på vakuumpumpen. När all Buffer ACW1 har hämtats fullständigt genom QIAamp Mini-kolonnen stänger du av vakuumpumpen och släpper trycket till 0 mbar.
11. Tillsätt 750 µl Buffer ACW2 i QIAamp Mini-kolonnen. Låt locket på kolonnen vara öppet och slå på vakuumpumpen. När all Buffer ACW2 har hämtats fullständigt genom QIAamp Mini-kolonnen stänger du av vakuumpumpen och släpper trycket till 0 mbar.
12. Tillsätt 750 µl etanol (96–100 %) i QIAamp Mini-kolonnen. Låt locket på kolonnen vara öppet och slå på vakuumpumpen. När all etanol har hämtats fullständigt genom spinnkolonnen stänger du av vakuumpumpen och släpper trycket till 0 mbar.
13. Stäng locket på QIAamp Mini-kolonnen. Ta bort den från vakuumgrenröret och kassera VacConnector. Ställ QIAamp Mini-kolonnen i ett rent 2 ml tvättrör (från steg 8) och centrifugera med full hastighet (20 000 × g; 14 000 rpm) i 3 (± 0,5) minuter.

14. Placera QIAamp Mini-kolonnen i ett rent 2 ml tvättrör. Öppna locket och inkubera i rumstemperatur i 3 minuter tills membranet är helt torrt.
15. Ställ QIAamp Mini-kolonnen i ett rent 1,5 ml tvättrör (medföljer) och kassera 2 ml-tvättröret från steg 14. Tillsätt 20–150 µl Buffer AVE mitt på QIAamp Mini-kolonnmembranet. Stäng locket och inkubera i rumstemperatur i 3 (±0.5) minuter.

Viktigt: Se till att Buffer AVE (elueringsbufferten) ekvilibreras till rumstemperatur (15–25 °C). Om elueringen görs i små volymer (<50 µl) måste elueringsbufferten dispenserats mitt på membranet för fullständig eluering av bundna nukleinsyror.

Elueringsvolymen är flexibel och kan anpassas efter kraven för nedströmstillämpningar.

Eluering med mindre volymer Buffer AVE leder till högre koncentrationer av nukleinsyror, men kan leda till lägre totalt utbyte.

Eluatvolymutbytet kan vara upp till 5 µl mindre än elueringsvolymen som tillsattes på membranet i QIAamp Mini-kolonnen.

Obs! För förväntat låga utbyten av nukleinsyror kan ett lågbindande provrör användas för eluering (medföljer inte).

16. Centrifugera i en mikrocentrifug med full hastighet ca 20 000 × g; 14 000 rpm) i 1 minut för att eluera nukleinsyror.

# Klassiskt protokoll: Rening av cirkulerande nukleinsyror från 1–5 ml humanblodplasma

Detta protokoll utgör det oförändrade protokollet från handboken för QIAamp DSP Circulating NA Kit version 3 (R3) för användning med bland annat befintliga användarvaliderade arbetsflöden för 1–5 ml humanplasma.

## Viktigt att tänka på före start

- Alla centrifugeringssteg utförs i rumstemperatur (15-25 °C).
- Stäng av vakuemet mellan stegen för att säkerställa att en jämn och konsekvent vakuumnivå används under protokollstegen.  
Obs! Vakuumpumtrycket bör vara mellan –800 och – 900 mbar.
- Ekvilibrera proverna till rumstemperatur.
- Använd fosfatbuffrad saltlösning tills provvolymen är lika med den närmaste exakta volymen (1 ml till 5 ml).
- Ställ in QIAvac 24 Plus enligt beskrivningen på sidan 19.
- Värm ett vattenbad eller ett värmeblock till 60 °C för användning med 50 ml centrifugrör i steg 3.
- Värm ett värmeblock till 56 °C för användning med 2 ml tvättrör i steg 14.
- Ekvilibrera QIAamp Mini-spinnkolonnerna till rumstemperatur i minst 1 timme före användning.
- Kontrollera att Buffer ACB, Buffer ACW1 och Buffer ACW2 har förberetts (tillsättning av isopropanol eller etanol) enligt anvisningarna på sidan 24.
- Tillsätt bärar-RNA rekonstituerat i Buffer AVE till Buffer ACL i enlighet med anvisningarna i Tabell 3.



