

September 2019

QIAamp[®] DSP Circulating NA Kit Bruksanvisning (håndbok)

Versjon 1



50

IVD

CE

REF

61504



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden

R4 MAT

1118364

Sample to Insight



Innhold

| | |
|---|----|
| Tiltenkt bruk | 4 |
| Sammendrag og forklaring | 4 |
| Prosedyreprinsipper | 5 |
| Prøvevolum | 5 |
| Lyseringsprøver | 7 |
| Adsorpsjon til QIAamp Mini-kolonmembranen..... | 7 |
| Fjerning av resterende kontaminanter..... | 7 |
| Elusjon av rene nukleinsyrer..... | 8 |
| Utbytte og størrelse for nukleinsyrer | 8 |
| Beskrivelse av protokoller | 9 |
| Materialer som medfølger..... | 10 |
| Settets innhold..... | 10 |
| Materialer som er nødvendige, men som ikke medfølger | 11 |
| Advarsler og forholdsregler..... | 12 |
| Håndtering og oppbevaring av reagenser | 15 |
| Oppbevaring og håndtering av prøver..... | 16 |
| Prosedyre | 17 |
| Klargjøring av buffere og reagenser | 25 |
| Breeze-protokoll: Rensing av sirkulerende Nukleinsyrer fra 1–5 ml med humant blodplasma | 28 |
| Classic-protokoll: Rensing av sirkulerende Nukleinsyrer fra 1–5 ml humant blodplasma..... | 33 |
| Kvalitetskontroll | 38 |

| | |
|--|----|
| Begrensninger | 38 |
| Symboler | 39 |
| Referanser | 41 |
| Kontaktinformasjon | 41 |
| Feilsøkingsveiledning | 42 |
| Vedlegg A: Anbefaling for separasjon og oppbevaring av blodplasma..... | 44 |
| Vedlegg B: Generelle kommentarer om håndtering av RNA..... | 46 |
| Bestillingsinformasjon | 47 |
| Endringshistorikk for håndbok | 48 |

Tiltenkt bruk

QIAamp DSP Circulating NA Kit er et system som bruker en silikamembranteknologi (QIAamp-teknologi) til isolasjon og rensing av sirkulerende cellefritt DNA og RNA fra humane blodplasmaprøver.

Produktet er beregnet for bruk av profesjonelle brukere, for eksempel teknikere og leger, som har fått opplæring i molekylærbiologiske teknikker.

QIAamp DSP Circulating NA Kit er beregnet på in vitro-diagnostisk bruk.

Sammendrag og forklaring

Fritt sirkulerende nukleinsyrer er til stede i humane plasma vanligvis som korte fragmenter, <1000 bp (DNA), <1000 nt (RNA) eller så små som 20 nt (miRNAs). Konsentrasjonen av fritt sirkulerende nukleinsyrer i humant blodplasma er vanligvis lav og varierer betydelig mellom individer fra 1–100 ng/ml i humane prøver (1–5).

QIAamp DSP Circulating NA Kit muliggjør effektiv rensing av sirkulerende nukleinsyrer fra humane plasma. Prøver kan enten være ferske eller frosne. Forlengelsesrør og vakuumbehandling på QIAvac 24 Plus muliggjør startprøvevolumer på opptil 5 ml, og fleksible elueringsvolumer mellom 20–150 µl tillater konsentrasjon av nukleinsyrearter som er til stede i lave konsentrasjoner.

Eluert fritt sirkulerende genomisk DNA eller RNA er klart til bruk i nedstrømsapplikasjoner eller egnet for lagring. QIAamp DSP Circulating NA Kit gir effektiv fjerning av proteiner, nukleaser og andre urenheter.

Prosedyreprinsipper

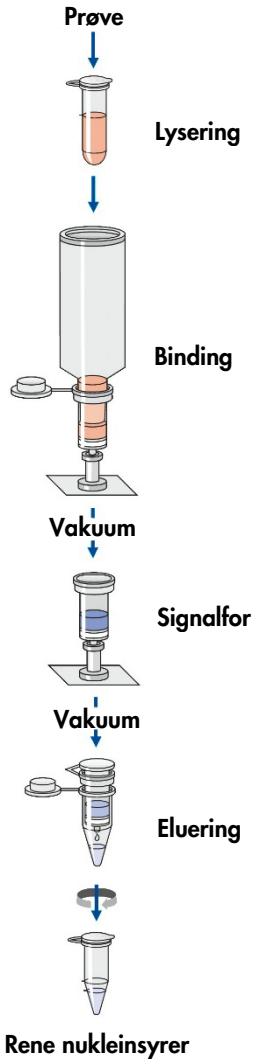
QIAamp DSP Circulating NA-prosedyren består av 4 trinn (lysere, binde, vaske og eluere) og utføres ved hjelp av QIAamp Mini-kolonner på QIAvac-systemet. Den robuste prosedyren bidrar til å minimere krysskontaminering fra prøve til prøve og øker brukersikkerheten ved håndtering av potensielt smittsomme prøver.

Den enkle prosedyren egner seg til samtidig behandling av opptil 24 prøver på mindre enn 2 timer.

Prøvevolum

QIAamp Mini -kolonner binder fragmenterte nukleinsyrer som er så korte som 20 nt, men utbyttet avhenger av prøvevolumet og konsentrasjonen av sirkulerende nukleinsyrer i prøven (vanligvis 1–100 ng/ml i plasma). QIAamp DSP Circulating NA-prosedyren er optimalisert for prøvevolumer på opptil 5 ml.

QIAamp DSP Circulation NA Kit-prosedyre



Figur 1. Oversikt over QIAamp DSP Circulating NA Kit-prosedyren

Lyseringsprøver

Fritt sirkulerende nukleinsyrer i biologiske væsker er vanligvis bundet til proteiner eller innhyllet i vesikler, noe som krever et effektivt lyseringstrinn for å frigjøre nukleinsyrer for selektiv binding til QIAamp Mini-kolonnen. Prøver lyseres derfor under høyst denaturerende betingelser ved økte temperaturer i nærvær av proteinase K og Buffer ACL, noe som sikrer inaktivering av DNaser og RNaser og frigjøring av nukleinsyrer fra bundne proteiner, lipider og vesikler.

Adsorpsjon til QIAamp Mini-kolonmembranen

For å tillate optimal binding av de sirkulerende nukleinsyrene til membranen, justeres bindingsbetingelsene ved tilsetning av Buffer ACB til lysatet. Lysater overføres deretter til en QIAamp Mini-kolonne, og sirkulerende nukleinsyrer blir adsorbert fra et stort volum på silikamembranen når lysatet trekkes gjennom av vakuumtrykk. Salt- og pH-forhold sikrer at de fleste proteiner og andre kontaminanter, som kan hemme PCR og andre nedstrøms enzymatiske reaksjoner, ikke beholdes på QIAamp Mini-kolonmembranen.

En vakuumanifold (f.eks. QIAvac 24 Plus med QIAvac Connecting System) og en vakuumpumpe som er i stand til å produsere et vakuum på ~ 800–900 mbar (f.eks. QIAGEN® Vacuum Pump) er påkrevd for protokollen. En Vacuum Regulator bør brukes (en del av QIAvac Connecting System) for enkel overvåking av vakuumtrykk og praktisk vakuumløsning.

Fjerning av resterende kontaminanter

Nukleinsyrer holder seg bundet til membranen, mens kontaminanter vaskes effektivt bort i løpet av 3 vasketrinn.

Elusjon av rene nukleinsyrer

Elusjon utføres ved bruk av Buffer AVE. I et enkelt trinn elueres svært rene sirkulerende nukleinsyrer i Buffer AVE, ekvilibrert til romtemperatur. Et fleksibelt elueringsvolum på 50–150 µl kan brukes. Hvis det kreves høyere nukleinsyrekonsentrasjoner, kan elueringsvolumet reduseres til så lite som 20 µl. Elueringsvolumer lavere enn 50 µl fører til nukleinsyreeluatet med høyere konsentrasjon, men kan resultere i lavere totalutbytte.

Eluatvolumet som gjenvinnes kan være opptil 5 µl mindre enn volumet på elusjonsbufferen som ble brukt på kolonnen.

Utbytte og størrelse for nukleinsyrer

Utbyttet av fritt sirkulerende nukleinsyrer isolert fra biologiske prøver er normalt under 1 µg og er derfor vanskelig å bestemme med et spektrofotometer. Det absolutte utbyttet av sirkulerende DNA og RNA hentet fra en prøve ved bruk av QIAamp DSP Circulating NA Kit varierer mellom prøver fra forskjellige individer, og avhenger også av andre faktorer (f.eks. visse sykdomstilstander). I tillegg vil bærer-RNA som finnes i de ekstraherte nukleinsyrene sannsynligvis dominere UV-absorbansavlesninger (se side 26). Kvantitative amplifikasjonsmetoder anbefales for å bestemme ytelser.

