

August 2015

QIAsymphony[®] SP-protokollark

Tissue_LC_200_V7_DSP og
Tissue_HC_200_V7_DSP (brukervalidert for
QIAsymphony DSP DNA Mini-sett)

Dette dokumentet er Tissue_LC_200_V7_DSP og Tissue_HC_200_V7_DSP (brukervalidert for QIAsymphony DSP DNA Mini-sett) QIAsymphony SP-protokollark, R1, for settversjon 1.

Generell informasjon

Disse protokollene er for rensing av total DNA fra dyrkede celler og bakteriekulturer ved bruk av QIASymphony SP og QIASymphony DSP DNA Mini-settet.

Avhengig av prøvetypen anbefaler vi å bruke enten protokollen for lavt innhold (LC) eller høyt innhold (HC). Dyrkede celler og bakteriekulturer vil gi økte DNA-resultater når de behandles med protokollen for høyt innhold, men protokollen for lavt innhold, i kombinasjon med et lite elueringsvolum (50 µl), kan brukes hvis det er nødvendig med høy DNA-konsentrasjon.

QIASymphony DSP DNA Mini-settet, i kombinasjon med protokollene Tissue_LC_200_V7_DSP og Tissue_HC_200_V7_DSP (brukervalidert for QIASymphony DSP DNA Mini-settet) for rensing av total DNA fra dyrkede celler og bakteriekulturer, er beregnet på bruksområder innen molekylærbiologi. Produktet er ikke beregnet på diagnose, forebygging eller behandling av sykdom.

Merk: For alle prosedyrer som brukes på laboratoriet, er det brukerens ansvar å validere ytelsen ved bruk av denne kombinasjonen.

Protokoll for lavt innhold

Sett	QIASymphony DSP DNA Mini-sett (kat.nr. 937236)
Prøvemateriale	Dyrkede celler og bakteriekulturer Anbefalte maksimale prøvestørrelser: For cellekultur, 5×10^6 celler For bakterier, 1×10^9 celler
Protokollnavn	Tissue_LC_200_V7_DSP
Standard analysekontrollsett	ACS_Tissue_LC_200_V7_DSP
Elueringsvolum	50 µl, 100 µl, 200 µl eller 400 µl
Nødvendig programvareversjon	Versjon 4.0

Protokoll for høyt innhold

Sett	QIAsymphony DSP DNA Mini-sett (kat.nr. 937236)
Prøvemateriale	Dyrkede celler og bakteriekulturer Anbefalte maksimale prøvestørrelser: For cellekultur, 1×10^7 celler For bakterier, 4×10^9 celler
Protokollnavn	Tissue_HC_200_V7_DSP
Standard analysekontrollsett	ACS_Tissue_HC_200_V7_DSP
Elueringsvolum	100 µl, 200 µl eller 400 µl
Nødvendig programversjon	Versjon 4.0

Nødvendige materialer som ikke følger med

For alle prøvetyper

- For å minimere RNA-innhold: RNase A (stamløsning på 100 mg/ml) (kat.nr. 19101)

For Gram-negative bakterier

- Buffer ATL (kat.nr. 19076)

For Gram-positive bakterier

- Buffer P1 (kat.nr. 19051)
- Lysozym (stamløsning på 100 mg/ml)

For dyrkede celler

- Buffer P1 (kat.nr. 19051)

Skuffen "Sample" (Prøve)

Prøvetype	Dyrkede celler og bakteriekulturer
Prøveinnmatingsvolum	220 µl (nødvendig per prøve, etter protokoll) *
Behandlet prøvevolum	200 µl
Primære prøverør	n/a
Sekundære prøverør	Se www.qiagen.com/goto/dsphandbooks for mer informasjon.
Innlegg	Avhenger av type prøverør som brukes. Se www.qiagen.com/goto/dsphandbooks for mer informasjon.

* For protokollene med både lavt og høyt innhold vil systemet ikke kunne oppfatte at volumet er mindre enn 220 µl ettersom prøven overføres uten at væsknivået registreres. Påse derfor at prøveinnmatingsvolumet er 220 µl.

n/a = ikke relevant.

