

August 2018

QIAamp[®] DSP Virus Kit håndbog



QIAamp DSP Virus Kit er et generisk system, der anvender QIAamp-teknologi til isolering og oprensning af virale nukleinsyrer fra prøver med humant plasma eller serum til in vitro-diagnostiske procedurer.

Til in vitro-diagnostisk brug

IVD

CE

REF

60704

i

1114514DK

QIAGEN

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, TYSKLAND

R3 MAT

1114514DK

Indhold

Kit-indhold	3
Symboler	4
Opbevaringsforhold	6
Kvalitetskontrol	6
Tilsligtet anvendelse	7
Særlige anvisninger til brug af produktet	7
Advarsler og forholdsregler	8
Indledning	10
Princip og procedure	10
Ydelsesegenskaber	11
Udstyr og reagenser, der skal leveres af brugeren	16
Vigtige bemærkninger	17
Vigtige anvisninger før start	17
Klargøring af RNA	18
Opbevaring af prøver	18
Klargøring af reagenser og buffere	19
Eluering af virale nukleinsyrer	22
Udbytte og kvalitet af virale nukleinsyrer	23
Opsætning af QIAvac 24 Plus vacuum system	24
Protokol: Isolering og oprensning af virale nukleinsyrer fra plasma eller serum	27
Revisionshistorik	31

Kit-indhold

QIAamp DSP Virus Kit			
Katalognr.			60704
Antal forberedelser			50
QIAamp MinElute®	QIAamp MinElute Columns with Wash Tubes (QIAamp MinElute® kolonner med vaskerør) (WT) (2 ml)	COL	50
EXT	Column Extenders (kolonneforlængere) (3 ml)	COL EXT	50
ET	Elution Tubes (elueringsrør) (1,5 ml)	ELU TUBE	50
VC	VacConnectors (vakuumkonnektorer)	VAC CON	50
LT	Lysis Tubes (lysisrør) (2 ml)	LYS TUBE	50
WT	Wash Tubes (vaskerør) (2 ml)	WASH TUBE	50
AL	Lysis Buffer* (lysisbuffer)	LYS BUF	33 ml
AW1	Wash Buffer 1* (vaskebuffer 1) (koncentrat)	WASH BUF 1 CON	19 ml
AW2	Wash Buffer 2† (vaskebuffer 2) (koncentrat)	WASH BUF 2 CON	13 ml
AVE	Elution Buffer† (elueringsbuffer) (lilla hætter)	ELU BUF	4 x 2 ml
PS	Protease Solvent† (proteaseopløsningsmiddel)	QPROT SOLV	4,4 ml
Carrier (bærer)	Carrier RNA (bærer-RNA) (røde hætter)	CAR RNA	310
QP	QIAGEN® Protease (QIAGEN® protease)	QPROT	1 hætteglas

* Indeholder guanidinhydrochlorid. Ikke kompatibel med desinfektionsmidler, der indeholder blegemiddel. Se sikkerhedsinformation på side 8.

† Indeholder sodium azide som konserveringsmiddel.

‡ Genopslæmningsmængde 4.4 ml.

Symboler



Kit indeholder reagenser til 50 prøvepræparater



Se informationen i håndbogen



Skal anvendes inden

IVD

Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik

REF

Katalognummer

LOT

Lotnummer

MAT

Materialenummer

COMP

Komponenter

VOL

Volumen



Temperaturbegrænsninger



Ved levering



Producent

Vigtig bemærkning



Skift handsker efter protokoltrin med dette mærke



Åbnes ved levering; opbevar QIAamp Mini Spin Columns ved 2-8°C

GTIN

Globalt handelsvarenummer



Skriv den aktuelle dato ned efter tilsætning af ethanol til flasken

ADD

Tilsætter

CONT

Indeholder

LYOPH

Lyofiliseret

RCNS

Rekonstituér i

EtOH

Ethanol

GuHCl

Guanidinhydrochlorid

MALEIC ACID

Maleinsyre

SUBT

Subtilisin



Fører til

Opbevaringsforhold

QIAamp MinElute-kolonner bør opbevares ved 2-8 °C ved levering.

Alle buffere kan opbevares ved stuetemperatur (15-25°C).

Lyofiliseret bærer-RNA kan opbevares ved stuetemperatur indtil udløbsdatoen på kittets kasse. Bærer-RNA kan kun opløses i elueringsbuffer (AVE), og opløst bærer-RNA skal straks tilsættes lysisbuffer (AL) som beskrevet på side 19. Denne opløsning skal forberedes frisk og er stabil ved 2-8 °C i op til 48 timer. Ubrugte portioner bærer-RNA opløst i elueringsbuffer (AVE) bør nedfryses i aliquoter ved -20 °C.

Frysetørret QIAGEN-protease (QP) kan opbevares ved stuetemperatur indtil udløbsdatoen uden at påvirke dens ydelse.

Rekonstitueret QIAGEN-protease (QP) er stabilt i op til 1 år, når det opbevares ved temperaturer på 2-8 °C, men kun indtil kittets udløbsdato.

Rekonstitueret vaskebuffer 1 (AW1) og rekonstitueret vaskebuffer 2 (AW2) er stabile i 1 år, når opbevaret ved stuetemperatur, men kun indtil kittets udløbsdato.

Kvalitetskontrol

I henhold til QIAGENS certificerede totale kvalitetshåndteringssystem testes hvert lot QIAamp DSP Virus Kit mod forudbestemte specifikationer for at sikre konstant produktkvalitet.

Tilsigtet anvendelse

QIAamp DSP Virus Kit er et generisk system, der anvender QIAamp-teknologi til isolering og oprensning af virale nukleinsyrer fra prøver med humant plasma eller serum til in vitro-diagnostiske formål. Alle diagnostiske resultater, der genereres vha. prøvepræparatproceduren sammen med efterfølgende diagnostisk NAT-analyse, bør tolkes under hensyntagen til andre kliniske eller laboratorieresultater.

