

Augusti 2015

# QIAsymphony<sup>®</sup> SP-protokollblad

Tissue\_LC\_200\_V7\_DSP och  
Tissue\_HC\_200\_V7\_DSP (användarvaliderat för  
QIAsymphony DSP DNA Mini Kit)

Det här dokumentet är *Tissue\_LC\_200\_V7\_DSP* och *Tissue\_HC\_200\_V7\_DSP* (användarvaliderat för QIAsymphony DSP DNA Mini Kit) QIAsymphony SP-protokollblad, R1, för kitversion 1.

## Allmän information

Dessa protokoll är avsedda för rening av total-DNA från odlade celler och bakteriekulturer med användning av QIASymphony SP och QIASymphony DSP DNA Mini Kit.

Beroende på provtypen rekommenderar vi användningen av antingen protokollet för lågt innehåll (low content, LC) eller protokollet för högt innehåll (high content, HC). Odlade celler och bakteriekulturer ger mer DNA när de bearbetas med protokollet för högt innehåll, men protokollet för lågt innehåll kan användas i kombination med en liten elueringsvolym (50 µl) om det krävs en hög DNA-koncentration.

QIASymphony DSP DNA Mini Kit, i kombination med Tissue\_LC\_200\_V7\_DSP- och Tissue\_HC\_200\_V7\_DSP-protokoll (användarvaliderat för QIASymphony DSP DNA Mini Kit) för rening av total-DNA från odlade celler och bakteriekulturer, är avsett för tillämpningar inom molekylärbiologi. Produkten är inte avsedd för diagnos, förebyggande eller behandling av en sjukdom.

**Obs!** Det är användarens ansvar att validera prestandan genom att använda denna kombination för alla procedurer som används i laboratoriet.

### Protokoll för lågt innehåll

<b>Kit</b>	QIASymphony DSP DNA Mini Kit (katalognr 937236)
<b>Provmaterial</b>	Odlade celler och bakteriekulturer Rekommenderade maxstorlekar för prover: För cellkultur, $5 \times 10^6$ celler För bakterier, $1 \times 10^9$ celler
<b>Protokollnamn</b>	Tissue_LC_200_V7_DSP
<b>Förvald analyskontrolluppsättning</b>	ACS_Tissue_LC_200_V7_DSP
<b>Elueringsvolym</b>	50 µl, 100 µl, 200 µl eller 400 µl
<b>Nödvändig programversion</b>	Version 4.0

## Protokollet för högt innehåll

<b>Kit</b>	QIAsymphony DSP DNA Mini Kit (katalognr 937236)
<b>Provmaterial</b>	Odlade celler och bakteriekulturer Rekommenderade maxstorlekar för prover: För cellkultur, 1 x 10 <sup>7</sup> celler För bakterier, 4 x 10 <sup>9</sup> celler
<b>Protokollnamn</b>	Tissue_HC_200_V7_DSP
<b>Förvald analyskontrolluppsättning</b>	ACS_Tissue_HC_200_V7_DSP
<b>Elueringsvolym</b>	100 µl, 200 µl eller 400 µl
<b>Nödvändig programversion</b>	Version 4.0

## Material som behövs men inte medföljer

### För alla provtyper

- För att minimera RNA-innehåll: RNase A (stamlösning på 100 mg/ml) (katalognr 19101)

### För gramnegativa bakterier

- ATL-buffert (katalognr 19076)

### För grampositiva bakterier

- P1-buffert (katalognr 19051)
- Lysozym (stamlösning på 100 mg/ml)

### För odlade celler

- P1-buffert (katalognr 19051)

## Lådan "Sample" (Prov)

<b>Provtyp</b>	Odlade celler och bakteriekulturer
<b>Provinmatningsvolym</b>	220 µl (krävs per prov enligt protokollet)*
<b>Bearbetad provvolym</b>	200 µl
<b>Primära provrör</b>	Ej relevant
<b>Sekundära provrör</b>	Se <a href="http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks">www.qiagen.com/goto/dsphandbooks</a> för mer information.
<b>Insatser</b>	Beror på vilken typ av provrör som används. För mer information, se <a href="http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks">www.qiagen.com/goto/dsphandbooks</a> .