Skuffen "Reagents and Consumables" (Reagenser og forbruksvarer)

Posisjon A1 og/eller A2	Reagenspatron
Posisjon B1	n/a
Spisstativholder 1-17	Engangsfilterspisser, 200 µl eller 1500 µl
Enhetsboksholder 1-4	Enhetsbokser inneholder prøveklargjøringspatroner eller 8-stangdeksler

n/a = ikke relevant.

Skuffen "Waste" (Avfall)

Enhetsboksholder 1-4	Tomme enhetsbokser
Avfallsposeholder	Avfallspose
Holder for væskeavfallsflaske	Tom væskeavfallsflaske

Skuffen "Eluate" (Eluat)

Elueringsstativ (vi anbefaler bruk av åpning 1, nedkjølingsposisjon)	Se www.qiagen.com/goto/dsphandbooks for mer informasjon.
---	--

Nødvendige plastdeler

Plastdeler	Eit parti, 24 prøver*	To partier, 48 prøver*	Tre partier, 72 prøver*	Fire partier, 96 prøver*
Filterspisser til engangsbruk, 200 µl ^{†‡}	26	50	74	98
Filterspisser til engangsbruk, 1500 µl ^{†‡}	72	136	200	264
Prøveklargjøringspatroner [§]	21	42	63	84
8-stangdeksler [¶]	3	6	9	12

* Bruk av mindre enn 24 prøver per parti reduserer antall filterspisser til engangsbruk som kreves per kjøring.

† Det er 32 filterspisser pr. filterspissativ.

‡ Antall nødvendige filterspisser inkluderer filterspisser for 1 inventarskanning pr. reagenspatron.

§ Det er 28 prøveklargjøringspatroner pr. enhetsboks.

¶ Det er tolv 8-stangdeksler pr. enhetsboks.

Merk: Angitt antall filterspisser kan være forskjellig fra antallet som vises på berørings skjermen, avhengig av innstillingene. Vi anbefaler å laste maksimalt antall mulig spisser.

Elueringsvolum

Elueringsvolumet velges på berørings skjermen. Avhengig av prøvetype og DNA-innhold kan endelig eluatvolum variere med inntil 15 µl mindre enn valgt volum. Fordi eluatvolumet kan variere, anbefaler vi å kontrollere det faktiske eluatvolumet når det brukes et automatisk analyseoppsettssystem som ikke verifiserer eluatvolumet forut for overføringen. Eluering i lavere volum øker den endelige DNA-konsentrasjonen, men reduserer resultatet noe. Vi anbefaler å bruke et elueringsvolum som passer for den beregnede nedstrømsapplikasjonen.

Klargjøring av prøvematerialer

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. Du finner mer informasjon på de aktuelle sikkerhetsdatabladene (HMS-databladene) som fås fra leverandøren av produktet.

Viktig punkt før du starter

- QIASymphonys magnetiske partikler renses både RNA og DNA hvis begge er til stede i prøven. For å minimere RNA-innholdet i prøven må RNase A tilsettes prøven i trinnet som angis i den aktuelle forbehandlingsprotokollen.

Ting du skal gjøre før du starter

- Ved bruk av Buffer ATL, kontroller at det ikke inneholder hvitt presipitat. Ved behov inkuber i 30 minutter ved 37 °C med risting av og til for å løse opp presipitat.
- Still en ThermoMixer® eller blanderinkubator til den temperaturen som kreves for den respektive forbehandlingen.*

Dyrkede celler

Både ferske og fryste dyrkede celler kan brukes. Vi anbefaler protokollen for høyt innhold for inntil 1×10^7 celler. Protokollen for lavt innhold vil føre til lavere DNA-resultater og er bare anbefalt, i kombinasjon med et lavt elueringsvolum (50 µl), hvis det er påkrevd med høy DNA-konsentrasjon. Fryste cellepelletter bør resuspenderes i Buffer P1 som beskrevet i forbehandlingsprotokollen.