Produktet er beregnet til brug af professionelle brugere, såsom laboratoriepersonale og læger, der er uddannet i molekylærbioologiske teknikker. Det er beregnet til anvendelse sammen med enhver efterfølgende applikation, der anvender enzymatisk amplifikation eller anden enzymatisk modifikation af DNA eller RNA efterfulgt af signaldetektion eller amplifikation. De isolerede og oprensede virale nukleinsyrer kan bruges i kvalitative diagnostiske NAT-analyser (f.eks. blodscreening) og kvantitative diagnostiske NAT-analyser (f.eks. overvågning af viruskoncentrationer).

For at minimere uregelmæssigheder i de diagnostiske resultater skal dette produkt bruges sammen med en intern kontrol samt både positive og negative kontroller under hele processen med klargøring af prøven og prøveamplifikation og -påvisning i henhold til den anvendte efterfølgende analyse.

Dette produkt er designet til brug sammen med QIAvac 24 Plus Vacuum System eller et tilsvarende vakuumsystem.

Særlige anvisninger til brug af produktet

Dette kit er ikke beregnet til brug sammen med blod, væv, knoglemarv eller dyrkede celler. Kittet er heller ikke beregnet til isolering og oprensning af nukleinsyrer fra bakterier, svampe eller parasitter. Kittets evne til at isolere og oprense virale nukleinsyrer fra andre cellefri kropsvæsker, f.eks. urin og CSF, er ikke blevet evalueret.

Advarsler og forholdsregler

Der skal altid anvendes laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemikalier. Der henvises til de relevante sikkerhedsdatablade (safety data sheets, SDS) for yderligere information. Disse er tilgængelige online i et praktisk og kompakt PDF-format på adressen www.qiagen.com/safety, hvor det er muligt at finde, få vist og udskrive SDS'et for hvert QIAGEN-kit og hver kitkomponent.

FORSIGTIG: Tilsæt IKKE blegemiddel eller sure opløsninger til væskeaffaldet fra prøveklargøringen.

Lysisbuffer (AL) og vaskebuffer 1 (AW1) indeholder guanidinhydrochlorid, som kan danne højreaktive forbindelser, når de kombineres med blegemiddel. Hvis væske, der indeholder disse buffere, spildes, rengøres med egnet rengøringsmiddel til laboratorier og vand. Hvis den spildte væske indeholder potentielt smittefarlige stoffer, rengøres det påvirkede område først med rengøringsmiddel til laboratorier og vand og dernæst med 1 % (v/v) sodium hypochlorite.

Hvis bufferflaskerne er beskadigede eller lækker, bæres der handsker og beskyttelsesbriller, når flaskerne bortskaffes, for at undgå personskade eller skade på andre.

QIAGEN har ikke testet det flydende affald, der genereres af QIAamp DSP Virus-proceduren mht. resterende infektiøse materialer. Der skal derfor træffes universelle forholdsregler (handsker, kittel og øjenbeskyttelse) ved håndtering af potentielt smittefarligt materiale fra mennesker, når der arbejdes med dette produkt, og væskeaffald skal betragtes som smittefarligt og håndteres og bortskaffes i henhold til lokale sikkerhedsbestemmelser.

Følgende fare- og sikkerhedssætninger gælder komponenter i QIAamp DSP Virus Kit.

Buffer AL



Indeholder: guanidinhydrochlorid og maleinsyre. Advarsel! Kan være skadelig ved indtagelse eller ved indånding. Forårsager hudirritation. Kan forårsage allergisk hudreaktion. Forårsager alvorlig øjenirritation. Bær beskyttelseshandsker/beskyttelsestøj/øjebeskyttelse/ansigtsbeskyttelse.

Buffer AW1



Indeholder: guanidinhydrochlorid. Advarsel! Skadelig ved indtagelse eller ved indånding. Forårsager hudirritation. Forårsager alvorlig øjenirritation. Bær beskyttelseshandsker/beskyttelsestøj/øjebeskyttelse/ansigtsbeskyttelse.

QIAGEN-protease



Indeholder: subtilisin. Fare! Farlig ved indtagelse. Forårsager hudirritation. Forårsager alvorlig øjenskade. Kan forårsage allergi- eller astmasymptomer eller åndedrætsbesvær ved indånding. Kan forårsage åndedrætsbesvær. Undgå indånding af pulver/røg/gas/tåge/damp/spray. Bær beskyttelseshandsker/beskyttelsestøj/øjebeskyttelse/ansigtsbeskyttelse.



Anvend åndedrætsværn. VED KONTAKT MED ØJNENE: Skyl forsigtigt med vand i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis det kan gøres let. Fortsæt med at skylle. Ved eksponering eller mistanke om eksponering: Ring straks til GIFTLINJEN, eller søg læge. Flyt personen til et sted med frisk luft og sørg for, at vedkommende hviler i en stilling, som letter vejtrækningen.



Indledning

QIAamp DSP Virus Kit anvender veletableret teknologi til samtidig isolering og oprensning af viralt DNA og RNA. QIAamp DSP Virus-proceduren kombinerer en silicabaseret membrans selektive bindingsegenskaber med minimale elueringsvolumener på 20 µl eller 60 µl.

Proceduren er egnet til anvendelse sammen med plasma eller serum, som kan indeholde citrat eller EDTA. Prøver kan være enten friske, lyofiliserede eller frosne, hvis de ikke har været frosne og optøede mere end én gang. Denne procedure kan anvendes til isolering af viralt RNA og DNA fra en bred række RNA- og DNA-vira. Proceduren er designet til at minimere muligheden for prøve-til-prøve krydskontaminering og muliggøre sikker håndtering af potentielt smittefarlige prøver. Proceduren er særdeles velegnet til samtidig behandling af flere prøver. Virale nukleinsyrer elueres i elueringsbuffer (AVE), klar til anvendelse i amplifikationsreaktioner eller opbevaring ved -20 °C.

Princip og procedure

QIAamp DSP Virus-proceduren består af 4 trin:

- Lysering af viruspartikler i prøven
- Binding af virale nukleinsyrer i lysatet til membranen af en QIAamp MinElute-kolonnen
- Vask af membranen
- Eluering af virale nukleinsyrer fra membranen

Proceduren udføres via QIAamp MinElute-kolonner på en vakuummanifold.

Lysering af viruspartikler

Prøver bliver lyseret under denatureringsforhold ved forhøjede temperaturer. Lyseringen blev udført ved tilstedeværelsen af QIAGEN-protease (QP) og lysisbuffer (AL), som sammen sikrer inaktivering af RNaser.