\* För både protokoll för högt och lågt innehåll kommer systemet inte att känna igen om provvolymen är mindre än 220 µl eftersom provöverföringen genomförs utan avkänning av vätskenivån. Säkerställ därför att provets inmatningsvolym är 220 µl.

n/a = ej relevant.

## Lådan "Reagents and Consumables" (Reagens och förbrukningsmaterial)

<b>Position A1 och/eller A2</b>	Reagenskasset
<b>Position B1</b>	Ej relevant
<b>Spetsrackhållare 1-17</b>	Engångsfilterspetsar, 200 µl eller 1 500 µl
<b>Hållare för enhetslådor 1-4</b>	Enhetslådor som innehåller provprepareringskassetter eller 8-stavsskydd

n/a = ej relevant.

## Lådan "Waste" (Avfall)

<b>Hållare för enhetslådor 1-4</b>	Tomma enhetslådor
<b>Avfallspåshållare</b>	Avfallspåse
<b>Hållare för flaska för flytande avfall</b>	Tom flaska för flytande avfall

## Lådan "Eluate" (Eluat)

<b>Elueringsställ (vi rekommenderar att uttag 1, kylpositionen, används)</b>	Se <a href="http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks">www.qiagen.com/goto/dsphandbooks</a> för mer information.
--	--

## Erforderliga plastartiklar

Plastartiklar	En batch, 24 prover*	Två batcher, 48 prover*	Tre batcher, 72 prover*	Fyra batcher, 96 prover*
Engångs- filterspetsar, 200 µl†	26	50	74	98
Engångs- filterspetsar, 1 500 µl††	72	136	200	264
Provbered.kassetter‡	21	42	63	84
8-stavskydd‡‡	3	6	9	12

\* Om färre än 24 prover per batch används krävs det färre engångsfilterspetsar per körning.

† Det finns 32 filterspetsar/filterspetsställ.

‡ Antalet filterspetsar som krävs inbegriper filterspetsar för 1 inventarieskanning per reagenskasset.

§ Det finns 28 provberedningskassetter/enhetslåda.

¶ Det finns tolv 8-stavskydd/enhetslåda.

**Obs!** Beroende på inställningarna kan antalet givna filterspetsar skilja sig från de siffror som visas på pekskärmen. Vi rekommenderar att det maximala antalet spetsar laddas.

## Elueringsvolym

Elueringsvolymen väljs på pekskärmen. Beroende på provtyp och DNA-innehåll kan den slutliga eluatvolymen variera med upp till 15 µl mindre än den valda volymen. Eftersom eluatvolymen kan variera rekommenderar vi att du kontrollerar den faktiska eluatvolymen vid användning av ett automatiserat analysinställningssystem som inte verifierar eluatvolymen innan överföringen. Eluering i lägre volymer ökar den slutliga DNA-koncentrationen, men reducerar mängden något. Vi rekommenderar att du använder en elueringsvolym som är lämplig för den avsedda nedströmstillämpningen.

## Förberedelse av provmaterial

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

### Viktigt moment före start

- QIASymphony-magnetpartiklar renar både RNA och DNA samtidigt om båda finns i provet. För att minimera RNA-innehåll i provet kan du tillsätta RNase A i provet under det steg som anges i respektive förbehandlingsprotokoll.

## Saker som ska utföras före start

- Om du använder ATL-buffert ska du kontrollera att den inte innehåller vit utfällning. Inkubera vid behov i 30 minuter vid 37 °C med skakning då och då för att lösa upp utfällning.
- Ställ in en ThermoMixer® eller skakinkubator på den temperatur som krävs för respektive förbehandling.\*

## Odlade celler

Både färsk och frysta odlade celler kan användas. Vi rekommenderar användning av protokollet för högt innehåll för upp till  $1 \times 10^7$  celler. Protokollet för lågt innehåll kommer att leda till lägre DNA-mängder och rekommenderas endast i kombination med en liten elueringsvolym (50 µl) om en hög DNA-koncentration krävs. Frysta cellpellets bör återsuspenderas i P1-buffert enligt beskrivning i förbehandlingsprotokollet.