Størrelsesfordelingen på sirkulerende nukleinsyrer renses ved hjelp av QIAamp DSP Circulating NA Kit kan kontrolleres ved agarosegelelektroforese eller hybridisering til en målspesifikk, merket probe⁵ eller en mikrofluidisk elektroforeseløsning (f.eks. Agilent Bioanalyzer).

Beskrivelse av protokoller

Det er to forskjellige protokoller i denne håndboken.

«Breeze-protokoll: Rensing av sirkulerende Nukleinsyrer fra 1–5 ml med humant blodplasma» (side 28) er for behandling av opptil 5 ml plasma i trinn på 1 ml og er optimalisert for lite praktisk behandling og kort behandlingstid.

«Classic-protokoll: Rensing av sirkulerende Nukleinsyrer fra 1–5 ml humant blodplasma» (side 33) er for behandling av opptil 5 ml plasma i trinn på 1 ml og utgjør den uendrede protokollen til revisjon 3 (R3) av QIAamp DSP Circulating NA Kit-håndboken.

Materialer som medfølger

Settets innhold

| | | | |
|--------------------------------------|---|------------------------|--------------|
| QIAamp DSP Circulating NA Kit | | | (50) |
| Katalognr. | | | 61504 |
| Antall klargjøringer | | | 50 |
| QIAamp Mini | QIAamp Mini columns with Wash Tubes (QIAamp Mini-kolonner med vaskerør) (WT) (2 ml) | COL | 50 |
| EXT | Column Extenders (Kolonneforlengere) (20 ml) | COL EXT | 2 x 25 |
| WT | Wash Tubes (Vaskerør) (2 ml) | WASH TUBE | 50 |
| ET | Elution Tubes (Elusjonsrør) (1,5 ml) | ELU TUBE | 50 |
| VC | VacConnectors | VAC CON | 50 |
| ACL* | Lysis Buffer* (Lyseringsbuffer*) | LYS BUF | 220 ml |
| ACB* | Binding Buffer* (Bindende buffer*) (konsentrat) | BIND BUF CONC | 300 ml |
| ACW1* | Wash Buffer 1* (Vaskebuffer 1) (konsentrat) | WASH BUF 1 CONC | 19 ml |
| ACW2† | Wash Buffer 2† (Vaskebuffer 2) (konsentrat) | WASH BUF 2 CONC | 13 ml |
| AVE† | Elution Buffer† (Elueringsbuffer) (lilla lokk) | ELU BUF | 5 x 2 ml |
| PROTK | QIAGEN Proteinase K | PROTK | 4 x 7 ml |
| Carrier | Carrier RNA (Bærer-RNA) (røde lokk) | CAR RNA | 310 µg |
| | Håndbok | H B | 1 |

* Inneholder et kaotropisk salt. Se side 12 for Advarsler og forholdsregler.

† Inneholder natriumazid som konserveringsmiddel.

Materialer som er nødvendige, men som ikke medfølger

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. Se gjeldende sikkerhetsdatablad (Safety Data Sheet, SDS) som leveres av leverandøren av produktet, hvis du ønsker mer informasjon.

Se til at instrumentene er kontrollert og kalibrert i henhold til produsentens anbefalinger.

For alle protokoller

- Pipetter (justerbare)
- Sterile pipettespisser (pipettespisser med aerosolbarrierer anbefales for å forhindre krysskontaminering)
- Vannbad eller varmeblokk med plass til 50 ml sentrifugerør ved 56 °C eller 60 °C*
- Varmeblokk eller lignende ved 56 °C med plass til 2 ml vaskerør (bare for Classic-protokollen)*
- Mikrosentrifuge (med rotor for 2 ml rør)*
- 50 ml sentrifugerør
- QIAvac 24 Plus vacuum manifold (kat.nr. 19413)
- QIAvac Connecting System (kat.nr. 19419) eller tilsvarende
- Vacuum Pump (kat. nr. 84010 [USA og Canada], 84000 [Japan] eller 84020 [resten av verden]) eller tilsvarende pumpe i stand til å produsere et vakuum fra -800 til -900 mbar
- Etanol (96–100 %)[†]
- Isopropanol (100 %)
- Knust is (bare for «Classic-protokoll: Rensing av sirkulerende Nukleinsyrer fra 1–5 ml humant blodplasma».)
- Noen prøver kan kreve fortykning med fosfatbufret saltvann (Phosphate-Buffered Saline, PBS)
- Valgfritt: VacValves (kat.nr. 19408)

* Se til at instrumentene er kontrollert og kalibrert i henhold til produsentens anbefalinger.

[†] Denaturert alkohol som inneholder andre stoffer, som metanol eller metyletylketon, må ikke brukes.

Advarsler og forholdsregler

Til bruk i in vitro-diagnostikk

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. Se gjeldende sikkerhetsdatablader (Safety Data Sheets, SDS) hvis du ønsker mer informasjon. Disse er tilgjengelige i praktisk og kompakt PDF-format online på www.qiagen.com/safety, der du kan søke etter, vise og skrive ut sikkerhetsdatabladet for hvert QIAGEN-sett og hver settkomponent.

ADVARSEL

Risiko for personskader



IKKE tilsett blekemidler eller sure løsninger direkte i prøveklargjøringsavfallet.

Buffer ACL, Buffer ACB og Buffer ACW1 inneholder guanidinsalter, som kan danne svært reaktive sammensetninger når de kombineres med klor.

Hvis du søler væske som inneholder disse bufferne, må du rengjøre med egnet laboratorievaskemiddel og vann. Hvis væsken som søles inneholder potensielt smittefarlige stoffer, må du først rengjøre det berørte området med laboratorievaskemiddel og vann, og deretter med 1 % (v/v) natriumhypokloritt.

Følgende fare- og risikosetninger og forholdsregler gjelder komponentene i QIAamp DSP Circulating NA Kit.

Buffer ACB



Inneholder guanidintiocyanat. Fare! Skadelig ved svelging. Kan være farlig ved hudkontakt eller innånding. Gir alvorlige etseskader på hud og øyne. Skadelig for vannlevende organismer – med langvarige effekter. Ved kontakt med syrer utvikles meget giftig gass. Benytt vernehansker/verneklær/vernebriller/ansiktsskjerm. VED KONTAKT MED ØYNENE: Skyll forsiktig med vann i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser dersom dette enkelt lar seg gjøre. Fortsett skyllingen. Ta kontakt med GIFTINFORMASJONEN eller lege umiddelbart.

Buffer ACL



Inneholder guanidintiocyanat. Fare! Skadelig ved svelging. Kan være farlig ved hudkontakt eller innånding. Gir alvorlige etseskader på hud og øyne. Skadelig for vannlevende organismer – med langvarige effekter. Ved kontakt med syrer utvikles meget giftig gass. Benytt vernehansker/verneklær/vernebriller/ansiktsskjerm. VED KONTAKT MED ØYNENE: Skyll forsiktig med vann i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser dersom dette enkelt lar seg gjøre. Fortsett skyllingen. Ta kontakt med GIFTINFORMASJONEN eller lege umiddelbart.

Buffer ACW1



Inneholder: guanidinhydroklorid. Advarsel! Farlig ved svelging eller innånding. Irriterer huden. Forårsaker alvorlig øyeirritasjon. Benytt vernehansker/verneklær/vernebriller/ansiktsskjerm.

Proteinase K



Inneholder: Proteinase K. Fare! Forårsaker mild hudirritasjon. Kan gi allergi eller astmasymptomer eller pustevansker ved innånding. Unngå å puste inn støv/avgasser/gass/tåke/damper/spray. Benytt vernehansker/verneklær/vernebriller/ansiktsskjerm. Benytt åndedrettsvern. Ved eksponering eller mistanke om eksponering: Ta kontakt med GIFTINFORMASJONEN eller lege. Flytt personen til frisk luft, og sørg for at vedkommende har en stilling som letter åndedrettet.

Håndtering og oppbevaring av reagenser

QIAamp Mini-kolonner skal oppbevares tørt ved 2–8 °C. Alle buffere skal oppbevares ved romtemperatur (15–25 °C). QIAamp Mini-kolonner og buffere kan lagres under disse forholdene frem til utløpsdatoen på settets eske, uten å vise reduksjon i ytelse.