Tabell 3. Volym Buffer ACL och bärar-RNA (löst i Buffer AVE) som krävs för bearbetning av 1–5 ml humanblodplasma prover

Konfiguration för ml plasma	A	B	C	D	E	Bärar-RNA i Buffer AVE (µl)
	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	
Number of samples (Antal prover)	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

## Förfarande: Klassiskt protokoll

1. Pipettera QIAGEN Proteinase K, plasma och Buffer ACL i den ordningen i ett 50 ml centrifugrör (medföljer ej).

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

2. Stäng locket och pulsvortexblanda i 30 sekunder.

Kontrollera att en synlig virvel bildas i provröret. För att säkerställa effektiv lysering är det viktigt att provet och Buffer ACL blandas nogga för att få fram en homogen lösning.

Obs! Stör inte proceduren under den här tiden. Fortsätt omedelbart vidare till steg 3 för att starta lysersinkubationen.

3. Inkubera i 60 °C ( $\pm$  1°C) i 30  $\pm$  2 minuter.
4. Sätt tillbaka provröret på arbetsbänken och skruva loss korken.
5. Tillsätt Buffer ACB till lysatet i provröret. Välj volym enligt konfigurationen i steg 1.

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

6. Stäng locket och pulsvortexblanda noggrant i 30 sekunder.

Kontrollera att en synlig virvel bildas i provröret. För att säkerställa effektiv lysering är det viktigt att lysatet och Buffer ACB blandas nogga för att få fram en homogen lösning.

7. Inkubera lysat-Buffer ACB-blandningen i provröret i 5 ( $\pm$  1) minuter på is.

8. Sätt in QIAamp Mini-kolonnerna i VacConnector på QIAvac 24 Plus (se "Montera QIAvac 24 Plus vacuum manifold", sidan 19). Sätt in en 20 ml kolonnförlängare i den öppna QIAamp Mini-kolonnen.

Se till att kolonnförlängaren sitter stadigt i QIAamp Mini-kolonnen för att undvika provläckage.

Obs! Spara tvättröret för torkcentrifugeringen i steg 13.

9. Applicera försiktigt lysatet från steg 7 i kolonnförlängaren på QIAamp Mini-kolonnen. Slå på vakuumpumpen och minska trycket till  $-800$  till  $-900$  mbar. När alla lysat har hämtats fullständigt genom kolonnerna stänger du av vakuumpumpen och släpper trycket till 0 mbar. Ta försiktigt bort kolonnförlängaren och kassera den.

Observera att stora provlysatvolym (omkring 18 ml när du börjar med ett 5 ml prov) kan behöva upp till 20 minuter för att passera genom QIAamp Mini-membranet med hjälp av vakuumkraft.

En Vacuum Regulator (vakuumreglerare) kan användas om du vill frigöra vakuum snabbare och enklare (ingår i QIAvac Connecting System).

Obs! För att undvika korskontamination ska du undvika att korsangränsa QIAamp Mini-kolonner medan kolonnförlängare avlägsnas.

10. Tillsätt 600  $\mu$ l Buffer ACW1 i QIAamp Mini-kolonnen. Låt locket på kolonnen vara öppet och slå på vakuumpumpen. När all Buffer ACW1 har hämtats fullständigt genom QIAamp Mini-kolonnen stänger du av vakuumpumpen och släpper trycket till 0 mbar.

11. Tillsätt 750  $\mu$ l Buffer ACW2 i QIAamp Mini-kolonnen. Låt locket på kolonnen vara öppet och slå på vakuumpumpen. När all Buffer ACW2 har hämtats fullständigt genom QIAamp Mini-kolonnen stänger du av vakuumpumpen och släpper trycket till 0 mbar.

12. Tillsätt 750  $\mu$ l etanol (96–100 %) i QIAamp Mini-kolonnen. Låt locket på kolonnen vara öppet och slå på vakuumpumpen. När all etanol har hämtats fullständigt genom spinnkolonnen stänger du av vakuumpumpen och släpper trycket till 0 mbar.

13. Stäng locket på QIAamp Mini-kolonnen. Ta bort den från vakuumgrenröret och kassera VacConnector. Ställ QIAamp Mini-kolonnen i ett rent 2 ml tvättrör (från steg 8) och centrifugera med full hastighet (20 000  $\times$  g; 14 000 rpm) i 3 ( $\pm$  0,5) minuter.