Forbehandlingsprotokoll for dyrkede celler

1. Sentrifuger maksimalt 1×10^7 celler ved 300 x g i 5 minutter ved romtemperatur (15–25 °C). Fjern og kast supernatanten, uten å forstyrre cellepelletten.
Merk: Cellepelletten kan lagres ved –20 °C eller –70 °C for fremtidig bruk, eller brukes umiddelbart.
2. Resuspender pelletten i 220 µl Buffer P1 og overfør prøven til et 2 ml-mikrosentrifugerør (følger ikke med).
3. Tilsett 20 µl proteinase K og bland ved å tappe på røret.
Merk: Bruk proteinase K fra enzymstativet til QIASymphony DSP DNA Mini-settet.
4. Plasser røret i en ThermoMixer eller blanderinkubator og inkuber ved 56 °C med risting ved 900 opm i 30 minutter til 2 timer.
Merk: Lyseringstid avhenger av celletype og celleantall. Hvis lyseringen er ufullstendig etter 2 timer, slik som indikert gjennom tilstedeværelsen av uløselig materiale eller høyst viskøse lysater, kan lyseringstiden forlenges, eller uløselig materiale kan fjernes via sentrifugering, slik som beskrevet i trinn 6. Lysering over natten er mulig og påvirker ikke klargjøringen.
5. For å minimere RNA-innholdet i prøven, tilsett 4 µl RNase A (100 mg/ml) og inkuber i 2 minutter ved romtemperatur (15–25 °C) før du fortsetter til trinn 6.
6. Overfør forsiktig 220 µl av lysatet til prøverørene som er kompatible med prøveholderen til QIASymphony SP.

* Pass på at instrumentene er kontrollert, vedlikeholdt og kalibrert regelmessig i henhold til produsentens instruksjoner.

Merk: Hvis lysater inneholder materiale som ikke er forbrent, sentrifuger ved full hastighet i 2 minutter ved romtemperatur før du overfører supernatanten til prøverørene. For en fullstendig liste over kompatible prøverør se www.qiagen.com/goto/dsphandbooks. Vi anbefaler bruk av 2 ml-rør (f.eks. Sarstedt® kat.nr. 72.693 eller 72.608).

Bakterier

Både ferske og frysede bakteriekulturer kan brukes. Vi anbefaler protokollen for høyt innhold for inntil 4×10^9 celler. Protokollen for lavt innhold vil føre til lavere DNA-resultater og er bare anbefalt, i kombinasjon med et lavt elueringsvolum (50 µl), hvis det er påkrevd med høy DNA-konsentrasjon. Bakterievekst måles vanligvis ved å måle bakteriekulturens optiske densitet (OD) med et spektrofotometer. OD-resultater er imidlertid i stor grad avhengig av hvilken type spektrofotometer som brukes og hvilke bakteriearter som måles. Vi anbefaler derfor at spektrofotometeret kalibreres ved å korrelere målt OD med bakteriecelleantallet. Fryste pelletter bør resuspenderes i Buffer P1 (Gram-positive bakterier) eller Buffer ATL (Gram-negative bakterier), som beskrevet i forbehandlingsprotokollene.

Forbehandlingsprotokoll for Gram-negative bakterier

1. Høst maksimalt 4×10^9 celler ved sentrifugering i 10 minutter ved 5000 x g og romtemperatur (15–25 °C). Fjern og kast supernatanten, uten å forstyrre bakteriepelletten.

Merk: Cellepelletten kan lagres ved –20 °C eller –70 °C for fremtidig bruk, eller brukes umiddelbart.

2. Resuspender bakteriepelletten i 220 µl Buffer ATL og overfør prøven til et 2 ml-mikrosentrifugerør (følger ikke med).
3. Tilsett 20 µl proteinase K og bland ved å tappe på røret.

Merk: Bruk proteinase K fra enzymstativet til QIA Symphony DSP DNA Mini-settet.

