

Φύλλο Πρωτοκόλλου QIAasympphony SP

Πρωτόκολλο DNA_Buffy_Coat_400_V6_DSP

Γενικές πληροφορίες

Για διαγνωστική χρήση in vitro.

Αυτό το πρωτόκολλο αφορά τον καθαρισμό ολικού γονιδιωματικού και μιτοχονδριακού DNA από φρέσκο ή κατεψυγμένο λευκοκρίτη (buffy coat) με χρήση του QIAasympphony® SP και του κιτ QIAasympphony DSP DNA Midi.

Κιτ	QIAasympphony DSP DNA Midi Kit (αρ. καταλ. 937255)
Υλικό δειγμάτων	Λευκοκρίτης (με προσθήκη αντιπηκτικού EDTA, κιτρικών ή ηπαρίνης)
Ονομασία πρωτοκόλλου	DNA_BC_400_V6_DSP
Προκαθορισμένο σετ μαρτύρων προσδιορισμού	ACS_BC_400_V6_DSP
Διαμορφώσιμο	Όγκος έκλουσης: 200 μl, 400 μl
Απαιτούμενη έκδοση λογισμικού	Έκδοση 4.0

Σεπτέμβριος 2012



Sample & Assay Technologies

Συρτάρι “Sample” (δείγμα)

Τύπος δείγματος	Λευκοκρίτης (με προσθήκη αντιπηκτικού EDTA, κιτρικών ή ηπαρίνης)
Όγκος δείγματος	Εξαρτάται από τον τύπο σωληναρίου δείγματος που χρησιμοποιείται. Για περισσότερες πληροφορίες, βλ. www.qiagen.com/goto/dsphandbooks .
Πρώτα δείγματος	σωληνάκια δεν εφαρμ.
Δεύτερα δείγματος	σωληνάκια Για περισσότερες πληροφορίες βλ. www.qiagen.com/goto/dsphandbooks .
Ένθετα	Εξαρτάται από τον τύπο σωληναρίου δείγματος που χρησιμοποιείται. Για περισσότερες πληροφορίες, βλ. www.qiagen.com/goto/dsphandbooks .

δεν εφαρμ. = δεν εφαρμόζεται.

Συρτάρι “Reagents and Consumables” (αντιδραστήρια και αναλώσιμα)

Θέση A1 και/ή A2	Φύσιγγα αντιδραστηρίων
Θέση B1	δεν εφαρμ.
Στήριγμα θήκης ρυγχών 1–17	Αναλώσιμα ρύγχη φίλτρου, 200 μl ή 1500 μl
Στήριγμα κουτιού μονάδων 1–4	Κουτιά μονάδων που περιέχουν φύσιγγες προετοιμασίας δειγμάτων ή περιβλήματα 8 ράβδων

δεν εφαρμ. = δεν εφαρμόζεται.

Συρτάρι “Waste” (απόβλητα)

Στήριγμα κουτιού μονάδων 1–4	Κενά κουτιά μονάδων
Στήριγμα σακούλας αποβλήτων	Σακούλα αποβλήτων
Στήριγμα φιάλης υγρών αποβλήτων	Κενή φιάλη υγρών αποβλήτων

Συρτάρι “Eluate” (έκλουσμα)

Θήκη έκλουσης

(συνιστούμε τη χρήση της υποδοχής 1, θέση ψύξης)

Για περισσότερες πληροφορίες

βλ. www.qiagen.com/goto/dsphandbooks.

Απαιτούμενα πλαστικά υλικά

	Μία παρτίδα, 24 δείγματα*	Δύο παρτίδες, 48 δείγματα*	Τρεις παρτίδες, 72 δείγματα*	Τέσσερις παρτίδες, 96 δείγματα*	
Αναλώσιμα ρύγχη φίλτρου, 200 μl ^{†‡}	4	4	4	8	
Αναλώσιμα ρύγχη φίλτρου, 1500 μl ^{†‡}	110	212	314	424	
Φύσιγγες προετοιμασίας δειγμάτων [§]	18	36	54	72	
Περιβλήματα ράβδων [¶]	8	3	6	9	12

* Η χρήση λιγότερων από 24 δειγμάτων ανά παρτίδα μειώνει τον αριθμό των αναλώσιμων ρυγχών φίλτρου που απαιτούνται ανά εκτέλεση.