14. Placera QIAamp Mini-kolonnen i ett rent 2 ml tvättrör. Öppna locket och inkubera i 56 °C ( $\pm 1$  °C) i 10 ( $\pm 1$ ) minuter tills membranet är helt torrt.
15. Ställ QIAamp Mini-kolonnen i ett rent 1,5 ml tvättrör (medföljer) och kassera 2 ml-tvättröret från steg 13. Tillsätt 20–150  $\mu$ l Buffer AVE mitt på QIAamp Mini-kolonnmembranet. Stäng locket och inkubera i rumstemperatur i 3 ( $\pm 0.5$ ) minuter.

Viktigt: Se till att Buffer AVE (elueringsbufferten) ekvilibreras till rumstemperatur (15–25 °C). Om elueringen görs i små volymer (<50  $\mu$ l) måste elueringsbufferten dispenserar mitt på membranet för fullständig eluering av bundna nukleinsyror.

Elueringsvolymen är flexibel och kan anpassas efter kraven för nedströmstillämpningar.

Eluering med mindre volymer Buffer AVE leder till högre koncentrationer av nukleinsyror, men kan leda till lägre totalt utbyte.

Eluatvolymutbytet kan vara upp till 5  $\mu$ l mindre än elueringsvolymen som tillsattes på QIAamp Mini-kolonnen.

Obs! För förväntat låga utbyten av nukleinsyror kan ett lågbindande provrör användas för eluering (medföljer inte).
16. Centrifugera i en mikrocentrifug med full hastighet ca 20 000  $\times g$ ; 14 000 rpm) i 1 minut för att eluera nukleinsyror.

# Kvalitetskontroll

För att säkerställa en enhetlig produktkvalitet testas varje lot av QIAamp DSP Circulating NA Kit med fastställda specifikationer enligt QIAGEN:s ISO-certifierade kvalitetshanteringssystem.

## Begränsningar

Systemprestandan för isolering av cirkulerande, cellfria nukleinsyror har beräknats med humanplasmaprover som har hämtats från följande blodprovtagningsrör:














- K2-EDTA (Beckton Dickinson, Kat. nr 367525)
- PAXgene Blood ccfDNA Tube (PreAnlytiX, Kat. nr 768115)
- Cell-Free DNA BCT (Streck, Kat. nr 218962)

Det är användarnas ansvar att validera systemets prestanda för eventuella procedurer som används i deras laboratorium och inte ingår i QIAGEN:s prestandastudier.

För att minimera risken för negativ påverkan på diagnostiska resultat bör lämpliga kontroller för nedströmstillämpningar användas. För ytterligare validering rekommenderas riktlinjerna från International Conference on Harmonization of Technical Requirements (ICH) i ICH Q2(R1) Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology.

Eventuella diagnostiska resultat som erhålls måste tolkas tillsammans med övriga kliniska fynd eller laboratoriefynd.

# Symboler

Symbol	Symbolförklaring
	Innehåller tillräckligt med reagenser för <N> test
	Utgångsdatum
	In vitro-diagnostisk medicinsk produkt
	Vid ankomst
	Öppna vid leverans. Förvara QIAamp Mini-spinnkolonnerna vid 2–8 °C
	Katalognummer
	Antal
	Partinummer
	Materialnummer
	Komponenter
	Volym
	Tillsätta
	Temperaturbegränsning



Tillverkare



Läs bruksanvisningen innan användning



Skriv ner aktuellt datum efter tillsats av etanol i flaskan



Etanol



Skriv ner aktuellt datum efter tillsats av isopropanol i flaskan



Isopropanol



Innehåller



Leder till



Guanidintiocyanat



Guanidinhydroklorid



BRJ 58



GSI-artikelnummer

---

## Referenser

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.

## Kontaktinformation

För teknisk hjälp och ytterligare information, besök vårt center för teknisk support på [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) eller ring en av QIAGEN:s avdelningar för teknisk support eller lokala distributörer (se baksidan eller besök [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).