## Förbehandlingsprotokoll för odlade celler

1. Centrifugera högst  $1 \times 10^7$  celler vid  $300 \times g$  i 5 minuter vid rumstemperatur (15–25 °C). Avlägsna och kassera supernatanten och var försiktig så att du inte stör cellpelleten.  
**Obs!** Cellpelleten kan lagras vid –20 °C eller –70 °C för framtida användning, eller så kan den användas direkt.
2. Återsuspendera pelleten i 220 µl P1-buffert och överför provet till ett 2 ml mikrocentrifugrör (medföljer ej).
3. Tillsätt 20 µl proteinas K och blanda genom att knacka lätt på provröret.  
**Obs!** Använd proteinas K från enzymstället i QIASymphony DSP DNA Mini Kit.
4. Placera röret i en ThermoMixer eller en skakinkubator och inkubera vid 56 °C med skakningar på 900 rpm i 30 minuter till 2 timmar.  
**Obs!** Lyseringstiden beror på celltyp och cellantal. Om lyseringen är ofullständig efter 2 timmar, vilket indikeras genom förekomsten av olösligt material eller kraftigt viskösa lysat, kan lyseringstiden förlängas eller olösligt material avlägsnas med centrifugering så som beskrivs i steg 6. Lysering över natten är möjlig och påverkar inte preparatet.
5. För att minimera RNA-innehåll i provet tillsätter du 4 µl RNase A (100 mg/ml) och inkuberar i 2 minuter vid rumstemperatur (15–25 °C) innan du fortsätter med steg 6.
6. Överför försiktigt 220 µl av lysatet till provrör som är kompatibla med provbäraren för QIASymphony SP.

\* Förvissa dig om att instrumenten har kontrollerats, underhållits och kalibrerats regelbundet enligt tillverkarens anvisningar.

**Obs!** Om lysat innehåller ej digererat material centrifugerar du vid full hastighet i 2 minuter vid rumstemperatur innan supernatanten överförs till provrör. Det finns en fullständig lista över kompatibla provrör på [www.qiagen.com/goto/dsphandbooks](http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks). Vi rekommenderar att man använder 2 ml rör (t.ex. Sarstedt® katalognr 72.693 eller 72.608).

## Bakterier

Både färska och frysta bakteriekulturer kan användas. Vi rekommenderar användning av protokollet för högt innehåll för upp till  $4 \times 10^9$  celler. Protokollet för lågt innehåll kommer att leda till lägre DNA-mängder och rekommenderas endast i kombination med en liten elueringsvolym (50 µl) om en hög DNA-koncentration krävs. Bakterietillväxt mäts oftast via bakteriekulturens optiska densitet (OD) med hjälp av en spektrofotometer. OD-avläsningarna beror dock till stor del på vilken typ av spektrofotometer som använts och vilken bakterieart som undersökts. Vi rekommenderar därför att man kalibrerar spektrofotometern genom att korrelera uppmätta OD med antal bakterieceller. Frysta pellets bör återsuspenderas i P1-buffert (grampositiva bakterier) eller ATL-buffert (gramnegativa bakterier), enligt beskrivningen i förbehandlingsprotokollen.

### Förbehandlingsprotokoll för gramnegativa bakterier

1. Samla in högst  $4 \times 10^9$  celler genom centrifugering i 10 minuter vid  $5\,000 \times g$  vid rumstemperatur (15–25 °C). Avlägsna och kassera supernatanten och var försiktig så att du inte stör bakteriepelleten.

**Obs!** Cellpelleten kan lagras vid –20 °C eller –70 °C för framtida användning, eller så kan den användas direkt.

2. Återsuspendera bakteriepelleten i 220 µl ATL-buffert och överför provet till ett 2 ml mikrocentrifugrör (medföljer ej).
3. Tillsätt 20 µl proteinas K och blanda genom att knacka lätt på provröret.

**Obs!** Använd proteinas K från enzymstället i QIASymphony DSP DNA Mini Kit.

4. Placera röret i en ThermoMixer eller en skakinkubator och inkubera vid 56 °C med skakningar på 900 rpm i 30 minuter till 2 timmar.