Lyofilisert bærer-RNA skal lagres ved romtemperatur (15–25 °C) frem til utløpsdatoen på komponentetiketten. Bærer-RNA skal løses opp i Buffer AVE. Oppløst bærer-RNA skal umiddelbart tilføres Buffer ACL, slik det er beskrevet på side 29 for Breeze-protokollen og på side 34 for Classic-protokollen. Denne løsningen skal klargjøres fersk og er stabil ved 2–8 °C i opptil 48 timer. Ubrukte porsjoner av bærer-RNA løst i Buffer AVE skal fryses i alikvoter ved -30 til -15 °C.

QIAamp DSP Circulating NA Kit inneholder en bruksklar proteinase K-løsning, som løses opp i en spesiallaget oppbevaringsbuffer. Proteinase K er stabil til utløpsdatoen på komponentetiketten når den oppbevares ved romtemperatur (15–25 °C).

Oppbevaring og håndtering av prøver

Oppbevaring og håndtering av blod

For å unngå degradering av cellefrie nukleinsyrer og frigjøring av cellulære nukleinsyrer, anbefaler vi lagring av fullblod i maksimum 6 timer ved 2–8 °C (f.eks. EDTA-prøver). Ved bruk av stabiliserte blodprøvetakingsrør, må lagringsbetingelsene fra produsenten vurderes. Vi anbefaler å validere disse lagringsbetingelsene i kombinasjon med den spesifikke målet.

Håndtering og oppbevaring av plasma

Det er anbefalt å utføre plasmaseparasjon og nukleinsyreisolering umiddelbart etter bloddonasjon ved bruk av EDTA som antikoagulant, spesielt for RNA. Ved kortsiktig oppbevaring kan plasmaet oppbevares i opptil 24 timer ved 2–8 °C.

Ved langsiktig oppbevaring kan plasmaalivoter fra stabiliserte og ikke-stabiliserte blodprøvetakingsrør oppbevares ved -20 °C (bare for DNA som mål) eller -80 °C (DNA og RNA som mål) i minst 4 uker.

Oppbevaring av eluert nukleinsyre

Eluerte nukleinsyrer samles opp i 1,5 ml elueringsrør (følger med). De rensede sirkulerende nukleinsyrene kan oppbevares i opptil 24 timer ved 2–8 °C. I oppbevaringsperioder som er lengre enn 24 timer, anbefales lagring ved -30 til -15 °C for DNA og -90 til -60 °C for RNA-nedstrømsapplikasjoner.

Prosedyre

Viktige punkter før du starter

QIAvac 24 Plus

QIAvac 24 Plus er laget for rask og effektiv vakuumbehandling av opptil 24 QIAGEN-spinnkolonner i parallell. Prøver og vaskeløsninger trekkes gjennom kolonmembranene ved vakuüm i stedet for sentrifugering, noe som gir større hastighet og redusert praktisk tid ved renseprosedyrer.

QIAvac Connecting System kan kombinasjon med QIAvac 24 Plus brukes som et gjennomstrømningssystem. Prøvegjenomstrømningen samles i en egen avfallsflaske.

For vedlikehold av QIAvac 24 Plus, se retningslinjene for håndtering i *QIAvac 24 Plus-håndboken*.

Behandling av QIAamp Mini-kolonner på QIAvac 24 Plus

QIAamp Mini-kolonner behandles på QIAvac 24 Plus ved bruk av VacConnectors til engangsbruk og gjenbrukbare VacValves. VacValves (valgfrie) settes direkte inn i luer-sporene på QIAvac 24 Plus-manifolden og sikrer en jevn strømningshastighet, noe som muliggjør parallell behandling av forskjellige prøvevolumer. De skal brukes for å sikre et konsekvent vakuüm hvis prøvestrømningshastighetene er vesentlig forskjellige. VacConnectors er koblinger til engangsbruk som passer mellom QIAamp Mini-kolonner og VacValves, eller mellom QIAamp Mini-kolonner og luer-sporene på QIAvac 24 Plus. De forhindrer direkte kontakt mellom spinnkolonnen og VacValve under rensing, og dermed unngås krysskontaminering mellom prøvene. VacConnectors kastes etter én gangs bruk. På grunn av de store løsningsvolumene som brukes, er QIAvac Connecting System (eller et lignende oppsett med avfallsflasker) nødvendig (se Figur 2).

Retningslinjer for håndtering av QIAvac 24 Plus

- Plasser alltid QIAvac 24 Plus på en sikker benkeplate eller i et sikkert arbeidsområde. Hvis den faller ned, kan QIAvac 24 Plus-manifolden sprekke.
- Oppbevar alltid QIAvac 24 Plus ren og tørr. For rengjøringsprosedyrer, se QIAvac 24 Plus-håndboken.

Komponentene i QIAvac 24 Plus er ikke resistente mot visse løsemidler (

- Tabell 1). Hvis disse løsemidlene søles på enheten, skyll den grundig med vann.
- For å sikre jevn ytelse må verken silikon eller vakuumsfett påføres på noen del av QIAvac 24 Plus-manifolden.
- Vær alltid forsiktig og bruk vernebriller når du arbeider nær en vakuumanifold under trykk.
- Ta kontakt med QIAGENs tekniske serviceavdeling eller din lokale leverandør for å få informasjon om reserve- eller erstatningsdeler.
- Vakuumtrykket er differensialtrykket mellom innsiden av vakuumanifolden og atmosfæren (standard atmosfærisk trykk 1013 millibar eller 760 mm Hg) og kan måles ved hjelp av QIAvac Connecting System (se Figur 2). Protokollene krever en vakuumpumpe som kan produsere et vakuum eller -800 til -900 mbar (f.eks. QIAGEN Vacuum Pump). Høyere vakuumtrykk må unngås. Bruk av lavere vakuumtrykk enn anbefalt kan redusere utbytte og renhet av nukleinsyre og øke risikoen for tilstoppede membraner.



Figur 2. QIAvac 24 Plus, QIAvac Connecting System og Vacuum Pump

Tabell 1. Egenskaper for kjemisk motstand for QIAvac 24 Plus

| Resistent mot | | Ikke resistent mot |
|------------------|------------------------|--------------------|
| Eddiksyre | Kaotropiske salter | Benzen |
| Kromsyre | Konsentrerte alkoholer | Fenol |
| SDS | Natriumklorid | Kloroform |
| Tween® 20 | Urea | Toluen |
| Klorblekemiddel | Saltsyre | Etere |
| Natriumhydroksid | | |

Oppsett av QIAvac 24 Plus vacuum manifold

1. Koble QIAvac 24 Plus til en vakuuskilde. Ved bruk av QIAvac Connecting System, må systemet kobles til manifolden og vakuuskilden som beskrevet i vedlegg A i *QIAvac 24 Plus-håndboken*.
2. Sett inn en VacValve (valgfri) i hvert luer-spor på QIAvac 24 Plus som skal brukes (se Figur 3). Lukk ubrukte luer-spor med luer-plugger eller lukk den innsatte VacValve. VacValves skal brukes for å sikre et konsekvent vakuu hvis strømningshastighetene for prøver er vesentlig forskjellige.
3. Sett inn en VacConnector i hver VacValve (se Figur 3).
Utfør dette trinnet før du starter rensingen for å unngå at VacConnectors eksponeres for potensielle forurensende stoffer i luften.
4. Plasser QIAamp Mini-kolonnene i VacConnectors på manifolden (se Figur 3).
Merk: Lagre vaskerøret fra blisterpakningen for bruk i renseprotokollen.
5. Sett inn en kolonneforlenger (20 ml) i hver QIAamp Mini-kolonne (se Figur 3).
Merk: Sørg for at kolonneforlengeren er godt satt inn i QIAamp Mini-kolonnen for å unngå lekkasje av prøven.