# Felsökningshandbok

Den här felsökningshandboken kan vara till hjälp för att lösa eventuella problem som uppstår. För kontaktinformation, se baksidan eller besök [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

## Kommentarer och förslag på åtgärd

### Lite eller ingen nukleinsyra i eluatet

- |    |  |  |
|----|--|--|
| a) | Användning av ej stabiliserad plasma                         | Ej stabiliserade plasmaprover kan leda till snabbare DNA-nedbrytning. Vi rekommenderar att CEN/TS 16835-3:2015 följs. Upprepa reningsförfarandet med nya prover.   |
| b) | Längre tid mellan blodtagning och plasmaberedning.           | Kärnförsedda blodkroppar kan brytas ned och frigöra genomiskt DNA i plasman, vilket späder ut målnukleinsyran.   |
| c) | Proverna har frysts och tinats mer än en gång                | Undvik att tina och frysa upprepade gånger eftersom detta kan leda till nedbrytning av DNA. Använd alltid färska prover eller prover som endast har tinats en gång.  |
| d) | Låg koncentration av mål-DNA i proverna                      | Plasmaproverna lämnades stående i rumstemperatur för länge. Upprepa reningsförfarandet med nya prover<br><br>Obs! Vissa individer kan ha en låg koncentration cellfria nukleinsyror i plasman. I sådana fall bör en ökad provvolym och en låg eluatvolym väljas. |
| e) | Ineffektiv provlysering i Buffer ACL                         | Om QIAGEN Proteinase K utsätts för förhöjd temperatur under en längre tid kan det förlora aktivitet. Upprepa proceduren med nya prover och nytt QIAGEN Proteinase K.   |
| f) | Buffer ACL-bärr-RNA-blandningen är inte tillräckligt blandad | Blanda Buffer ACL med bärr-RNA genom att vända provröret med Buffer ACL-bärr-RNA försiktigt minst 10 gånger.   |
| g) | Etanol med låg procent användes istället för 96–100 %        | Upprepa reningsförfarandet med nya prover och 96–100 % etanol. Använd inte denaturerad alkohol som innehåller andra substanser, såsom metanol eller metyletylketon.  |
| h) | Buffer ACB är felaktigt förberedd                            | Kontrollera att Buffer ACB-koncentratet rekonstituerades med rätt volym isopropanol (inte etanol, se sidan 24).  |
| i) | Buffer ACW1 eller Buffer ACW2 är felaktigt förberedd         | Kontrollera att Buffer ACW1- och Buffer ACW2-koncentraterna späddes med rätt volym etanol (se sidan 24). Upprepa reningsförfarandet med nya prover.  |
| j) | Buffer ACW1 eller Buffer ACW2 förberedd med 70 % etanol      | Kontrollera att Buffer ACW1- och Buffer ACW2-koncentraterna späddes med 96–100 % etanol (se sidan 24). Upprepa reningsförfarandet med nya prover.  |

### DNA eller RNA fungerar inte bra i enzymatiska nedströmsreaktioner

- |    |                                |   |
|----|--------------------------------|---|
| a) | Lite eller ingen DNA i eluatet | Se "Lite eller ingen nukleinsyra i eluatet" ovan för möjliga orsaker. Öka mängden eluat som tillsätts till reaktionen om detta är möjligt.  |
| b) | Felaktig elueringsvolym        | Beräkna lämplig maxvolym för eluatet för din nedströmstillämpning. Minska eller öka eluatvolymen som tillsätts i nedströmstillämpningen därefter. Elueringsvolymen kan anpassas proportionerligt.<br><br>Obs! Eluering med mindre volymer Buffer AVE leder till högre koncentrationer av nukleinsyror, men kan leda till lägre totalt utbyte. |