4. Plasser røret i en ThermoMixer eller blanderinkubator og inkuber ved 56 °C med risting ved 900 opm i 30 minutter til 2 timer.

Merk: Lyseringstid avhenger av celletype og celleantall. Hvis lyseringen er ufullstendig etter 2 timer, slik som indikert gjennom tilstedeværelsen av uløselig materiale eller høyst viskøse lysater, kan lyseringstiden forlenges, eller uløselig materiale kan fjernes via sentrifugering, slik som beskrevet i trinn 6.

5. For å minimere RNA-innholdet i prøven, tilsett 4 µl RNase A (100 mg/ml) og inkuber i 2 minutter ved romtemperatur før du fortsetter til trinn 6.
6. Overfør forsiktig 220 µl av lysatet til prøverørene som er kompatible med prøveholderen til QIA Symphony SP.

Merk: Hvis lysater inneholder materiale som ikke er forbrent, sentrifuger ved full hastighet i 2 minutter ved romtemperatur før du overfører supernatanten til prøverørene. For en fullstendig liste over kompatible prøverør se www.qiagen.com/goto/dsphandbooks. Vi anbefaler bruk av 2 ml-rør (f.eks. Sarstedt kat.nr. 72.693 eller 72.608).

Forbehandlingsprotokoll for Gram-positive bakterier

1. Høst maksimalt 4×10^9 celler ved sentrifugering i 10 minutter ved 5000 x g og romtemperatur (15–25 °C). Fjern og kast supernatanten, uten å forstyrre bakteriepelletten.

Merk: Cellepelletten kan lagres ved –20 °C eller –70 °C for fremtidig bruk, eller brukes umiddelbart.

2. Resuspender bakteriepelletten i 200 µl Buffer P1 og overfør prøven til et 2 ml-mikrosentrifugerør (følger ikke med).
3. Tilsett 20 µl lysozym (100 mg/ml) og bland ved å tappe på røret.
4. Plasser røret i en ThermoMixer eller blanderinkubator og inkuber ved 37 °C med risting ved 900 opm i 30 minutter til 2 timer.

Merk: Lyseringstid avhenger av celletype og celleantall.

5. Tilsett 20 µl proteinase K og bland ved å tappe på røret.

Merk: Bruk proteinase K fra enzymstativet til QIASymphony DSP DNA Mini-settet.

6. Inkuber ved 56 °C med risting ved 900 opm i 30 minutter.
7. For å minimere RNA-innholdet i prøven, tilsett 4 µl RNase A (100 mg/ml) og inkuber i 2 minutter ved romtemperatur før du fortsetter til trinn 8.
8. Overfør forsiktig 220 µl av lysatet til prøverørene som er kompatible med prøveholderen til QIASymphony SP.

Merk: Hvis lysater inneholder materiale som ikke er forbrent, sentrifuger ved full hastighet i 2 minutter ved romtemperatur før du overfører supernatanten til prøverørene. For en fullstendig liste over kompatible prøverør se www.qiagen.com/goto/dsphandbooks. Vi anbefaler bruk av 2 ml-rør (f.eks. Sarstedt kat.nr. 72.693 eller 72.608).

For oppdatert lisensinformasjon og produktspesifikke ansvarsfrasingelser, se den respektive håndboken eller brukerhåndboken for QIAGEN-settet. Håndbøker og brukerhåndbøker for QIAGEN-sett er tilgjengelige på www.qiagen.com eller kan anmodes fra QIAGENs tekniske tjenester eller din lokale distributør.

Varemerker: QIAGEN[®], Sample to Insight[®], QIAasymphony[®] (QIAGEN Group); Sarstedt[®] (Sarstedt AG and Co.); ThermoMixer[®] (Eppendorf AG). Registrerte navn, varemerker osv. som brukes i dette dokumentet skal ikke betraktes som ubeskyttet av lov, selv om de ikke spesifikt er merket som dette. 08/2015 HB-0977-S09-001
© 2015 QIAGEN, med enerett.