6. Følg instruksjonene i protokollene for rensing av nukleinsyre. Kast VacConnectors på riktig måte etter bruk.

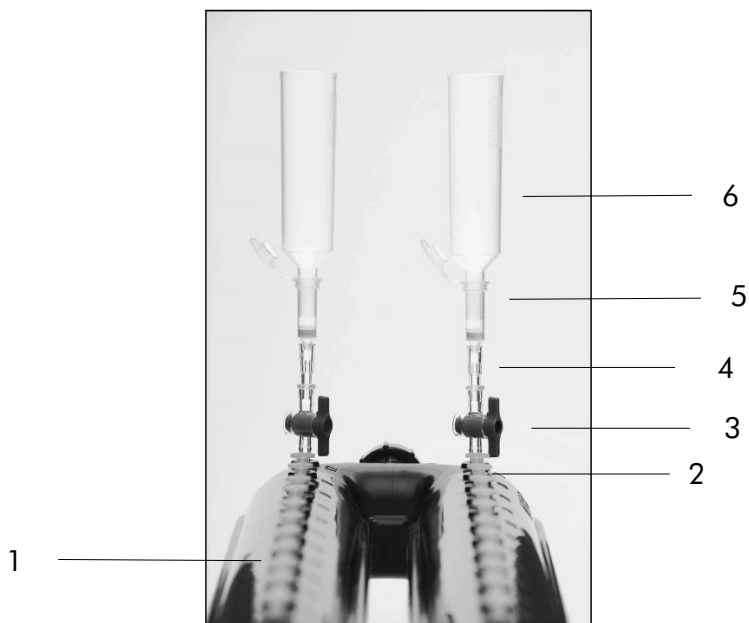
La lokket på QIAamp Mini-kolonnen være åpent mens vakuüm brukes.

Slå av vakuüm mellom trinn for å sikre at et konsekvent, jevnt vakuüm brukes under behandling. For raskere vakuüumløsning bør en Vacuum Regulator brukes (en del av QIAvac Connecting System).

Merk: Hver VacValve kan lukkes individuelt når prøven er helt trukket gjennom spinnkolonnen, slik at parallell behandling av prøver med forskjellige volumer eller viskositeter blir mulig.

7. Rengjør QIAvac 24 Plus etter behandling av prøver (se «Rengjøring og dekontaminering av QIAvac 24 Plus» i *QIAvac 24 Plus-håndboken*).

Merk: Buffere ACL, ACB og ACW1 er ikke kompatible med desinfiseringsmidler som inneholder blekemiddel. Se side 12 for Advarsler og forholdsregler.

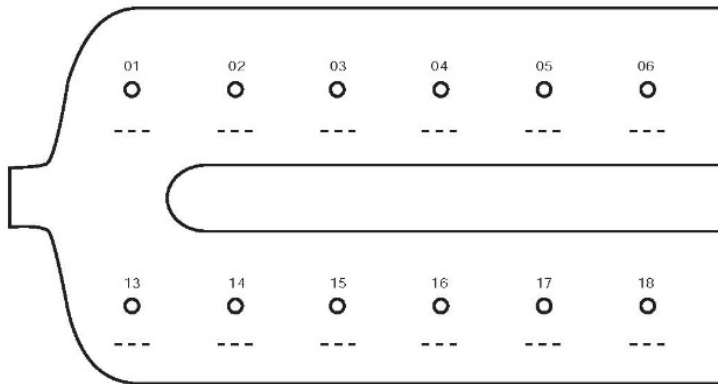


Figur 3. Montere QIAvac 24 Plus med QIAamp Mini-kolonner ved hjelp av VacValves, VacConnectors og kolonneforlengere.

- | | |
|--|------------------------------|
| 1 QIAvac 24 Plus vacuum manifold | 4 VacConnector |
| 2 Luer-spor på QIAvac 24 Plus (lukket med luer-plugg) | 5 QIAamp Mini-kolonne |
| 3 VacValve** | 6 Kolonneforlenger |

Vi anbefaler at rørene og QIAamp Mini-kolonnene som skal brukes på QIAvac 24 Plus-vakuumsystemet, merkes i samsvar med skjemaet i Figur 4 for å unngå sammenblanding av prøver. Denne figuren kan kopieres og merkes med navnene på prøvene.

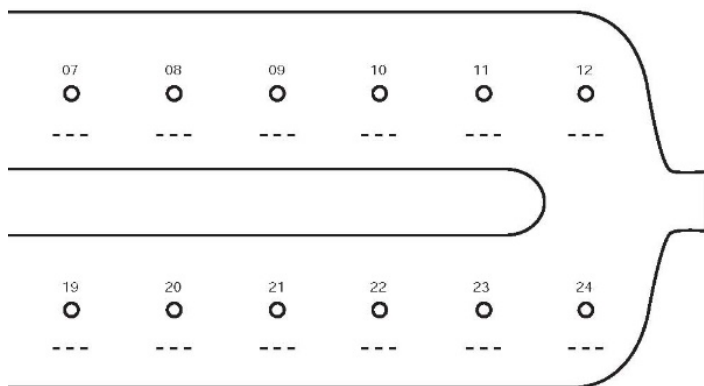
* Må kjøpes separat.



Dato: _____

Operatør: _____

Kjørings-ID: _____



Figur 4. Merkingsskjema for rør og QIAamp Mini-kolonner for bruk på QIAvac 24 Plus-vakuumsystem

Klargjøring av buffere og reagenser

Buffer ACB

Før bruk tilsettes 200 ml isopropanol (100 %) til 300 ml Buffer ACB-konsentrat for å oppnå 500 ml Buffer ACB. Bland godt etter at isopropanol tilsettes.

Buffer ACW1 *

Før bruk tilsettes 25 ml etanol (96–100 %) til 19 ml Buffer ACW1-konsentrat for å oppnå 44 ml Buffer ACW1. Bland godt etter at etanol tilsettes.

Buffer ACW2†

Før bruk tilsettes 30 ml etanol (96–100 %) til 13 ml Buffer ACW2-konsentrat for å oppnå 43 ml Buffer ACW2. Bland godt etter at etanol tilsettes.

Tilsetning av bærer-RNA til Buffer ACL*

Bærer-RNA tjener 2 formål: For det første økes bindingen av nukleinsyrer til QIAamp Mini-membranen, spesielt hvis det er svært få målmolekyler i prøven. For det andre vil tilførselen av store mengder bærer-RNA redusere muligheten for RNA-degradering i det sjeldne tilfellet at RNase-molekylene ikke denatureres av de kaotropske saltene og vaskemidlene i Buffer ACL.

* Inneholder kaotropisk salt. Se side 12-13 for advarsler og forsiktighetsregler.

† Inneholder natriumazid som konserveringsmiddel.

Mengden av lyofilisert bærer-RNA som leveres er tilstrekkelig for volumet av Buffer ACL som medfølger settet. Den anbefalte konsentrasjonen av bærer-RNA har blitt justert, slik at QIAamp DSP Circulating NA-protokollen kan brukes som et generisk rensesystem som er kompatibelt med mange ulike amplifikasjonssystemer og egner seg til en lang rekke RNA- og DNA-mål.

Ulike amplifikasjonssystemer kan ha variert effektivitet, avhengig av den totale mengden nukleinsyrer som finnes i reaksjonen. Eluater fra dette settet inneholder både sirkulerende nukleinsyrer og bærer-RNA, og mengden av bærer-RNA vil i de fleste tilfeller være mye større enn mengden av sirkulerende nukleinsyrer. Kvantifisering av isolerte sirkulerende nukleinsyrer ved UV-absorbansavlesning vil derfor ikke være tilstrekkelig, ettersom resultatene av slike målinger bestemmes av tilstedeværelsen av bærer-RNA.

For å oppnå de høyeste sensitivitetsnivåene i amplifikasjonsreaksjoner kan det være nødvendig å redusere mengden bærer-RNA som tilsettes Buffer ACL.

For amplifikasjonssystemer som involverer oligo dT-primere, bør ikke noe bærer-RNA tilsettes under isolering av fritt sirkulerende nukleinsyrer.

Tilsett 1550 µl Buffer AVE* til røret som inneholder 310 µg med lyofilisert bærer-RNA for å oppnå en løsning med konsentrasjonen på 0,2 µg/µl. Løs opp bærer-RNA grundig, del det i alikvoter av passende størrelse, og oppbevar det ved -30 til -15 °C. Alikvoter med bærer-RNA må ikke fryses/tines mer enn 3 ganger.

Merk deg at bærer-RNA løses ikke opp i Buffer ACL. Det må først løses i Buffer AVE og deretter legges til Buffer ACL.

Beregn volumet av blandingen av Buffer ACL og bærer-RNA som trengs per batch prøver i henhold til tabellene i protokollene. Velg antallet prøver som skal behandles samtidig.

*Inneholder natriumazid som konserveringsmiddel.

Bland forsiktig ved å vende røret eller flasken 10 ganger. For å unngå skumdannelse skal det ikke brukes vorteksmikser.

Merk: Prøveklargjøringsprosedyren er optimalisert for maksimalt 1,0 µg bærer-RNA per prøve. Hvis mindre bærer-RNA har vist seg å være bedre for amplifikasjonssystemet, overfør kun den nødvendige mengden av oppløst bærer-RNA til rørene som inneholder Buffer ACL. For hvert mikrogram bærer-RNA som er nødvendig per klargjøring, tilsett 5 µl oppløst bærer-RNA til Buffer ACL. (Bruk av mindre enn 1,0 µg bærer-RNA per prøve kan være gunstig og må valideres for hver bestemte prøvetype og nedstrømsanalyse.)