Binding af nukleinsyrer til QIAamp MinElute-kolonne-membranen

For at kunne optimere bindingen af viralt DNA og RNA til QIAamp MinElute-kolonne-membranen tilsættes der først ethanol til lysaterne. Hvert lysat påsættes herefter en QIAamp MinElute-kolonne, og virale nukleinsyrer adsorberes på silicagel-membranen samtidig med, at lysatet trækkes igennem via vakuumtryk.

Fjernelse af restkontaminanter

Mens de virale nukleinsyrer forbliver bundet til QIAamp MinElute-kolonne-membranen, bliver kontaminanter effektivt vasket bort vha. den første vaskebuffer 1 (AW1) og dernæst vaskebuffer 2 (AW2).

Eluering af rene nukleinsyrer

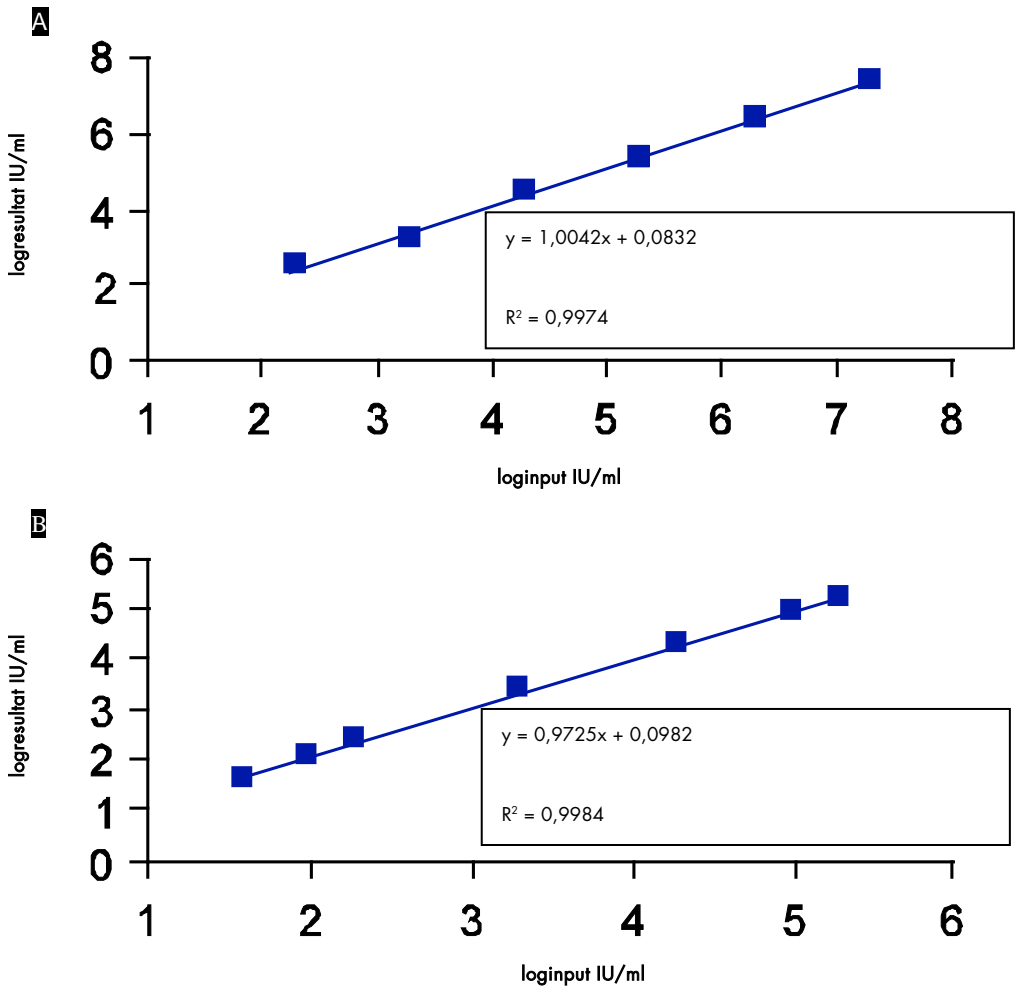
Virale nukleinsyrer elueres fra QIAamp MinElute-kolonne-membranen via elueringsbuffer (AVE). QIAamp MinElute-kolonner muliggør elueringsvolumener på 20 µl eller 60 µl.

Ydelsesegenskaber

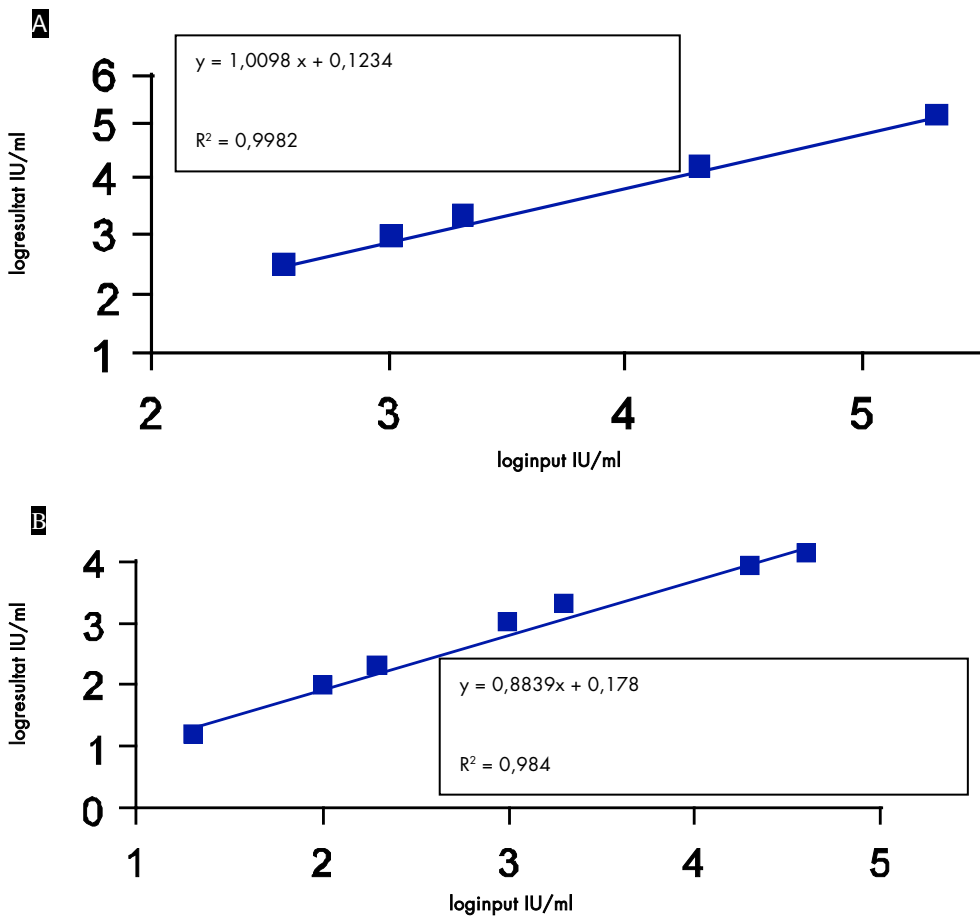
Det lineære område af QIAamp DSP Virus-proceduren er blevet bestemt for HIV RNA og HBV DNA i flere efterfølgende diagnostiske analyser (Tabel 1, Figur 1 og Figur 2).