## Kommentarer och förslag på åtgärd

- |                  |   |  |
|------------------|---|--|
| c)               | Bufferarna har inte blandats ordentligt           | Salt- och etanolkomponenterna hos tvättbufferten Buffer ACW2 kan ha separerat efter att de har lämnats stående under en längre tid mellan körningar. Blanda alltid bufferarna noggrant inför varje körning.  |
| d)               | Störningar på grund av bärar-RNA                  | Om förekomsten av bärar-RNA i eluatet stör de enzymatiska nedströmstillämpningarna kan det vara nödvändigt att minska mängden bärar-RNA eller ta bort det helt och hållet.   |
| Allmän hantering |   |  |
| a)               | Blockerad QIAamp Mini-kolonn                      | <p>Om flödes hastigheten minskar kan vakuumtiden förlängas.</p> <p>Alternativt kan du stänga VacValve, om den används, och försiktigt ta bort montage med kolonnförlängaren, VacConnector och VacValve från QIAamp Mini-kolonnen utan att förlora något lysat i kolonnförlängaren.</p> <p>Ta bort QIAamp Mini-kolonnen från vakuumgrenröret, ställ den i ett 2 ml tvättrör och centrifugera den med full hastighet tills provet helt har passerat genom membranet. Sätt tillbaka montage med kolonnförlängaren, VacConnector och VacValve som innehåller det kvarvarande lysatet. Slå på vakuumpumpen, öppna VacValve och fortsätt att tillsätta det kvarvarande lysatet.</p> <p>Upprepa ovanstående procedur om QIAamp Mini-kolonnen fortsätter att blockeras. Kryofällningar kan ha bildats i plasman på grund av upprepad frystning och upptining. Dessa kan blockera QIAamp Mini-kolonnen. Använd inte plasma som har frysts och tinats mer än en gång.</p> <p>Om kryofällningar syns kan du rengöra provet genom att centrifugera det i 5 minuter med 16 000 x g.</p> |
| b)               | Variierande elueringsvolym                        | Olika prover kan påverka volymen hos det färdiga eluatet. Eluatvolymutbytet kan vara upp till 5 µl mindre än elueringsvolymen som tillsattes på QIAamp Mini-kolonnen.  |
| c)               | Vakuumtryck på -800 till -900 mbar uppnåddes inte | <p>Vakuumgrenröret sluter inte tätt. Tryck på locket på vakuumgrenröret när vakuumpumpen är på. Kontrollera om vakuumtrycket uppnås.</p> <p>Packningen i QIAvac-locket är utsliten. Kontrollera grenrörets försegling manuellt och byt ut den vid behov.</p> <p>VacValves är utslitna. Ta bort alla VacValves och sätt in VacConnectors direkt i luerförlängningarna. Sätt in QIAamp Mini-kolonner i VacConnectors, stäng kolonnernas lock och slå på vakuumpumpen. Kontrollera om vakuumtrycket uppnås. Byt ut VacValves vid behov.</p> <p>Anslutningen till vakuumpumpen läcker. Stäng alla luerförlängningar med luerlock och slå på vakuumpumpen. Kontrollera att vakuumtrycket är stabilt efter att pumpen har slagits på (och Vacuum Regulator-ventilen är stängd). Byt ut anslutningarna mellan pumpen och vakuumgrenröret vid behov.</p> <p>Om vakuumtrycket fortfarande inte uppnås bör vakuumpumpen ersättas med en starkare pump.</p>   |

# Bilaga A: Rekommendation för separation och förvaring av blodplasma

För blodprovtagingsrör för stabilisering (t.ex. PAXgene ccfDNA Tube eller Streck Cell-Free DNA Tube) ska tillverkarnas anvisningar för separation och förvaring av plasma följas. Vi rekommenderar att du validerar dessa förvaringsvillkor tillsammans med din specifika nedströmstillämpning och mål.

Vi rekommenderar att CEN/TS 16835-3:2015 följs för ej stabiliserade blodprovtagingsrör.

För att isolera cirkulerande, cellfria nukleinsyror från blodprover rekommenderar vi att du följer detta protokoll, vilket omfattar ett centrifugeringssteg med höga g-krafter för att avlägsna celldebris och därmed minska mängden cellulärt eller genomiskt DNA eller RNA i provet.

1. Placera EDTA-helblod i BD Vacutainer®-provror (eller andra primärblodprovror med EDTA som antikoagulant) i en centrifug som har kylts till 4 °C med en swing-out-rotor och lämpliga bägare.
2. Centrifugera blodproverna i 10 minuter med 1900 x g (3000 rpm) i 4 °C.
3. Aspirera plasmasupernatanten försiktigt utan att störa plasma-cell-gränslagret. Cirka 4-5 ml plasma kan utvinnas från ett 10 ml primärprovror.

Obs! Plasma kan nu användas för utvinning av cirkulerande nukleinsyror. Den följande höghastighetscentrifugeringen kommer dock att ta bort ytterligare celldebris och föroreningar från de cirkulerande nukleinsyrorna genom genomiskt DNA och RNA som härleds från skadade kärnförsedda blodkroppar.

4. Aspirerad plasma överförs till ett nytt centrifugrör.
5. Centrifugera plasmaproverna i 10 minuter med 16 000 x g (med en fastvinkelrotor) i 4 °C. Detta avlägsnar ytterligare cell-nukleinsyror som sitter fast i celldebris.
6. Avlägsna supernatanten försiktigt och överför den till ett nytt provror utan att störa pelletten.