**Obs!** Lyseringstiden beror på celltyp och cellantal. Om lyseringen är ofullständig efter 2 timmar, vilket indikeras genom förekomsten av olösligt material eller kraftigt viskösa lysat, kan lyseringstiden förlängas eller olösligt material avlägsnas med centrifugering så som beskrivs i steg 6.

5. För att minimera RNA-innehåll i provet tillsätter du 4 µl RNase A (100 mg/ml) och inkuberar i 2 minuter vid rumstemperatur innan du fortsätter med steg 6.
6. Överför försiktigt 220 µl av lysatet till provrör som är kompatibla med provbäraren för QIASymphony SP.

**Obs!** Om lysat innehåller ej digererat material centrifugerar du vid full hastighet i 2 minuter vid rumstemperatur innan supernatanten överförs till provrör. Det finns en fullständig lista över kompatibla provrör på [www.qiagen.com/goto/dsphandbooks](http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks). Vi rekommenderar att man använder 2 ml rör (t.ex. Sarstedt katalognr 72.693 eller 72.608).

### Förbehandlingsprotokoll för grampositiva bakterier

1. Samla in högst  $4 \times 10^9$  celler genom centrifugering i 10 minuter vid  $5\,000 \times g$  vid rumstemperatur ( $15\text{--}25\text{ }^\circ\text{C}$ ). Avlägsna och kassera supernatanten och var försiktig så att du inte stör bakteriepelleten.

**Obs!** Cellpelleten kan lagras vid  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  eller  $-70\text{ }^\circ\text{C}$  för framtida användning, eller så kan den användas direkt.

2. Återsuspendera bakteriepelleten i  $200\ \mu\text{l}$  P1-buffert och överför provet till ett 2 ml mikrocentrifugrör (medföljer ej).
3. Tillsätt  $20\ \mu\text{l}$  lysozym ( $100\ \text{mg/ml}$ ) och blanda genom att knacka på röret.
4. Placera röret i en ThermoMixer eller en skakinkubator och inkubera vid  $37\text{ }^\circ\text{C}$  med skakningar på  $900\ \text{rpm}$  i 30 minuter till 2 timmar.  
**Obs!** Lyseringstiden beror på celltyp och cellantal.
5. Tillsätt  $20\ \mu\text{l}$  proteinas K och blanda genom att knacka lätt på provröret.  
**Obs!** Använd proteinas K från enzymstället i QIASymphony DSP DNA Mini Kit.
6. Inkubera vid  $56\text{ }^\circ\text{C}$  med skakningar på  $900\ \text{rpm}$  i 30 minuter.
7. För att minimera RNA-innehåll i provet tillsätter du  $4\ \mu\text{l}$  RNase A ( $100\ \text{mg/ml}$ ) och inkuberar i 2 minuter vid rumstemperatur innan du fortsätter med steg 8.
8. Överför försiktigt  $220\ \mu\text{l}$  av lysatet till provrör som är kompatibla med provbäraren för QIASymphony SP.

**Obs!** Om lysat innehåller ej digererat material centrifugerar du vid full hastighet i 2 minuter vid rumstemperatur innan supernatanten överförs till provrör. Det finns en fullständig lista över kompatibla provrör på [www.qiagen.com/goto/dsphandbooks](http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks). Vi rekommenderar att man använder 2 ml rör (t.ex. Sarstedt katalognr 72.693 eller 72.608).



---

Uppdaterad licensinformation och produktspecifika friskrivningsklausuler: se respektive QIAGEN-kithandbok eller användarhandbok. QIAGEN-kithandböcker och användarhandböcker finns att tillgå på [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) eller kan beställas från QIAGEN:s tekniska serviceavdelning eller från lokal återförsäljare.

Varumärken: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony® (QIAGEN Group); Sarstedt® (Sarstedt AG and Co.); ThermoMixer® (Eppendorf AG). Registrerade namn, varumärken, etc. som används i detta dokument, även om de inte angetts som sådana, ska inte anses som oskyddade i lag. 08/2015 HB-0977-S09-001  
© 2015 QIAGEN, med ensamrätt.