[†] Κάθε θήκη ρυγχών περιέχει 32 ρύγχη φίλτρου.

[‡] Ο αριθμός των απαιτούμενων ρυγχών φίλτρου περιλαμβάνει ρύγχη φίλτρου για 1 σάρωση υλικού ανά φύσιγγα αντιδραστηρίων.

[§] Κάθε κουτί μονάδων περιέχει 28 φύσιγγες προετοιμασίας δειγμάτων.

[¶] Κάθε κουτί μονάδων περιέχει δώδεκα περιβλήματα 8 ράβδων.

Σημείωση: Ανάλογα με τις εκάστοτε ρυθμίσεις, οι αριθμοί των ρυγχών φίλτρου ενδέχεται να διαφέρουν από εκείνους που προβάλλονται στην οθόνη αφής. Συνιστούμε τη φόρτωση του μέγιστου δυνατού αριθμού ρυγχών.

Όγκος έκλουσης

Ο όγκος έκλουσης επιλέγεται στην οθόνη αφής. Ανάλογα με τον τύπο δείγματος και την περιεκτικότητα σε DNA, ο τελικός όγκος εκλούσματος μπορεί να είναι έως και 15 μl μικρότερος

από τον επιλεγμένο όγκο. Λόγω των ενδεχόμενων αποκλίσεων του όγκου εκλούσματος, συνιστούμε τον έλεγχο του πραγματικού όγκου εκλούσματος όταν χρησιμοποιείτε αυτοματοποιημένο σύστημα ρύθμισης παραμέτρων προσδιορισμού που δεν επαληθεύει τον όγκο εκλούσματος πριν την μεταφορά. Η έκλουση σε μικρότερους όγκους αυξάνει την τελική συγκέντρωση DNA, μειώνει ωστόσο ελαφρά την απόδοση. Συνιστούμε τη χρήση κατάλληλου όγκου έκλουσης για την προοριζόμενη καθοδική (downstream) εφαρμογή.

Προετοιμασία του δείγματος

Όταν εργάζεστε με χημικά θα πρέπει πάντοτε να φοράτε προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφάλειας (SDS), τα οποία και είναι διαθέσιμα από τον προμηθευτή του προϊόντος.

Σημαντική υπόδειξη πριν από την έναρξη

- Τα μαγνητικά σωματίδια QIASymphony ενδεχομένως θα καθαρίσουν επίσης RNA, εάν υπάρχει στο δείγμα. Για να ελαχιστοποιήσετε την περιεκτικότητα του δείγματος σε RNA, προσθέστε RNάση A στο δείγμα, προτού ξεκινήσετε τη διαδικασία. Η τελική συγκέντρωση RNάσης A θα πρέπει να είναι 2 mg/ml.

Λευκοκρίτης

Ο λευκοκρίτης (buffy coat) είναι το εμπλουτισμένο με λευκοκύτταρα κλάσμα του ολικού αίματος. Η αποτελεσματικότητα του εμπλουτισμού σε λευκοκύτταρα εξαρτάται από τη χρησιμοποιούμενη διαδικασία για την παρασκευή του λευκοκρίτη και από την ακρίβεια εκχύλισης της στρώσης του λευκοκρίτη. Παρασκευάστε το λευκοκρίτη φυγοκεντρίζοντας δείγματα ολικού αίματος που περιέχουν πρότυπο αντιπηκτικό (EDTA, κιτρικά ή ηπαρίνη) σε 900–1100 x g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C). Μετά τη φυγοκέντριση, θα διακρίνονται 3 διαφορετικά κλάσματα: η άνω διαυγής στρώση είναι το πλάσμα, ακολουθεί η ενδιάμεση στρώση του λευκοκρίτη που περιέχει συμπυκνωμένα λευκοκύτταρα και κατόπιν η κάτω στρώση που περιέχει συμπυκνωμένα ερυθροκύτταρα. Περίπου 1 ml κλάσματος που περιέχει λευκοκύτταρα θα πρέπει να συλλέγεται από 10 ml φυγοκεντρισμένου ολικού αίματος, το οποίο κατά μέσο όρο αποδίδει πενταπλάσιο έως εξαπλάσιο (5–6x) εμπλουτισμό. Για παράδειγμα, 10 ml ολικού αίματος με αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων 6×10^6 ανά ml αποδίδουν 1 ml λευκοκρίτη. Αν υποθεθεί πενταπλάσιος εμπλουτισμός (5x) λευκών αιμοσφαιρίων, το αποτέλεσμα θα είναι 3×10^7 κύτταρα ανά ml. Ως εκ τούτου, σε πρωτόκολλο στο οποίο χρησιμοποιούνται 400 μl λευκοκρίτη, θα χρησιμοποιηθούν $1,2 \times 10^7$ κύτταρα.