Breeze-protokoll: Rensing av sirkulerende Nukleinsyrer fra 1–5 ml med humant blodplasma

Denne protokollen er for rensing av sirkulerende DNA og RNA fra 1–5 ml humant blodplasma og har blitt optimalisert for lite praktisk behandling og kort behandlingstid. For eksisterende brukervaliderte arbeidsflyter som bruker versjon 1/R3 av QIAamp DSP Circulating Kit, se «Classic-protokoll: Rensing av sirkulerende Nukleinsyrer fra 1–5 ml humant blodplasma» (side33).

Viktige punkter før du starter

- Alle sentrifugeringstrinn utføres ved romtemperatur (15–25 °C).
- Slå av vakuüm mellom trinn for å sikre at et konsekvent, jevnt vakuüm brukes under protokolltrinnene.
- **Merk:** Vacuum Pump-trykk skal være mellom -800 til -900 mbar.
- Ekvilibrer prøver til romtemperatur.
- Bruk fosfatbufret saltvann for å få prøvens volum til nærmeste nøyaktige volum (1 ml til 5 ml).
- Monter QIAvac 24 Plus som beskrevet på side 20.
- Varm et vannbad eller en varmeblokk til 56 °C til bruk med 50 ml sentrifugerør i trinn 3.
- Ekvilibrer QIAamp Mini-spinnkolonnene i minst 1 time til romtemperatur før bruk.
- Se til at Buffer ACB, Buffer ACW1 og Buffer ACW2 er klargjort (tilsetning av isopropanol eller etanol) i henhold til instruksjonene på side 25.
- Tilsett bærer-RNA rekonstituert i Buffer AVE til Buffer ACL i henhold til instruksjoner i Tabell 2.

Tabell 2. Volum av Buffer ACL og bærer-RNA (oppløst i Buffer AVE) som er nødvendig for behandling av 1–5 ml humane blodplasmaprøver

| Oppsett for ml plasma | A | B | C | D | E | Bærer-RNA i Buffer AVE (µl) |
|-----------------------|-----------------|------|------|------|-------|-----------------------------|
| | 1 ml | 2 ml | 3 ml | 4 ml | 5 ml | |
| Antall prøver | 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 |

Prosedyre: Breeze-protokoll

1. Pipetter QIAGEN Proteinase K, plasma og Buffer ACL i **denne rekkefølgen** opp i et 50 ml sentrifugerør (medfølger ikke).

| Oppsett | A | B | C | D | E |
|------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| ProtK (μ l) | 100 | 200 | 300 | 400 | 500 |
| Plasma (ml) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| ACL (ml) | 0,8 | 1,6 | 2,4 | 3,2 | 4 |

2. Lukk lokket og bland ved å utføre pulsvorteksblending i 5 x 2 sekunder.

Påse at en synlig vorteks dannes i røret. For å sikre effektiv lysering, er det avgjørende at prøven og Buffer ACL blandes grundig for å fremskaffe en homogen løsning.

Merk: Ikke avbryt prosedyren på dette tidspunktet. Gå umiddelbart videre til trinn 3 for å starte lyseringsinkuberingen.

3. Inkuber ved 56 °C (\pm 1 °C) i 15 (\pm 1) minutter.
4. Sett røret tilbake på laboratoriebenken og skru av lokket.
5. Tilsett Buffer ACB til lysatet i røret. Velg volumet i samsvar med oppsettet fra trinn 1.

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

6. Lukk lokket og bland grundig ved å utføre pulsvorteksblending i 5 x 2 sekunder.

Påse at en synlig vorteks dannes i røret. For å sikre effektiv lysering, er det avgjørende at lysatet og Buffer ACB blandes grundig for å fremskaffe en homogen løsning.

7. Inkuber blandingen av lysat og Buffer ACB i røret i 5 (\pm 1) minutter ved romtemperatur.

8. Sett inn QIAamp Mini-kolonnen i VacConnectors på QIAvac 24 Plus (se «Oppsett av QIAvac 24 Plus vacuum manifold», side 20). Sett inn en 20 ml kolonneforlenger i den åpne QIAamp Mini-kolonnen.

Sørg for at kolonneforlengeren er godt satt inn i QIAamp Mini-kolonnen for å unngå prøvelekkasje.

Merk: Behold vaskerøret for tørr spinn i trinn 13.

9. Ha lysatet fra trinn 7 forsiktig over i kolonneforlengeren på QIAamp Mini-kolonnen. Slå på vakuumpumpen. Når alle lysater er trukket helt gjennom kolonnene, slår du av vakuumpumpen og slipper trykket til 0 mbar. Fjern forsiktig og kast kolonneforlengeren. Vær oppmerksom på at store lysatvolumer (ca. 18 ml når du starter med en 5 ml prøve) kan ta opptil 20 minutter å passere gjennom QIAamp Mini-membranen ved vakuumkraft. For rask og praktisk vakuumløsning bør Vacuum Regulator brukes (en del av QIAvac Connecting System).

Merk: For å unngå krysskontaminering, må du være forsiktig så du ikke krysser QIAamp Mini-kolonner i nærheten når kolonneforlengerne fjernes.

10. Påfør 600 µl Buffer ACW1 på QIAamp Mini-kolonnen. La lokket på kolonnen være åpent, og slå av vakuumpumpen. Etter at all Buffer ACW1 er trukket helt gjennom QIAamp Mini-kolonnen, slår du av vakuumpumpen og slipper trykket til 0 mbar.
11. Påfør 750 µl Buffer ACW2 på QIAamp Mini-kolonnen. La lokket på kolonnen være åpent, og slå av vakuumpumpen. Etter at all Buffer ACW2 er trukket helt gjennom QIAamp Mini-kolonnen, slår du av vakuumpumpen og slipper trykket til 0 mbar.
12. Påfør 750 µl med etanol (96–100 %) på QIAamp Mini-kolonnen. La lokket på kolonnen være åpent, og slå av vakuumpumpen. Etter at all etanolen er trukket helt gjennom spinnkolonnen, slår du av vakuumpumpen og slipper trykket til 0 mbar.
13. Lukk lokket på QIAamp Mini-kolonnen. Fjern den fra vakuumanifolden, og kast VacConnector. Plasser QIAamp Mini-kolonnen i et rent 2 ml vaskerør (fra trinn 8), og sentrifuger ved full hastighet (ca. 20 000 x g, 14 000 o/min) i 3 (± 0,5) minutter.

14. Plasser QIAamp Mini-kolonnen i et nytt 2 ml vaskerør. Åpne lokket og inkuber enheten ved romtemperatur i 3 minutter for å tørke membranen fullstendig.
15. Plasser QIAamp Mini-kolonnen i et rent 1,5 ml elueringsrør (medfølger), og kast det 2 ml vaskerøret fra trinn 14. Påfør forsiktig 20–150 µl Buffer AVE på midten av membranen til QIAamp Mini-kolonnen. Lukk lokket og inkuber ved romtemperatur i 3 (± 0,5) minutter.

Viktig: Sikre at eluerings-Buffer AVE ekvilibrerer til romtemperatur (15–25 °C). Hvis elueringen utføres i små volum (<50 µl), må elueringsbufferen dispenseres på midten av membranen for fullstendig eluering av bundne nukleinsyrer.

Elueringsvolumet er fleksibelt og kan tilpasses i henhold til kravene for nedstrømsapplikasjoner.

Eluering med mindre volumer av Buffer AVE fører til høyere nukleinsyrekonsentrasjoner, men kan resultere i lavere totalutbytte.

Eluatvolumet som gjenvinnes kan være opptil 5 µl mindre enn elueringsvolumet som påføres membranen i QIAamp Mini-kolonnen.

Merk: For forventede lave NA-utbytter anbefales bruk av et lavbindingsrør for eluering (følger ikke med).

16. Sentrifuger i en mikrosetruffuge ved full hastighet (ca. 20 000 x g, eller 14 000 o/min) i 1 minutt for å eluere nukleinsyrene.

Classic-protokoll: Rensing av sirkulerende Nukleinsyrer fra 1–5 ml humant blodplasma

Denne protokollen utgjør den uendrede protokollen for revisjon 3 (R3) av QIAamp DSP Circulating NA Kit-håndboken for bruk med f.eks. eksisterende brukervaliderte arbeidsflyter for 1–5 ml humane plasma.