Tabel 1.-Efterfølgende diagnostiske analyser, hvor det lineære område af QIAamp DSP Virus Procedure er blevet testet

Analyse	Kit
Realtids-RT-PCR af HIV RNA	TaqMan [®] -analyse og cobas [®] AMPLICOR HIV-1 MONITOR [®] Test
Realtids-PCR af HBV DNA	TaqMan-analyse og cobas AMPLICOR HBV MONITOR [®] Test



Figur 1. Lineært område af QIAamp DSP Virus Procedure via TaqMan-analyser. Det lineære af QIAamp DSP Virus-proceduren ved et 60 µl-elueringsvolumen blev bestemt via TaqMan-analyser for **A** HIV RNA og **B** HBV DNA.



Figur 2. Lineært område af QIAamp DSP Virus Procedure via cobas AMPLICOR MONITOR-tests. Det lineære af QIAamp DSP Virus-proceduren ved et 60 µl-elueringsvolumen blev bestemt via cobas AMPLICOR MONITOR-tests for **A** HIV RNA og **B** HBV DNA.

Påvisningsgrænsen (detection limit, DL) og kvantificeringsgrænsen (quantification limit, QL) i henhold til ICH-retningslinjerne 2QA og 2QB er fastlagt for QIAamp DSP Virus-proceduren (med en startprøvestørrelse på 500 µl og elueringsvolumener på 20 µl og 60 µl) via forskellige efterfølgende diagnostiske analyser (Tabel 2 og Tabel 3).

Tabel 2.-Påvisningsgrænse for QIAamp DSP Virus Procedure

Analyse	Elueringsvolumen	95 % cut off
artus [®] RealArt™ HBV DNA	20 µl	2,31 IU/ml (n=240)
artus RealArt HCV RNA	20 µl	24,31 IU/ml (n=192)
AMPLICOR manual HIV RNA	60 µl	90,92 IU/ml (n=209)
TaqMan HBV DNA	60 µl	4,73 IU/ml (n=192)

Tabel 3.-Kvantificeringsgrænse for QIAamp DSP Virus Procedure

Analyse	QL	CV
TaqMan HBV DNA	5,7 IE/ml	< 70% (n=88)
TaqMan HIV RNA	52 IE/ml	< 60% (n=88)
cobas AMPLICOR HIV RNA	100 IE/ml	< 60% (n=88)
cobas AMPLICOR HBV DNA	30 IE/ml	< 60% (n=88)
cobas AMPLICOR HCV RNA [®]	700 IE/ml	< 60% (n=66)

QIAamp DSP Virus Procedure

Prøve



Lysering



Binding

Vakuum



Vask
(AW1)

Fjern EXT, inden
der sættes
vakuum på

Vakuum



Vask
(AW2)

Vakuum



Vask
(ethanol)

Vakuum



Tørrecentrifuger



Eluér

Rene, virale nukleinsyrer

Læs protokollen (side 27) nøje, inden du starter.

Tilsæt 75 µl QP, 500 µl prøve og 500 µl AL til LT.

Vortex i 15 sekunder.

Inkubér i 15 minutter (\pm 1 minut) ved 56 °C (\pm 1 °C).

Tilsæt 600 µl ethanol.

Vortex i 15 sekunder.

Inkubér i 5 minutter (\pm 1 minut) ved stuetemperatur (15-25 °C).

Overfør lysat til QIAamp MinElute-kolonnen med påsat EXT.

Tilsæt 600 µl rekonstitueret AW1.

Fjern EXT.

Tilsæt 700 µl rekonstitueret AW2.

Tilsæt 750 µl ethanol.

Anbring QIAamp MinElute-kolonnen i WT.

Centrifuger i 1 minut ved 14.000 omdr./min.

Anbring QIAamp MinElute-kolonnen i WT.

Inkubér i 3 minutter ved 56 °C.

Anbring QIAamp MinElute-kolonnen i ET.

Tilsæt 20 µl eller 60 µl AVE.

Inkubér i 3 minutter ved stuetemperatur.

Centrifuger i 1 minut ved 14.000 omdr./min.

Udstyr og reagenser, der skal leveres af brugeren

Der skal altid anvendes laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemikalier. Læs mere i det relevante sikkerhedsdatablad (MSDS), der fås fra produktets leverandør.

- Ethanol (96–100%)
- Pipetter* og pipettespidser (for at forhindre krydskontaminering anbefaler vi på det kraftigste at anvende pipettespidser med aerosolskærme)
- Engangshandsker
- Varmeblok* til lysning af prøver ved 56 °C (vi anbefaler Eppendorf® Thermomixer comfort med termoblok til 2,0 ml mikroprøverør[†])
- Mikrocentrifuge*
- Målecylinder (50 ml)
- Vortexer
- QIAvac 24 Plus vacuum system (QIAvac 24 Plus, kat.nr. 19413, QIAvac Connecting System, kat.nr. 19419 og Vacuum Pump, kat.nr. 84020[‡]), eller et tilsvarende generelt laboratorievakuumsystem


* For at sikre, at prøver bliver behandlet korrekt i QIAamp DSP Virus-proceduren, anbefaler vi på det kraftigste, at instrumenter (f.eks. pipetter og varmeblokke) kalibreres i henhold til producentens anbefalinger.