Για τη αποφυγή υπερφόρτωσης της διαδικασίας καθαρισμού DNA, μην παρασκευάζετε δείγματα λευκοκρίτη με εμπλουτισμό άνω του δεκαπλάσιου (>10x). Εάν τα δείγματα λευκοκρίτη παρουσιάζουν εμπλουτισμό >10x, αραιώστε τα δείγματα σε δεκαπλάσιο ή χαμηλότερο εμπλουτισμό με PBS ή χρησιμοποιήστε λιγότερο υλικό έναρξης στη διαδικασία καθαρισμού DNA.

Τα δείγματα λευκοκρίτη μπορούν να χρησιμοποιηθούν αμέσως ή να φυλαχθούν στους -20°C ή -70°C για καθαρισμό DNA σε δεύτερο χρόνο. Τα κατεψυγμένα δείγματα θα πρέπει να αποψύχονται ταχέως σε υδατόλουτρο 37°C με ήπια ανακίνηση για τη διασφάλιση σχολαστικής ανάμιξης και κατόπιν να εξισορροπούνται σε θερμοκρασία δωματίου ($15-25^{\circ}\text{C}$) πριν από την έναρξη της διαδικασίας. Για τη διασφάλιση αξιόπιστης μεταφοράς δείγματος, αποφύγετε το σχηματισμό αφρού σε σωληνάρια δειγμάτων. Προσπαθήστε να αποφύγετε το σχηματισμό πηγμάτων αίματος στα δείγματα, και εάν χρειαστεί, μεταφέρετε το δείγμα χωρίς πήγματα σε φρέσκο σωληνάριο.

Για τις τρέχουσες πληροφορίες άδειας και αποποιήσεις σχετικά με συγκεκριμένα προϊόντα, ανατρέξτε στο σχετικό εγχειρίδιο ή οδηγίες χρήσης του kit QIAGEN. Τα εγχειρίδια και οι οδηγίες χρήσης των kit QIAGEN είναι διαθέσιμα στη διεύθυνση www.qiagen.com. Μπορείτε επίσης να τα ζητήσετε από το Τμήμα τεχνικής εξυπηρέτησης της QIAGEN ή τον τοπικό σας αντιπρόσωπο.

Εμπορικά σήματα: QIAGEN®, QIASymphony® (Όμιλος QIAGEN). Οι καταχωρημένες ονομασίες, τα εμπορικά σήματα κ.λ.π. που χρησιμοποιούνται σε αυτό το έγγραφο, δεν θα πρέπει να θεωρούνται μη προστατευμένα από το νόμο, ακόμη και αν δεν επισημαίνονται ειδικά ως τέτοια.

© 2012 QIAGEN, με την επιφύλαξη κάθε δικαιώματος.

www.qiagen.com

Australia ■ 1-800-243-800

Austria ■ 0800/281010

Belgium ■ 0800-79612

Canada ■ 800-572-9613

China ■ 021-51345678

Denmark ■ 80-885945

Finland ■ 0800-914416

France ■ 01-60-920-930

Germany ■ 02103-29-12000

Hong Kong ■ 800 933 965

Ireland ■ 1800 555 049

Italy ■ 800 787980

Japan ■ 03-5547-0811

Korea (South) ■ 1544 7145

Luxembourg ■ 8002 2076

The Netherlands ■ 0800 0229592

Norway ■ 800-18859

Singapore ■ 65-67775366

Spain ■ 91-630-7050

Sweden ■ 020-790282

Switzerland ■ 055-254-22-11

UK ■ 01293-422-911

USA ■ 800-426-8157



Sample & Assay Technologies