Viktige punkter før du starter

- Alle sentrifugeringstrinn utføres ved romtemperatur (15–25 °C).
- Slå av vakuüm mellom trinn for å sikre at et konsekvent, jevnt vakuüm brukes under protokolltrinnene.
Merk: Vacuum Pump-trykk skal være mellom -800 til -900 mbar.
- Ekvilibrer prøver til romtemperatur.
- Bruk fosfatbufret saltvann for å få prøvens volum til nærmeste nøyaktige volum (1 ml til 5 ml).
- Monter QIAvac 24 Plus som beskrevet på side 20.
- Varm et vannbad eller en varmeblokk til 60 °C til bruk med 50 ml sentrifugerør i trinn 3.
- Varm en varmeblokk til 56 °C til bruk med 2 ml vaskerør i trinn 14.
- Ekvilibrer QIAamp Mini-spinnkolonnene minst 1 time til romtemperatur før bruk.
- Se til at Buffer ACB, Buffer ACW1 og Buffer ACW2 er klargjort (tilsetning av isopropanol eller etanol) i henhold til instruksjonene på side 25.
- Tilsett bærer-RNA rekonstituert i Buffer AVE til Buffer ACL i henhold til instruksjoner i Tabell 3.

Tabell 3. Volum av Buffer ACL og bærer-RNA (oppløst i Buffer AVE) som er nødvendig for behandling av 1–5 ml humane blodplasmaprøver

| Oppsett for ml plasma | A | B | C | D | E | Bærer-RNA i Buffer AVE (µl) |
|-----------------------|------------------------|------|------|------|-------|-----------------------------|
| | 1 ml | 2 ml | 3 ml | 4 ml | 5 ml | |
| Antall prøver | 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 |

Prosedyre: Classic-protokoll

1. Pipetter QIAGEN Proteinase K, plasma og Buffer ACL i denne rekkefølgen opp i et 50 ml sentrifugerør (medfølger ikke).

| Oppsett | A | B | C | D | E |
|------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| ProtK (μ l) | 100 | 200 | 300 | 400 | 500 |
| Plasma (ml) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| ACL (ml) | 0,8 | 1,6 | 2,4 | 3,2 | 4 |

2. Lukk lokket og bland ved å utføre pulsvorteksblending i 30 sekunder.

Påse at en synlig vorteks dannes i røret. For å sikre effektiv lysering, er det avgjørende at prøven og Buffer ACL blandes grundig for å fremskaffe en homogen løsning.

Merk: Ikke avbryt prosedyren på dette tidspunktet. Gå umiddelbart videre til trinn 3 for å starte lyseringsinkuberingen.

3. Inkuber ved 60 °C (\pm 1 °C) i 30 (\pm 2) minutter.
4. Sett røret tilbake på laboratoriebenken og skru av lokket.
5. Tilsett Buffer ACB til lysatet i røret. Velg volumet i samsvar med oppsettet fra trinn 1.

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

6. Lukk lokket og bland grundig ved å utføre pulsvorteksblending i 30 sekunder.

Påse at en synlig vorteks dannes i røret. For å sikre effektiv lysering, er det avgjørende at lysatet og Buffer ACB blandes grundig for å fremskaffe en homogen løsning.

7. Inkuber blandingen av lysat og Buffer ACB i røret i 5 (\pm 1) minutter på is.

8. Sett inn QIAamp Mini-kolonnen i VacConnectors på QIAvac 24 Plus (se «Oppsett av QIAvac 24 Plus vacuum manifold», side 20). Sett inn en 20 ml kolonneforlenger i den åpne QIAamp Mini-kolonnen.

Sørg for at kolonneforlengeren er godt satt inn i QIAamp Mini-kolonnen for å unngå prøvelekkasje.

Merk: Behold vaskerøret for tørr spinn i trinn 13.

9. Ha lysatet fra trinn 7 forsiktig over i kolonneforlengeren på QIAamp Mini-kolonnen. Slå på vakuumpumpen med et trykk på -800 til -900 mbar. Når alle lysater er trukket helt gjennom kolonnene, slår du av vakuumpumpen og slipper trykket til 0 mbar. Fjern forsiktig og kast kolonneforlengeren.

Vær oppmerksom på at store lysatvolumer (ca. 18 ml når du starter med en 5 ml prøve) kan ta opptil 20 minutter å passere gjennom QIAamp Mini-membranen ved vakuumkraft.

For rask og praktisk vakuumløsning bør Vacuum Regulator brukes (en del av QIAvac Connecting System).

Merk: For å unngå krysskontaminering, må du være forsiktig så du ikke krysser QIAamp Mini-kolonner i nærheten når kolonneforlengerne fjernes.

10. Påfør 600 µl Buffer ACW1 på QIAamp Mini-kolonnen. La lokket på kolonnen være åpent, og slå av vakuumpumpen. Etter at all Buffer ACW1 er trukket helt gjennom QIAamp Mini-kolonnen, slår du av vakuumpumpen og slipper trykket til 0 mbar.
11. Påfør 750 µl Buffer ACW2 på QIAamp Mini-kolonnen. La lokket på kolonnen være åpent, og slå av vakuumpumpen. Etter at all Buffer ACW2 er trukket helt gjennom QIAamp Mini-kolonnen, slår du av vakuumpumpen og slipper trykket til 0 mbar.

12. Påfør 750 µl med etanol (96–100 %) på QIAamp Mini-kolonnen. La lokket på kolonnen være åpent, og slå av vakuumpumpen. Etter at all etanolen er trukket helt gjennom spinnkolonnen, slår du av vakuumpumpen og slipper trykket til 0 mbar.
13. Lukk lokket på QIAamp Mini-kolonnen. Fjern den fra vakuumanifolden og kast VacConnector. Plasser QIAamp Mini-kolonnen i et rent 2 ml vaskerør (fra trinn 8), og sentrifuger ved full hastighet (ca. 20 000 x g, 14 000 o/min) i 3 (± 0,5) minutter.
14. Plasser QIAamp Mini-kolonnen i et nytt 2 ml vaskerør. Åpne lokket og inkuber enheten ved 56 °C (± 1 °C) i 10 (± 1) minutter for å tørke membranen fullstendig.
15. Plasser QIAamp Mini-kolonnen i et rent 1,5 ml elueringsrør (medfølger), og kast det 2 ml vaskerøret fra trinn 13. Påfør forsiktig 20–150 µl Buffer AVE på midten av membranen til QIAamp Mini-kolonnen. Lukk lokket og inkuber ved romtemperatur i 3 (± 0,5) minutter.

Viktig: Sikre at eluerings-Buffer AVE ekvilibrerer til romtemperatur (15–25 °C). Hvis elueringen utføres i små volum (<50 µl), må elueringsbufferen dispenseres på midten av membranen for fullstendig eluering av bundne nukleinsyrer.

Elueringsvolumet er fleksibelt og kan tilpasses i henhold til kravene for nedstrømsapplikasjoner.

Eluering med mindre volumer av Buffer AVE fører til høyere nukleinsyrekonsentrasjoner, men kan resultere i lavere totalutbytte.

Eluatvolumet som gjenvinnes kan være opptil 5 µl mindre enn elueringsvolumet som påføres QIAamp Mini-kolonnen.

Merk: For forventede lave NA-utbytter anbefales bruk av et lavbindingsrør for eluering (følger ikke med).

16. Sentrifuger i en mikrosetruffuge ved full hastighet (ca. 20 000 x g, eller 14 000 o/min) i 1 minutt for å eluere nukleinsyrene.

Kvalitetskontroll

I henhold til QIAGENs ISO-sertifiserte kvalitetsstyringssystem, testes hvert parti med QIAamp DSP Circulating NA Kit mot forhåndsbestemte spesifikasjoner for å sikre konsekvent produktkvalitet.

Begrensninger

Systemytelsen for isolering av sirkulerende, cellefrie nukleinsyrer er etablert ved bruk av humane plasmaprøver generert fra følgende blodprøvetakingsrør:

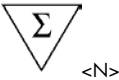











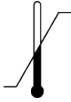
- K2-EDTA (Beckton Dickinson, kat.nr. 367525)
- PAXgene Blood ccfDNA Tube (PreAnalytiX, kat.nr. 768115)
- Cell-Free DNA BCT (Streck, kat.nr. 218962)

Det er brukerens ansvar å validere systemets ytelse for andre prosedyrer som brukes i laboratoriet, og som ikke dekkes av QIAGEN-undersøkelser av ytelse.

For å redusere risikoen for negativ innvirkning på de diagnostiske resultatene skal det brukes egnede kontroller for downstream-applikasjoner. For ytterligere validering anbefales retningslinjene fra Den internasjonale konferanse om harmonisering av tekniske krav (ICH) i ICH Q2 (R1) Validering av analytiske prosedyrer: Tekst og metodologi.