[†] Dette er ikke en komplet liste over leverandører, og den indbefatter ikke mange vigtige forhandlere af biologiske artikler.

[‡] Kat.nr. 84020 henviser til en pumpe, der er velegnet til europæiske lande (f.eks. Tyskland). Kontakt QIAGENs tekniske service for at få oplysninger for lande med andre krav til spænding eller stik.

Vigtige bemærkninger

Vigtige anvisninger før start

- Når du har modtaget kittet, kontrolleres kittets komponenter for beskadigelse. Hvis blisterpakningerne eller bufferflaskerne er beskadigede, kontaktes QIAGENs tekniske service eller den lokale forhandler. I tilfælde af væskespild henvises til "Advarsler og forholdsregler" (side 8).
- Der må ikke anvendes beskadigede kitkomponenter, eftersom deres anvendelse kan føre til ringe ydeevne af kittet.
- Anvend altid RNase-frit udstyr.
- Opbevar ethanol (96-100 %) på is under proceduren.
- Udskift altid pipettespidser mellem væskeoverførsler. For at undgå krydskontaminering anbefaler vi anvendelse af pipettespidser med aerosolskærme.
- Alle centrifugeringstrin udføres ved stuetemperatur (15-25°C).
- Anvend altid engangshandsker og tjek regelmæssigt, at de ikke er kontamineret med prøvemateriale.
- Bortskaf handsker, hvis de kontamineres, og som minimum ved alle de trin, der er markeret med et handskesymbol. 
- For at undgå krydskontaminering åbnes der kun ét glas ad gangen.
- Anvend ikke kitkomponenter fra andre kits sammen med det kit, som du i øjeblikket anvender, medmindre lotnumrene er identiske.
- Undgå, at kitreagenserne udsættes for bakteriekontaminering.
- For at minimere risikoen for infektion fra potentielt smitsomt materiale anbefaler vi at arbejde under laminare luftstrømsforhold, indtil prøverne er lyserede.
- Dette kit bør kun anvendes af personale, der er uddannet i in vitro-diagnostisk laboratoriepraksis.

- Proceduren giver anvisninger på behandlingen af en enkelt plasma- eller serumprøve. Op til 24 prøver kan imidlertid behandles samtidigt på QIAvac 24 Plus-vakuumsystemet.

Klargøring af RNA

Ved klarlægning af viralt RNA skal du arbejde dig hurtigt gennem de manuelle trin af proceduren.

Elueringsbuffer (AVE) indeholder sodium azide*, som er et antibakterielt middel, der forhindrer væksten af RNase-producerende organismer. Da denne buffer ikke indeholder nogen RNase-nedbrydende kemiske stoffer, vil den ikke aktivt hæmme RNaser, der introduceres som følge af forkert håndtering. Der skal udvises ekstrem forsigtighed for at undgå kontaminering med RNaser ved håndtering af elueringsbuffer (AVE).

Opbevaring af prøver

Efter prøvetagning og centrifugering kan plasma eller serum opbevares ved 2-8 °C i op til 6 timer. Ved langtidsopbevaring anbefales det at fryse dem ned ved -20 °C eller -80 °C i alikvoter. Frosne plasma- eller serumprøver må ikke optøs mere end én gang. Gentagen fryse-optøning resulterer i denaturering og udfældning af proteiner, der resulterer i reducerede virale titre og derfor reduceret udbytte af virale nukleinsyrer. Cryopræcipitater, der er dannet under fryse-optøningen, vil endvidere tilstoppe QIAamp MinElute-kolonne-membranen. Hvis cryopræcipitater er synlige, bør de pelleres via centrifugering ved ca. 6800 x g i 3 minutter. Den rensede supernatant bør aspireres og behandles straks uden at forstyrre pelleten.

* Der skal altid anvendes laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemiske stoffer.

Klargøring af reagenser og buffere

Klargøring af QIAGEN-protease

Tilsæt hele indholdet af hætteglasset med 4,4 ml protaseopløsning (PS) til hætteglasset med frysetørret QIAGEN-protease (QP), og bland grundigt. For at undgå, at det skummer, blandes det ved at vende hætteglasset på hovedet adskillige gange. Sørg for, at QIAGEN-protease (QP) er fuldstændigt opløst.



Tilsæt ikke QIAGEN-protease (QP) direkte til lysisbuffer (AL).

Tilsætning af bærer-RNA og intern kontrol til lysisbuffer

Bærer-RNA tjener to formål. Først forbedrer det bindingen af virale nukleinsyrer til QIAamp MinElute-kolonne-membranen, specielt hvis der er meget få mål-molekyler i prøven. For det andet reducerer tilføjelsen af store mængder bærer-RNA risikoen for viral RNA-nedbrydning i de sjældne tilfælde, hvor RNase-molekyler ikke denatureres via de kaotropske salte og detergenter i lysisbuffer (AL). Hvis bærer-RNA ikke bliver tilsat til lysisbuffer (AL), kan dette føre til reduceret viral RNA- eller DNA-gendannelse.

Bærer-RNA kan også inkluderes i nogle interne kontrolreagenser i efterfølgende kommercielle analyser. I disse tilfælde skal du se den relevante brugsanvisning fra producenten af den efterfølgende analyse.

Vi anbefaler på det kraftigste brugen af en intern kontrol, når QIAamp DSP Virus Kit anvendes sammen med diagnostiske amplifikationssystemer. Internt kontrol-RNA eller -DNA og rekonstitueret bærer-RNA skal tilsættes til lysisbuffer (AL) og blandes grundigt ved at vende røret 10 gange. For at undgå skumning må der ikke bruges vortex.

Se producentens anvisninger for at fastlægge den optimale koncentration af intern kontrol. Anvendes der en anden koncentration end den anbefalede, kan det medføre forkerte

resultater. Ved beregningen af den korrekte mængde intern kontrol til brug skal du tage højde for startvolumen af prøven og elueringsvolumen. Husk, at QIAamp DSP Virus Kit bruger en startprøvevolumen på 500 µl.