- 
7. Om plasma kommer att användas för utvinning av nukleinsyror samma dag ska den förvaras vid 2–8 °C tills dess att den ska bearbetas. För längre förvaring kan plasmaaliquoter från såväl stabiliserade som icke-stabiliserade blodprovtagningsrör förvaras i –20 °C (DNA som mål) eller –80 °C (RNA som mål) i minst 4 veckor. Innan plasman används för utvinning av cirkulerande nukleinsyror ska plasmaprovrören tinas i rumstemperatur.
  8. Valfritt: Centrifugera plasmaproverna i 5 minuter vid 16 000 x *g* (med en fastvinkelrotor) för att ta bort kryofällningar.  
Valfritt: Överför supernatanten till ett nytt provrör och påbörja sedan protokollet för utvinning av cirkulerande nukleinsyror.

# Bilaga B: Allmänna hänvisningar angående RNA-hantering

## Arbeta med RNA

Ribonukleaser (RNaser) är mycket motståndskraftiga och aktiva enzymer, som normalt inte behöver kofaktorer för att fungera. RNaser är svåra att inaktivera och endast en liten mängd räcker för att bryta ner RNA. Därför skall inga laboriematerial av glas eller plast användas, där RNase-kontaminationer inte eliminerats först. Se till att inga RNase-kontaminationer kan tillkomma på RNA-proven under eller efter reningsproceduren. För att skapa och upprätthålla en RNase-fri omgivning bör följande försiktighetsåtgärder följas vid förbehandling och bruk av engångs- och flegångsbehållare och lösningar när du arbetar med RNA.

## Allmän hantering

Arbetet med RNA ska alltid följa principerna för korrekta mikrobiologiska och aseptiska arbetstekniker. Händer och dammpartiklar kan bära på bakterier och mögelsvampar, vilket är de vanligaste orsakerna till RNase-kontamination. För att undvika RNase-kontamination via huden eller genom dammiga laborieinstrument, bör du därför alltid bära latex- eller vinylhandskar vid hantering av reagenser eller RNA-prover. Byt laboriehandskarna ofta och stäng alltid alla rör direkt efter användning. Låt renat RNA ligga kvar på is, om alikvoter pipetteras för nedströmstillämpningar.

## Plastvaror för engångsbruk

Användning av sterila, RNase-fria polypropylenprovror för engångsbruk rekommenderas för hela proceduren.

# Beställningsinformation

Produkt	Innehåll	Kat.nr
QIAamp DSP Circulating NA Kit (50)	För 50 beredningar: QIAamp Mini-kolonner, kolonnförlängare, VacConnectors, QIAGEN Proteinase K, reagens, buffertar och provtagningsrör	61504
Tillbehör		
QIAvac 24 Plus vacuum manifold*	Vakuumprenrör för bearbetning av 1–24 spinnkolonner: QIAvac 24 Plus vacuum manifold, luerlock och snabbkopplingar	19413
Vacuum Pump*	Universalvakuumpump	84010 [USA och Kanada] 84000 [Japan] 84020 [övriga världen]
QIAvac Connecting System*	System för att ansluta vakuumprenrör till vakuumpump: innehåller bricka, avfallsflaskor, slangar, kopplingar, ventil, mätenhet och 24 VacValves	19419

\* För användning med vakuumprotokoll.

Uppdaterad licensinformation och produktspecifika friskrivningsklausuler finns i respektive QIAGEN-kithandbok eller -bruksanvisning. Handböcker och bruksanvisningar för QIAGEN-kit finns på [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) eller kan beställas från QIAGENS tekniska service eller din lokala återförsäljare.

# Dokumentrevisioner

Datum	Ändringar
R4 09/2019	Ändring av användningsområde från endast humanplasma till cellfria nukleinsyror. Införande av protokollet "Breeze". Protokoll för urin och miRNA ingår inte. Uppdatering av säkerhetsinformation.

## Begränsat licensavtal för QIAamp DSP Circulating NA 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](http://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 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, än de uttryckligen angivna.
5. Inköparen och användaren av detta kit samtycker till att inte vidta, eller tillåta att någon annan vidtar, steg som kan leda till eller underlätta 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](http://www.qiagen.com).

Varumärken: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp® (QIAGEN Group); BD Vacutainer® (Becton, Dickinson and Company); Tween® (ICI Americas Inc.). Registrerade namn, varumärken osv. som används i detta dokument, även när de inte uttryckligen har markerats som sådana, får inte betraktas som oskyddade i lag.

1118364 10/2019 HB-0466-005 © 2019 QIAGEN, med ensamrätt.