Alle diagnostiske resultater som genereres, må tolkes i sammenheng med andre kliniske funn eller laboratoriefunn.

Symboler

| Symbol | Symboldefinisjon |
|---|--|
|  | Inneholder reagenser som er tilstrekkelig til <N> tester |
|  | Brukes innen |
|  | In vitro-diagnostisk medisinsk enhet |
|  | Ved ankomst |
|  | Åpne ved levering. Oppbevar QIAamp Mini-spinnkolonner ved 2–8 °C |
|  | Katalognummer |
|  | Nummer |
|  | Partinummer |
|  | Materialnummer |
|  | Komponenter |
|  | Volum |
|  | Tilsetter |
|  | Temperaturbegrensninger |



Produsent



Se bruksanvisningen



Skriv ned gjeldende dato etter at du har tilsatt etanol i flasken



Ethanol



Skriv ned gjeldende dato etter at du har tilsatt isopropanol i flasken



Isopropanol



Inneholder



Fører til



Guanidintiocyanat



Guanidinhydroklorid



BRIJ 58



Globalt artikkelnummer

Referanser

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.

Kontaktinformasjon

Hvis du ønsker teknisk hjelp og mer informasjon, kan du gå til vårt tekniske støttesenter på **support.qiagen.com** eller ringe en av QIAGENs tekniske serviceavdelinger eller lokale leverandører (se bak på omslaget eller besøk www.qiagen.com).

Feilsøkingsveiledning

Denne feilsøkingsveiledningen kan være nyttig for å løse problemer som kan oppstå. Se baksiden eller besøk www.qiagen.com for kontaktinformasjon.

Kommentarer og forslag

Lite eller ingen nukleinsyre i eluatet

- | | | |
|----|---|--|
| a) | Bruk av ikke-stabilisert plasma | Ikke-stabiliserte plasmaprøver kan føre til akselerert DNA-degradering. Vi anbefaler å følge CEN/TS 16835-3:2015. Gjenta renseprosedyren med nye prøver. |
| b) | Forlenget tid mellom blodtaking og plasmaklargjøring | Nukleære blodceller kan gå i oppløsning og frigjøre genomisk DNA i plasmaet og fortynne målnukleinsyren. |
| c) | Prøver er frosset og tint mer enn én gang | Gjentatt frysing og tining bør unngås, da dette kan føre til DNA-degradering. Alltid bruk ferske prøver eller prøver tint bare én gang. |
| d) | Lav konsentrasjon av mål-DNA i prøvene | Plasmaprøver ble stående ved romtemperatur for lenge. Gjenta renseprosedyren med nye prøver Merk: noen individer kan ha en lav cellefri NA-konsentrasjon i plasma. Her bør et økt prøvevolum og et lavt eluatvolum velges. |
| e) | Ineffektiv prøvelysing i Buffer ACL | Hvis QIAGEN Proteinase K ble utsatt for forhøyet temperatur i lengre tid, kan det miste aktivitet. Gjenta prosedyren med nye prøver og fersk QIAGEN Proteinase K. |
| f) | Blanding av Buffer ACL og bærer-RNA er ikke tilstrekkelig blandet | Bland Buffer ACL med bærer-RNA ved å forsiktig snu røret med Buffer ACL og bærer-RNA minst 10 ganger. |
| g) | Etanol med lav prosentandel brukt i stedet for 96–100 % | Gjenta renseprosedyren med nye prøver og 96–100 % etanol. Denaturert alkohol som inneholder andre stoffer, som metanol eller metyletylketon, må ikke brukes. |
| h) | Buffer ACB klargjort på feil måte | Kontroller at Buffer ACB-konsentratet ble rekonstituert med riktig volum isopropanol (ikke etanol, se side 25). |
| i) | Buffer ACW1 eller Buffer ACW2 klargjort på feil måte | Kontroller at Buffer ACW1- og Buffer ACW2-konsentratene ble fortennet med riktig volum etanol (se side 25). Gjenta renseprosedyren med nye prøver. |
| j) | Buffer ACW1 eller Buffer ACW2 klargjort med 70 % etanol | Kontroller at Buffer ACW1- og Buffer ACW2-konsentratene ble fortennet med 96–100 % etanol (se side 25). Gjenta renseprosedyren med nye prøver. |

DNA eller RNA fungerer ikke godt i nedstrøms enzymatiske reaksjoner

- | | | |
|----|--------------------------------|--|
| a) | Lite eller ingen DNA i eluatet | Se «Lite eller ingen nukleinsyre i eluatet» over for mulige årsaker. Øk mengden eluat tilsatt reaksjonen om mulig. |
|----|--------------------------------|--|

Kommentarer og forslag

- | | | |
|----|---------------------------------|---|
| b) | Feil elueringsvolum brukt | Bestem maksimum volum eluat egnet for nedstrømsapplikasjonen. Reduser eller øk volumet av eluat som er tilsatt nedstrømsapplikasjonen tilsvarende. Elueringsvolumet kan tilpasses proporsjonalt. Merk: Eluering med mindre volumer av Buffer AVE fører til høyere nukleinsyrekonsentrasjoner, men kan resultere i et lavere totalutbytte. |
| c) | Buffere er ikke grundig blandet | Salt- og etanolkomponenter i vaskebuffer ACW2 kan ha skilt seg ut etter å ha blitt stående i en lang periode mellom kjøringene. Bland alltid buffere grundig før hver runde. |
| d) | Interferens grunnet bærer-RNA | Hvis tilstedeværelsen av bærer-RNA i eluatet forstyrrer den nedstrøms enzymatiske reaksjonen, kan det være nødvendig å redusere mengden bærer-RNA eller å utelate det helt. |

Generell håndtering

- | | | |
|----|---|---|
| a) | Tilstoppet QIAamp Mini-kolonne | Hvis strømningshastigheten reduseres, kan vakuumtiden forlenges. Alternativt kan du lukke VacValve, hvis den brukes, og forsiktig fjerne monteringen av kolonneforlengeren, VacConnector og VacValve fra QIAamp Mini-kolonnen, uten å miste noe av lysatet i kolonneforlengeren. Fjern QIAamp Mini-kolonnen fra vakuumanifolden, legg den i et 2 ml vaskerør og sentrifuger den med full hastighet til prøven har passert helt gjennom membranen. Skift ut monteringen av kolonneforlengeren, VacConnector og VacValve som inneholder det gjenværende lysatet. Slå på vakuumpumpen, åpne VacValve og fortsett å laste inn det gjenværende lysatet. Gjenta prosedyren ovenfor hvis QIAamp Mini-kolonnen fortsetter å tette seg. Det kan ha dannet seg kryopresipitater i plasma på grunn av gjentatt frysing og tining. Disse kan blokkere QIAamp Mini-kolonnen. Ikke bruk plasma som er blitt frosset og tint mer enn én gang. Hvis kryopresipitater er synlige, rens prøven ved sentrifugering i 5 minutter ved 16 000 x g. |
| b) | Variable elueringsvolumer | Ulike prøver kan påvirke volumet av det endelige eluatet. Eluatvolumet som gjenvinnes kan være opptil 5 ul mindre enn elueringsvolumet som påføres QIAamp Mini-kolonnen. |
| c) | Vakuumtrykk på -800 til -900 mbar ikke nådd | Vakuumanifolden er ikke tett lukket. Trykk ned lokket på vakuumanifolden etter at vakuumet er slått på. Kontroller om vakuumtrykket er nådd. Pakningen til QIAvac-lokket er utslitt. Kontroller manifoldens forsegling visuelt og skift den ut om nødvendig. VacValves er utslitt. Fjern alle VacValves og sett inn VacConnectors direkte i luer-forlengelsene. Sett inn QIAamp Mini-kolonner i VacConnectors, lukk lokket på kolonnene og slå på vakuum. Kontroller om vakuumtrykket er nådd. Skift ut VacValves om nødvendig. Tilkobling til vakuumpumpe er utett. Lukk alle luer-forlengelser med luer-lokk og slå på vakuumpumpen. Kontroller om vakuumtrykket er stabilt etter at pumpen er slått på (og Vacuum Regulator-ventilen er stengt). Bytt om nødvendig koblingene mellom pumpe og vakuumanifold. Hvis vakuumtrykket fremdeles ikke er nådd, skifter du ut vakuumpumpen ut med en som er sterkere. |

Vedlegg A: Anbefaling for separasjon og oppbevaring av blodplasma

Følg produsentens instruksjoner for separasjon og oppbevaring av plasma for stabilisering av blodprøvetakingsrør (f.eks. PAXgene ccfDNA-rør eller Streck Cell-Free DNA-rør). Vi anbefaler å validere disse lagringsbetingelsene i kombinasjon med den spesifikke nedstrømsapplikasjonen og det spesifikke målet.