For at klargøre bærer-RNA-opløsningen skal du tilsætte 310 µl elueringsbuffer (AVE) til røret med 310 µg lyofiliseret bærer-RNA for at opnå en opløsning på 1 µg/µl. Opløs bærer-RNA grundigt, del det op i alikvoter af passende størrelse, og opbevar det ved -20°C. Alikvoter af bærer-RNA må ikke fryse-optøes mere end 2 gange.

Bemærk! Bærer-RNA opløses ikke i lysisbuffer (AL). Det skal først opløses i elueringsbuffer (AVE) og dernæst tilsættes lysisbuffer (AL). Kontrollér, at bærer-RNA er helt opløst i det korrekte volumen af elueringsbuffer (AVE), inden det blandes med lysisbuffer (AL).



Brug altid den korrekte interne kontrol til den efterfølgende analyse. Se producentens anvisninger for at få flere oplysninger.

Beregn mængden af lysisbuffer (AL)/bærer-RNA-blandingen, der er nødvendig pr. batch af prøver, ved at vælge antallet af prøver, skal behandles samtidig, i Tabel 4. Mængderne beregnes ud fra følgende formel:

$$n \times 0,55 \text{ ml} = y \text{ ml}$$

$$y \text{ ml} \times 11,2 \text{ µl/ml} = z \text{ µl}$$

hvor: n = antallet af prøver, der skal behandles samtidig

y = den beregnede mængde af Lysis Buffer (AL)

z = mængden af bærer-RNA/elueringsbuffer (AVE), der skal tilsættes til lysisbuffer (AL)

Tabel 4.-Mængder af lysisbuffer (AL) og bærer-RNA/elueringsbuffer (AVE), der er påkrævet til QIAamp DSP Virus Procedure

Antal prøver	Mængde AL (ml)	Mængde bærer-RNA/AVE (µl)	Antal prøver	Mængde AL (ml)	Mængde bærer-RNA/AVE (µl)
1	0,55	6,2	13	7,15	80,0
2	1,10	12,3	14	7,70	86,0
3	1,65	18,5	15	8,25	92,4
4	2,20	24,6	16	8,80	98,6
5	2,75	30,8	17	9,35	104,7
6	3,30	37,0	18	9,90	110,9
7	3,85	43,1	19	10,45	117,0
8	4,40	49,3	20	11,00	123,2
9	4,95	55,0	21	11,55	129,4
10	5,50	61,6	22	12,10	135,5
11	6,05	67,8	23	12,65	141,7
12	6,60	73,9	24	13,20	147,8

Klargøring af vaskebuffer 1 (AW1)

Vha. en målecylinder tilsættes 25 ml ethanol (96-100 %) til flasken med 19 ml vaskebuffer 1 (AW1)-koncentrat. Opbevar den rekonstituerede vaskebuffer 1 (AW1) ved stuetemperatur (15-25°C).



Bland altid den rekonstituerede vaskebuffer 1 (AW1) ved at vende flasken på hovedet adskillige gange, før proceduren startes.

Klargøring af vaskebuffer 2 (AW2)

Vha. en målecylinder tilsættes 30 ml ethanol (96-100 %) til flasken med 13 ml vaskebuffer 2 (AW2)-koncentrat. Opbevar den rekonstituerede vaskebuffer 2 (AW2) ved stuetemperatur (15-25°C).



Bland altid den rekonstituerede vaskebuffer 2 (AW2) ved at vende flasken på hovedet adskillige gange, før proceduren startes.

Klargøring af elueringsbuffer (AVE)

Fire rør med elueringsbuffer (AVE) er inkluderet i kittet. Sørg for ikke at kontaminere bufferen med RNaser. Hvis der udføres 4 oprensingsprocedurer eller derunder med ét kit, anbefaler vi, at du bortskaffer røret med elueringsbuffer (AVE) ved afslutningen af hver procedure.

Eluering af virale nukleinsyrer

For efterfølgende applikationer, der kræver små startvolumener (f.eks. visse PCR- og RT-PCR-analyser), kan brugen af virale nukleinsyrer i 20 µl elueringsbuffer (AVE) muligvis øge analysesensitiviteten.

Mængden af virale nukleinsyrer elueret fra en QIAamp MinElute-kolonne kan være op til 5 µl mindre end mængden af elueringsbuffer (AVE), der tilsættes til kolonnen. Hvis du f.eks. eluerer virale nukleinsyrer med 60 µl elueringsbuffer (AVE), fører det til et eluat på ca. 55 µl, mens en eluering med 20 µl fører til ca. 15 µl eluat.

Mængden af genfundet eluat afhænger af prøvens beskaffenhed. Hvis mængden af genfundet eluat er for lille til den efterfølgende analyse, skal du øge mængden ved at tilsætte mere elueringsbuffer (AVE).

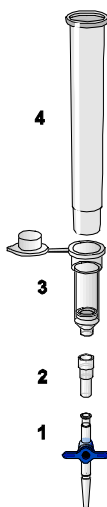
Eluerede virale nukleinsyrer indsamles i elueringsrør (ET). Hvis de virale nukleinsyrer skal opbevares i op til 24 timer, anbefaler vi, at de opbevares ved 2-8°C.

Udbytte og kvalitet af virale nukleinsyrer

Udbyttet og kvaliteten af de isolerede virale nukleinsyrer er egnet til alle typer efterfølgende detektionsprocedurer i molekulære diagnostikker. Diagnostiske analyser bør udføres i henhold til producentens anvisninger.

Opsætning af QIAvac 24 Plus vacuum system

Kontrollér, at du har opsat kolonneforlænger(EXT), QIAamp MinElute-kolonne, vakuumbeketter(VC) og VacValve korrekt (se Figur 3).



Figur 3. Samling af komponenterne til QIAamp DSP Virus Kit til vakuumbehandling af prøver:

1: VacValve (følger med vakuumsystemet)

3: QIAamp MinElute-kolonne

2: Vakuumbeketter (VC)

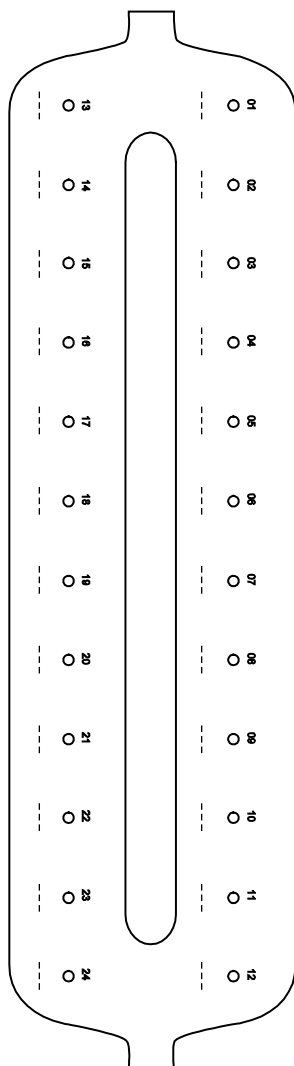
4: Kolonneforlænger (EXT)

Vi anbefaler, at du mærker lysisrør (LT), elueringsrør (ET) og QIAamp MinElute-kolonner til brug på QIAvac 24 Plus vacuum system i henhold til skemaet i Figur 4 for at undgå sammenblanding af prøver. Denne figur kan fotokopieres og mærkes med navnene på prøverne.

Dato: _____

Bruger: _____

Kørsels-ID: _____



Figur 4. Etiketteringsoversigt over lysisrør (LT), elueringsrør (ET) og QIAamp MinElute-kolonner til anvendelse på QIAvac 24 Plus vacuum system.

Protokol: Isolering og oprensning af virale nukleinsyrer fra plasma eller serum

Til isolering og oprensning af virale nukleinsyrer fra 500 µl EDTA- eller citratbehandlet plasma og serum.

Ting, der skal gøres før start

- Ækvilibrér prøver til stuetemperatur (15-25 °C), og sørg for, at de er blandet godt.
- Tilsæt bærer-RNA rekonstitueret i elueringsbuffer (AVE) eller intern kontrol til lysisbuffer (AL) i henhold til anvisningerne på side 19.
- Sørg for, at vaskebuffer 1 (AW1), vaskebuffer 2 (AW2) og QIAGEN-protease (QP) er blevet klargjort i henhold til anvisningerne i "Vigtige bemærkninger" på side 17.
- Ækvilibrér elueringsbuffer (AVE) til stuetemperatur (15-25 °C) til anvendelse i trin 18. Anvend om muligt frisk elueringsbuffer (AVE) til hver procedure (4 rør medfølger).
- Indstil en varmeblok til 56 °C til anvendelse i trin 4 og 17.
- For at undgå krydskontaminering isættes en vakuumkonnektor (VC) på hver lueradapter på vakuumsystemet.
- Sørg for, at affaldsflasken på vakuumsystemet er tom og at alle koblinger er forbundet korrekt.
- Se den vedlagte håndbog for at få yderligere oplysninger om vakuumsystemets drift, særligt vedligeholdelse.

Procedure

1. Pipetter 75 µl QIAGEN-protease (QP) til et lysisrør (LT).



Kontrollér udløbsdatoen på det rekonstituerede protease før anvendelse.

2. Tilsæt 500 µl plasma eller serum til lysisrøret (LT).

3. Tilsæt 500 µl lysisbuffer (AL) (med 11,2 µg/ml bærer-RNA) til lysisrøret (LT), luk låget, og bland via impuls-vortexmixer i 15 sekunder.

For at sikre effektiv lysering er det væsentligt, at prøven og lysisbuffer (AL) blandes grundigt for at give en homogen opløsning.



Lysisbuffer (AL) indeholder intern kontrol. Eftersom lysisbuffer (AL) har en høj viskositet, sørges der for, at den korrekte mængde lysisbuffer (AL) tilsættes ved nøje pipettering eller ved hjælp af en egnet pipette såsom en Eppendorf multistep-pipette eller lignende.



Tilsæt ikke QIAGEN-protease (QP) direkte til lysisbuffer (AL).

4. Inkuber ved 56 °C (± 1 °C) i 15 minutter (± 1 minut).
5. Centrifuger lysisrøret (LT) i ≥ 5 sekunder ved fuld hastighed for at fjerne dråber fra den indvendige side af låget.



6. Skift handsker, og åbn lysisrøret (LT) forsigtigt.
7. Tilsæt 600 µl ethanol (96–100 %) til lysisrøret (LT), luk låget, og bland grundigt med impuls-vortexmixer i ≥ 15 sekunder. Inkubér i 5 minutter (± 1 minut) ved stuetemperatur (15-25 °C).
8. Centrifuger lysisrøret (LT) i ≥ 5 sekunder ved fuld hastighed for at fjerne dråber fra den indvendige side af låget.
9. Isæt QIAamp MinElute-kolonnen i vakuumkonnektoren (VC) på vakuumsystemet (se Figur 3, side 24). Isæt en kolonneforlænger (EXT) i den åbne QIAamp MinElute-kolonne.



Behold vaskerøret (WT) til tørrecentrifugering i trin 16.



10. Skift handsker, og åbn kun ét rør ad gangen.
11. Tilsæt forsigtigt hele lysatet fra trin 7 til kolonneforlænger (EXT) i QIAamp MinElute-kolonnen uden at gøre kanten våd. Undgå at røre QIAamp MinElute-kolonne-membranen med pipettespidsen.

12. Tænd for vakuumpumpen. Når lysatet er blevet trukket gennem QIAamp MinElute-kolonnen, åbnes ventilen på vakuumsystemet og vakuuet udløses.

Hvis der behandles flere QIAamp MinElute-kolonner samtidig, anbefaler vi at lukke VacValve på hver kolonne, når lysatet er passeret igennem for at kunne reducere varigheden af dette vakuumtrin.



Hvis lysatet ikke er passeret helt igennem membranen efter 15 minutter, skal du kassere QIAamp MinElute-kolonnen og gentage proceduren med en ny prøve.



Vakuumsystemets ventil bør anvendes til hurtig udløsning af vakuumtrykket.

13. Tilsæt 600 µl vaskebuffer 1 (AW1) til QIAamp MinElute-kolonnen. Fjern forsigtigt kolonneforlænger (EXT), bortskaf den, og luk ventilen på vakuumsystemet. Når vaskebuffer 1 (AW1) er blevet trukket gennem QIAamp MinElute-kolonnen, åbnes ventilen og vakuuet udløses.