For ikke-stabilisert BCT, anbefaler vi å følge CEN/TS 16835-3:2015.

For å isolere sirkulerende, cellefrie nukleinsyrer fra blodprøver, anbefaler vi å følge denne protokollen. Den inkluderer et sentrifugeringstrinn med høy g-kraft for å fjerne cellulære rester, og reduserer dermed mengden av cellulært eller genomisk DNA og RNA i prøven.

1. Plasser EDTA-fullblod i BD Vacutainer®-rør (eller andre primære blodrør som inneholder EDTA som antikoagulant) i en sentrifuge avkjølt til 4 °C med rotor som kan svinges ut og passende bøtter.
2. Sentrifuger prøvene i 10 minutter ved 1900 x g (3000 o/min) ved 4 °C.
3. Aspirer forsiktig plasma-supernatanten uten å forstyrre det plasma-cellulære grensesnittlaget. Omtrent 4–5 ml plasma kan hentes fra et 10 ml primært blodrør.

Merk: Plasma kan brukes til sirkulasjon av nukleinsyreekstraksjon på dette stadiet. Imidlertid vil den følgende sentrifugeringen med høy hastighet fjerne ytterligere cellulært avfall og kontaminering fra de sirkulerende nukleinsyrene med genomisk DNA og RNA fra skadede nukleære blodceller.

4. Aspirert plasma overføres til et nytt sentrifugerør.
5. Sentrifuger plasmaprøver i 10 minutter ved 16 000 x g (i rotor med fast vinkel) at 4 °C. Dette vil fjerne ytterligere cellulære nukleinsyrer festet til celleavfall.
6. Fjern supernatanten forsiktig og overfør til et nytt rør uten å forstyrre pelleten.

-
7. Hvis plasma vil bli brukt til nukleinsyreekstraksjon samme dag, oppbevares det ved 2–8 °C frem til videre behandling. Ved langsiktig oppbevaring kan plasmaalikkvoter fra stabiliserte og ikke-stabiliserte blodprøvetakingsrør oppbevares ved -20 °C (DNA som mål) eller -80 °C (RNA som mål) i minst 4 uker. Tin plasmarørene ved romtemperatur før plasmaet brukes til sirkulerende nukleinsyreekstraksjon.
8. **Valgfritt:** For å fjerne kryopresipitater, sentrifugeres plasmaprøver i 5 minutter ved 16 000 x g (i rotor med fast vinkel).
- Valgfritt:** Overfør supernatanten til et nytt rør og begynn deretter med protokollen for sirkulerende nukleinsyreekstraksjon.

Vedlegg B: Generelle kommentarer om håndtering av RNA

Håndtere RNA

Ribonukleaser (RNaser) er svært stabile og aktive enzymer som vanligvis ikke trenger kofaktorer for å fungere. Siden RNaser er vanskelige å inaktivere, og selv de minste mengdene er nok til å ødelegge RNA, ikke bruk plast eller glass uten først å eliminere mulig RNase-kontaminasjon. Du bør være svært nøye med å unngå at RNase utilsiktet introduseres i RNA-prøven under eller etter renseprosedyren. For å opprette og vedlikeholde et RNase-fritt miljø, må du overholde visse forholdsregler under forhåndsbehandling og bruk av engangs- og ikke-engangskar og løsninger når du jobber med RNA.

Generell håndtering

Riktig mikrobiologisk, aseptisk teknikk skal alltid brukes ved arbeid med RNA. Det er bakterier på hender og støvpartikler, og disse er de vanligste kildene til RNase-kontaminering. Bruk alltid lateks- eller vinylhansker ved håndtering av reagenser og RNA-prøver for å forhindre RNase-kontaminering fra overflaten av huden eller fra støvete laboratorieutstyr. Bytt hansker ofte, og hold rørene lukket når det er mulig. Oppbevar renset RNA på is når alikvoter pipetteres for nedstrømsapplikasjoner.

Plastdeler til engangsbruk

Bruk av sterile, RNase-frie polypropylenrør til engangsbruk anbefales gjennom hele prosedyren.

Bestillingsinformasjon

| Produkt | Innhold | Kat.nr. |
|------------------------------------|---|---|
| QIAamp DSP Circulating NA Kit (50) | Til 50 klargjøringer: QIAamp Mini-kolonner, kolonneforlengere, VacConnectors, QIAGEN Proteinase K, reagenser, buffere og prøvetakingsrør | 61504 |
| Tilbehør | | |
| QIAvac 24 Plus vacuum manifold* | Vakuumanifold for behandling av 1–24 spinnkolonner: QIAvac 24 Plus Vacuum manifold, luer-plugger og hurtigkoblinger | 19413 |
| Vacuum Pump* | Universell vakuumpumpe | 84010 [USA og Canada] 84000 [Japan] 84020 [resten av verden] |
| QIAvac Connecting System* | System for tilkobling av vakuumanifold med vakuumpumpe: inkluderer skuff, avfallsflasker, slanger, koblinger, ventil, måler og 24 VacValves | 19419 |

* Til bruk med vakuumprotokoller.

Hvis du ønsker oppdatert lisensinformasjon og produktspesifikke ansvarsfraskrivelser, kan du se i håndboken eller bruksanvisningen for det aktuelle QIAGEN-settet. Håndbøker og brukerhåndbøker for QIAGEN-sett er tilgjengelige på www.qiagen.com eller kan leveres fra QIAGENs tekniske serviceavdeling eller din lokale distributør.

Endringshistorikk for håndbok

| Dato | Endringer |
|---------------|---|
| R4 09/2019 | Endring av «Tiltenkt bruk» til cellefrie nukleinsyrer bare fra humane plasma. Inkludering av «Breeze»-protokoll. Ingen protokoller for urin og miRNA inkludert. |

Begrenset lisensavtale for QIAamp DSP Circulating NA Kit

Bruk av dette produktet innebærer at enhver kjøper eller bruker av produktet samtykker i følgende vilkår:

1. Produktet kan bare brukes i samsvar med protokollene som leveres med produktet og denne håndboken, og skal bare brukes med komponenter som er inkludert i settet. QIAGEN gir ingen lisens når det gjelder noen av QIAGENS åndsprodukter til å bruke eller innlemme komponenter i dette settet sammen med andre komponenter som ikke er inkludert i dette settet, med unntak av det som er beskrevet i protokollene som leveres med produktet, denne håndboken og andre protokoller som er tilgjengelige på www.qiagen.com. Noen av disse ytterligere protokollene er utarbeidet av QIAGEN-brukere for QIAGEN-brukere. Disse protokollene er ikke blitt grundig testet eller optimalisert av QIAGEN. QIAGEN garanterer ikke for dem og gir heller ingen garanti for at de ikke krenker rettighetene til tredjeparter.
2. QIAGEN gir ingen garanti for at dette settet og/eller bruk av det ikke krenker rettighetene til tredjeparter, bortsett fra uttrykkelig oppgitte lisenser.
3. Dette settet og komponentene i det er lisensiert for engangsbruk og kan ikke brukes flere ganger, modifiseres eller selges på nytt.
4. QIAGEN frasier seg spesifikt andre lisenser, uttrykt eller underforstått, bortsett fra de som er uttrykkelig oppgitt.
5. Kjøperen og brukeren av settet samtykker i at de ikke skal gjøre eller la noen andre gjøre noe som kan resultere i eller fremme handlinger som er forbudt ovenfor. QIAGEN kan håndheve forbud i denne begrensede lisensavtalen i en hvilken som helst domstol, og skal få tilbake alle sine etterforsknings- og domstolskostnader, inkludert advokathonorarer, knyttet til enhver handling som iverksettes for å håndheve denne begrensede lisensavtalen eller eventuell intellektuell eiendomsrett forbundet med settet og/eller komponentene.

Oppdaterte lisensvilkår er tilgjengelige på www.qiagen.com.

Varemerker: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp® (QIAGEN Group), BD Vacutainer® (Becton, Dickinson and Company), Tween® (ICI Americas Inc.). Registrerte navn, varemerker osv. som brukes i dette dokumentet, skal ikke anses som ubeskyttet ved lov, selv når de ikke er spesiell merket som sådan.

1118364 10/2019 HB-0466-005 © 2019 QIAGEN. Med enerett.