For at undgå krydskontaminering skal du sikre dig, at fjernede kolonneforlængere (EXT) ikke kommer hen over QIAamp MinElute-kolonner, der ligger ved siden af.

14. Tilsæt 750 µl vaskebuffer 2 (AW2) til QIAamp MinElute-kolonnen uden at gøre kanten våd. Undgå at røre QIAamp MinElute-kolonne-membranen med pipettespidser. Lad låget på kolonnen stå åbent, og luk ventilen på vakuumsystemet. Når vaskebuffer 2 (AW2) er blevet trukket gennem QIAamp MinElute-kolonnen, åbnes ventilen og vakuuet udløses.

15. Tilsæt 750 µl ethanol (96-100 %) til QIAamp MinElute-kolonnen uden at gøre kanten våd. Undgå at røre QIAamp MinElute-kolonne-membranen med pipettespidser. Lad låget på kolonnen stå åbent, og luk ventilen på vakuumsystemet. Når ethanol er blevet trukket gennem QIAamp MinElute-kolonnen, åbnes ventilen og vakuuet udløses.



Brug pipettespidser med aerosolbarriere til at tilsætte ethanol til QIAamp MinElute-kolonnen.

16. Luk låget på QIAamp MinElute-kolonnen, fjern den fra vakuumsystemet og bortskaf vakuumkonnektoren (VC). Anbring QIAamp MinElute-kolonnen i vaskerøret (WT), som er

gemt fra trin 9, og centrifuger ved fuld hastighed (ca. 20.000 x g eller 14.000 rpm) i 1 minut for at tørre membranen helt. Bortskaf vaskerøret (WT) med filtratet.



Undlades tørrecentrifugeringen, kan det føre til hæmning af den efterfølgende analyse.

17. Anbring QIAamp MinElute-kolonnen i et nyt vaskerør (WT), og inkubér med åbent låg ved 56 °C i 3 minutter, så eventuel resterende væske fordamper.

18. Anbring QIAamp MinElute-kolonnen i et rent elueringsrør (ET), og bortskaf vaskerøret (WT). Åbn forsigtigt låget på QIAamp MinElute-kolonnen, og tilsæt 20 µl eller 60 µl elueringsbuffer (AVE) (alt efter den efterfølgende analyse) til midten af membranen. Luk låget, og inkubér ved stuetemperatur (15-25 °C) i ≥3 minutter. Centrifuger ved fuld hastighed (ca. 20.000 x g eller 14.000 rpm) i 1 minut for at eluere de virale nukleinsyrer.



Følg vedligeholdelsesproceduren for vakuumsystemet efter udførelse af denne protokol (se håndbogen, der var vedlagt vakuumsystemet for yderligere oplysninger).

For opdateret licensinformation og produktspecifikke ansvarsfraskrivelser henvises til den aktuelle QIAGEN kit-håndbog eller -brugermanual. QIAGEN kit-håndbøger og -brugermanualer kan fås via www.qiagen.com eller kan rekvireres hos QIAGENS tekniske service eller den lokale distributør.

Revisionshistorik

Revisionshistorik for dokumentet

R3 08/2018	Tilføjet forklarende fodnote om Vacuum Pump-kat.nr., se side 16. Advarsler og forholdsregler er blevet opdateret Håndbogens format er blevet opdateret.
---------------	---

Denne side skal være tom

Denne side skal være tom

Denne side skal være tom

Aftale om begrænset licens for QIAamp DSP Virus Kit

Brug af dette produkt betyder, at enhver køber eller bruger af produktet accepterer følgende vilkår:

1. Produktet må kun anvendes i overensstemmelse med protokoller leveret med produktet og denne håndbog og kun med de komponenter, der er i kittet. QIAGEN giver ingen licens, under nogen intellektuel ejendomsret, til at bruge eller inkludere komponenterne i dette kit med komponenter, der ikke er inkluderet i dette kit, undtagen som beskrevet i de protokoller, der følger med produktet, denne håndbog og andre protokoller, der er tilgængelige på www.qiagen.com. Nogle af disse andre protokoller er stillet til rådighed af QIAGEN-brugere for QIAGEN-brugere. Disse protokoller er ikke grundigt testet eller optimeret af QIAGEN. QIAGEN hverken garanterer for dem eller for, at de ikke overtræder tredjeparts rettigheder.
2. Ud over de udtrykkeligt givne licenser giver QIAGEN ingen garanti for, at dette kit og/eller brugen af det, ikke overtræder tredjeparts rettigheder.
3. Dette kit og dets komponenter er under licens til engangsbrug og må ikke genbruges, gendannes eller videresælges.
4. QIAGEN afviser specifikt alle andre licenser, udtrykte eller underforståede, end dem, der udtrykkeligt er angivet.
5. Køberen og brugeren af kittet indvilliger i ikke at tage, eller lade andre tage, skridt der kunne føre til, eller fremme, handlinger der forbydes ovenfor. QIAGEN kan håndhæve forbuddene i denne begrænsede licensaftale ved enhver domstol og vil inddrive alle undersøgelses- og retsomkostninger, herunder advokatsalærer, i ethvert søgsmål for at håndhæve denne begrænsede licensaftale samt alle deres intellektuelle ejendomsrettigheder i forbindelse med kittet og/eller komponenterne deri.

Opdaterede licensbetingelser kan findes på www.qiagen.com.

Varemærker: QIAGEN®, QIAamp®, *artus*®, MinElute® (QIAGEN Group); AMPLICOR HBV MONITOR®, AMPLICOR HCV MONITOR®, AMPLICOR HIV-1 MONITOR®, cobas®, TaqMan® (Roche Group); RealArt™ (artus GmbH); Eppendorf® (Eppendorf AG). Registrerede navne, varemærker osv., der bruges i dette dokument, er beskyttet af den relevante lovgivning, også når disse ikke er specifikt markeret som sådan.

1114514 08/2018 HB-0109-003 © 2018 QIAGEN, alle rettigheder forbeholdes.

Bestilling www.qiagen.com/shop | Teknisk support support.qiagen.com | Websted www.qiagen.com